

Mikrobielle Kohlenstoff- und Stickstofftransformationen im Verdauungstrakt von Regenwürmern (Oligochaeta)

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Pia Katharina Wüst

Bayreuth, Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2006 bis August 2010 am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Harold L. Drake angefertigt. Teile der experimentellen Arbeit wurden am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Massey Universität in Palmerston North und am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

Gefördert wurde die Arbeit mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Fördernummer DFG DR 310/4-1, der Massey Universität und der Universität Bayreuth.

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.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.12.2010

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 29.07.2011

Prüfungsausschuss:

Prof. H.L. Drake (Ph.D.) (Erstgutachter)

Prof. Dr. K. Dettner (Zweitgutachter)

Prof. Dr. O. Meyer (Vorsitzender)

Prof. Dr. E. Matzner

Prof. Dr. W. Schumann

Für Miró

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGEN, TABELLEN UND GLEICHUNGEN	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Regenwürmer.....	1
1.1.1 Diversität und geographische Verbreitung.....	1
1.1.2 Ökologische Relevanz	2
1.1.3 Ökologische Gruppen.....	4
1.1.4 Verdauungssystem	4
1.1.5 Mikroorganismen im Verdauungstrakt.....	6
1.2 Gärung (Fermentation).....	9
1.3 Nitratreduzierende Prozesse	12
1.3.1 Assimilatorische Nitratreduktion.....	13
1.3.2 Dissimilatorische Nitratreduktion.....	13
1.3.2.1 Denitrifikation	13
1.3.2.2 Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA)	16
1.4 Hypothesen und Zielsetzung	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Standorte und Probenahme.....	18
2.2 Untersuchte Regenwurmarten.....	19
2.3 Bestimmung der Darmpassagezeit	21
2.4 Mikrosensormessungen.....	22
2.4.1 Allgemein	22
2.4.2 Messungen in Regenwürmern	25
2.4.3 Messungen in Wurmkkammern	26
2.5 Inkubationsversuche (Mikrokosmen).....	27
2.5.1 Regenwürmer	27
2.5.2 Regenwurmabschnitte.....	28
2.5.3 Verdauungstrakte.....	28

2.5.4	Boden und Verdauungstraktinhalt	28
2.5.4.1	Boden und Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm.....	29
2.5.4.2	Inhalt aus Mittel- und Enddarm für Stabile-Isotopenbeprobung	29
2.6	Analytische Methoden	30
2.6.1	Extraktion von Boden und Verdauungstraktinhalt	30
2.6.2	Wassergehalt und Trockengewicht	30
2.6.3	Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt	30
2.6.4	pH-Wert	31
2.6.5	Gase	31
2.6.6	Lösliche organische Verbindungen	34
2.6.7	Anorganische Ionen	36
2.6.7.1	Ammonium	36
2.6.7.2	Eisen(II).....	37
2.6.7.3	Nitrat.....	37
2.6.7.4	Nitrit	38
2.6.8	Proteine	38
2.6.8.1	Präparation eines zellfreien Extrakts.....	38
2.6.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
2.6.8.3	Bestimmung der Hydrogenaseaktivität.....	39
2.7	Mikrobiologische Methoden	40
2.7.1	Nährmedien und Kultivierungstechniken	40
2.7.1.1	Lösungen.....	41
2.7.1.1.1	Mineralsalzlösung	41
2.7.1.1.2	Spurenelementlösung	41
2.7.1.1.3	Vitaminlösung	42
2.7.1.2	Nährmedien.....	42
2.7.1.2.1	Nährmedium für Eisen(III)-Reduzierer (ERan).....	42
2.7.1.2.2	Nährmedium für <i>Sporomusa rhizae</i> (SRan).....	43
2.7.1.2.3	SOC-Medium	43
2.7.1.2.4	LB-Medium (Luria-Bertani-Medium).....	44
2.7.1.2.5	LB-Platten	44
2.7.1.2.6	LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal.....	44
2.7.2	Lebend-Keimzahlbestimmungen	44
2.7.3	Kultivierung von <i>Sporomusa rhizae</i>	45
2.7.4	Wachstumsmessungen	45

2.8 Molekularbiologische Methoden	46
2.8.1 Extraktion von Nukleinsäuren	46
2.8.2 Auftrennung von DNA und RNA	47
2.8.3 Reinheitskontrolle und Quantifizierung von Nukleinsäuren	47
2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese	48
2.8.5 rRNA basierte Stabile-Isotopenbeprobung (RNA-SIP)	48
2.8.5.1 Prinzip	48
2.8.5.2 Dichtegradientenzentrifugation (Ultrazentrifugation).....	49
2.8.5.3 Fraktionierung der Gradienten	50
2.8.5.4 Dichtebestimmung	51
2.8.5.5 Präzipitation der RNA	51
2.8.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA (RT-PCR)	51
2.8.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.8.7.1 Allgemein	52
2.8.7.2 Strukturelles Gen <i>nosZ</i>	55
2.8.7.3 16S rRNA Gen	56
2.8.7.4 Überprüfung des Klon-Inserts (M13-PCR).....	56
2.8.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	56
2.8.8.1 Gelaufreinigung.....	56
2.8.8.2 Direkte Aufreinigung	57
2.8.9 Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (tRFLP)-Analyse	57
2.8.9.1 Markierung mit fluoreszenzmarkiertem Primer	57
2.8.9.2 Mung Bean Endonuklease-Verdau	57
2.8.9.3 Restriktionsverdau	58
2.8.9.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	58
2.8.10 Klonierung	59
2.8.10.1 Ligation	59
2.8.10.2 Transformation.....	60
2.8.10.3 Klonscreening	61
2.8.11 Sequenzierung	61
2.8.12 Sequenzanalyse	61
2.8.13 Stammbaumberechnungen	62
2.8.14 Auswertung der Genbibliotheken	63
2.8.14.1 Extrapolation	63
2.8.14.2 Rarefaction.....	63
2.8.15 Sequenzhinterlegung	64

2.9	Statistische Verfahren	64
2.9.1	Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und Fehlerfortpflanzung.....	64
2.9.2	Regression.....	65
2.10	Verwendete Chemikalien und Gase.....	66
3	ERGEBNISSE.....	67
3.1	Denitrifikation und assoziierte Mikroorganismen im Verdauungstrakt von neuseeländischen Regenwürmern (<i>Lumbricidae</i> und <i>Megascolecidae</i>).....	67
3.1.1	<i>In vivo</i> -Emission von N ₂ O durch neuseeländische Regenwürmer.....	67
3.1.1.1	<i>In vivo</i> -Emission von N ₂ O unter <i>in situ</i> -Bedingungen.....	67
3.1.1.2	<i>In vivo</i> -Emissionspotential.....	68
3.1.2	N ₂ O-Bildung durch Verdauungstrakte von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i>	71
3.1.3	Diversität von Denitrifikanten im Verdauungstraktinhalt von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> im Vergleich zu den umgebenden Böden auf Basis des strukturellen Genmarkers <i>nosZ</i>	72
3.1.3.1	Erstellung der <i>nosZ</i> Genbibliotheken	72
3.1.3.2	Rarefaction-Analyse von <i>nosZ</i> Gensequenzen.....	73
3.1.3.3	Phylogenetische Analyse von <i>nosZ</i> Gensequenzen	75
3.1.4	Organische Verbindungen im Verdauungstraktinhalt von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> im Vergleich zu den umgebenden Böden	77
3.2	Anaerobe Aktivitäten und assoziierte Mikroorganismen im Verdauungstrakt von europäischen Regenwürmern (<i>Lumbricidae</i>).....	78
3.2.1	<i>In vivo</i> -Emission von NO, N ₂ O und H ₂ durch europäische Regenwürmer.....	78
3.2.2	N ₂ O- und H ₂ -Bildung durch Körperabschnitte von <i>L. terrestris</i>	79
3.2.3	H ₂ -Bildung durch Verdauungstrakte von <i>L. terrestris</i>	81
3.2.4	Hydrogenaseaktivität im Verdauungstraktinhalt von <i>L. terrestris</i>	81
3.2.5	<i>In situ</i> -Bedingungen entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im umgebenden Boden.....	81
3.2.5.1	<i>In situ</i> -Redoxpotential (E_h) und <i>in situ</i> -Konzentrationen von O ₂ , NO _x ⁻ , NO, N ₂ O und H ₂ in <i>L. terrestris</i>	81
3.2.5.2	Wassergehalt entlang des Verdauungstrakts und im Boden	85
3.2.5.3	Proteingehalt entlang des Verdauungstrakts	86

3.2.5.4	Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte entlang des Verdauungstrakts und im Boden.....	86
3.2.5.5	Anorganische Ionen entlang des Verdauungstrakts und im Boden	87
3.2.5.6	Lösliche organische Verbindungen entlang des Verdauungstrakts und im Boden.....	89
3.2.6	Einfluss von Bodennitrat auf die <i>in situ</i>-Konzentration und die <i>in vivo</i>-Emission von N₂O bei <i>L. terrestris</i>.....	90
3.2.7	Eisen(III)-Reduzierer im Verdauungstraktinhalt von <i>A. caliginosa</i> und <i>L. terrestris</i> und im umgebenden Boden.....	93
3.2.8	Gärungsprozesse im Verdauungstraktinhalt von <i>L. terrestris</i> und im umgebenden Boden	96
3.2.8.1	Einfluss von Glucose auf Gärungsprozesse im Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm und im Boden.....	96
3.2.8.2	Einfluss von [¹² C]- und [¹³ C]Glucose auf Gärungsprozesse im Mittel- und Enddarminhalt.....	100
3.2.9	Identifikation von Glucose-verwertenden <i>Bacteria</i> im Mittel- und Enddarminhalt mit Hilfe der 16S rRNA basierten Stablen-Isotopenbeobachtung	104
3.2.9.1	Dichtegradientenzentrifugation	104
3.2.9.2	Auswahl der ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Fraktionen	105
3.2.9.2.1	Verteilung der RNA entlang des Dichtegradienten.....	105
3.2.9.2.2	tRFLP-Analyse	106
3.2.9.3	Erstellung der 16S rRNA Genbibliotheken.....	108
3.2.9.4	Rarefaction-Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen	110
3.2.9.5	Phylogenetische Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen	112
3.2.9.5.1	Identifikation von metabolisch aktiven <i>Bacteria</i>	112
3.2.9.5.2	Identifikation von aktiven Glucose-verwertenden <i>Bacteria</i>	116
4	DISKUSSION	120
4.1	Denitrifikanten-abhängige Emission von N₂O und/oder N₂ als universelles Merkmal von Regenwürmern	120
4.2	Simultane Aktivierung von Denitrifikanten und Gärern im Verdauungstrakt des Regenwurms.....	123
4.3	Gärungsdiversität und dominante Glucose-verwertende <i>Bacteria</i> im Verdauungstrakt des Regenwurms.....	126
4.3.1	Potentielle Gärungsprozesse entlang des Verdauungstrakts.....	126
4.3.2	Evaluierung des experimentellen Ansatzes	132
4.4	Diversität metabolisch aktiver <i>Bacteria</i> im Verdauungstrakt des Regenwurms	134
4.5	Der Regenwurm als mobile Elektronenquelle in belüfteten Böden.....	138

4.6	Schlussfolgerungen und hypothetisches Modell zu den trophischen Beziehungen entlang des Verdauungstrakts	139
4.7	Ausblick	143
5	ZUSAMMENFASSUNG	144
6	SUMMARY	147
7	LITERATURVERZEICHNIS	150
8	DANKSAGUNG	178
9	PUBLIKATIONEN	179
9.1	Tagungsbeiträge	179
9.1.1	Vorträge.....	179
9.1.2	Poster	179
9.2	Primärliteratur und Übersichtsartikel	180
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	182

ABBILDUNGEN, TABELLEN UND GLEICHUNGEN

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Verdauungstrakts eines Regenwurms am Beispiel von <i>L. terrestris</i>	5
Abbildung 2. Hypothetisches Modell zur selektiven Aktivierung von anaeroben Bodenmikroorganismen im Regenwurmverdauungstrakt.....	8
Abbildung 3. Metabolischer Ausgangspunkt charakteristischer Gärungsprodukte, die bei klassischen Gärungen entstehen.	10
Abbildung 4. Redoxkreislauf des Stickstoffs.....	12
Abbildung 5. Untersuchte Regenwurmart.....	20
Abbildung 6. Blaufärbung der Kothaufen von <i>L. terrestris</i> in Abhängigkeit von der Fütterungszeit auf blau gefärbtem Boden.	21
Abbildung 7. Aufbau des Messstandes für Mikrosensormessungen.....	24
Abbildung 8. Reaktion des N ₂ O-Mikrosensors auf die Injektion von N ₂ O in den Vorderdarm von <i>L. terrestris</i>	25
Abbildung 9. Reaktion des NO _x ⁻ -Biosensors auf die Injektion von Nitrat in den Vorderdarm von <i>L. terrestris</i>	26
Abbildung 10. Prinzip der rRNA basierten Stablen-Isotopenbeprobung.....	49
Abbildung 11. Fraktionierung des Gradienten nach der Ultrazentrifugation.....	50
Abbildung 12. <i>In vivo</i> -Emission von N ₂ O durch <i>A. rosea</i> , <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> in Anwesenheit von Nitrit.	69
Abbildung 13. <i>In vivo</i> -Emission von N ₂ O durch <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> in Anwesenheit von Nitrat.....	70
Abbildung 14. Einfluss von Nitrit auf die N ₂ O-Bildung durch Verdauungstrakte von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> in Anwesenheit von Acetylen.....	71
Abbildung 15. Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR potentieller <i>nosZ</i> Genfragmente mit dem Primerpaar nosZ1181F/nosZ1880R (ca. 700 bp).....	72
Abbildung 16. Rarefaction-Analyse der <i>nosZ</i> Aminosäure-Teilsequenzen (196 Aminosäuren) aus Verdauungstraktinhalt von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> sowie aus den umgebenden Böden auf Spezies-Ebene.....	74
Abbildung 17. Phylogenetischer Stammbaum repräsentativer <i>nosZ</i> Aminosäure-Teilsequenzen (196 Aminosäuren).....	77
Abbildung 18. N ₂ O-Bildung durch Regenwurmabschnitte von <i>L. terrestris</i>	80
Abbildung 19. Radiale Mikrosensorprofile für NO _x ⁻ , NO und N ₂ O durch die Vorderdarmregion von <i>L. terrestris</i>	82
Abbildung 20. Radiale Mikrosensorprofile für das Redoxpotential (<i>E_h</i>) sowie für O ₂ , N ₂ O und H ₂ durch die Kropf-/Magenregion von <i>L. terrestris</i>	83
Abbildung 21. <i>In situ</i> -Redoxpotentiale (<i>E_h</i>) entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i>	84
Abbildung 22. <i>In situ</i> -Konzentrationen von N ₂ O und H ₂ entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i>	85

Abbildung 23. Gehalt an Gesamtkohlenstoff (TC), gesamtem organischen Kohlenstoff (TOC) und Gesamtstickstoff (TN) entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im Boden.....	86
Abbildung 24. Nitrat- und Nitritkonzentrationen sowie Ammonium- und Eisen(II)-Konzentrationen entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im Boden.	88
Abbildung 25. Saccharide entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im Boden.	89
Abbildung 26. Organische Säuren entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im Boden.....	90
Abbildung 27. Einfluss von Bodennitrat auf die <i>in situ</i> -Konzentrationen von N ₂ O entlang des Darms von <i>L. terrestris</i>	92
Abbildung 28. Einfluss von Bodennitrat auf die <i>in vivo</i> -Emission von N ₂ O durch <i>L. terrestris</i>	93
Abbildung 29. Lösliche organische Verbindungen in anoxischen MPN-Ansätzen für Eisen(III)-Reduzierer aus Verdauungstraktinhalt von <i>A. caliginosa</i> , <i>L. terrestris</i> und umgebendem Boden.	96
Abbildung 30. Einfluss von Glucose auf die Bildung von N ₂ O, CO ₂ und H ₂ in anoxischen Inkubationen von Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm von <i>L. terrestris</i> und in anoxischen Inkubationen von Boden.	97
Abbildung 31. Einfluss von [¹² C]- und [¹³ C]Glucose auf die Bildung von CO ₂ und H ₂ in anoxischen Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i>	101
Abbildung 32. Bilanzierung der Kohlenstoff- und Elektronenflüsse nach 51 h einer anoxischen Inkubation von Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> mit [¹² C]- bzw. [¹³ C]Glucose.....	103
Abbildung 33. Schwebdichte der fraktionierten CsTFA-Gradientenlösung ohne RNA bei 25 °C nach den Ultrazentrifugationen.....	105
Abbildung 34. Verteilung der RNA aus Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> vor (0 h), während (24 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [¹² C]- bzw. [¹³ C]Glucose entlang des Dichtegradienten.....	106
Abbildung 35. Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR potentieller 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus cDNA der Gradientenfractionen 1 - 11 mit dem Primerpaar 27f-DY681/907r für die tRFLP-Analyse.....	107
Abbildung 36. tRFLP-Analyse der 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus den Gradientenfractionen 1 - 11 nach 24 h bzw. 51 h einer anoxischen Inkubation von Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> mit [¹² C]- bzw. [¹³ C]Glucose.	108
Abbildung 37. Rarefaction-Analyse der 16S rRNA cDNA Sequenzen (700 - 880 bp) aus Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [¹² C]- bzw. [¹³ C]Glucose auf Familien-Ebene.	111
Abbildung 38. Phylogenetische Stammbäume repräsentativer 16S rRNA Gensequenzen (700 - 880 bp) für <i>Firmicutes</i> und <i>Gammaproteobacteria</i>	119
Abbildung 39. Hypothetisches Modell zu den anaeroben mikrobiellen Aktivitäten, assoziierten gärenden Mikroorganismen und potentiellen trophischen Beziehungen entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i>	140

Tabelle 1. Beispiele von Gärungstypen.....	11
Tabelle 2. Parameter der Probenahme­flächen.....	18
Tabelle 3. Parameter der GC-Systeme.....	32
Tabelle 4. Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für verschiedene Gase in Wasser bei verschiedenen Temperaturen.....	34
Tabelle 5. Parameter der HPLC-Systeme.....	35
Tabelle 6. Zusammensetzung des Natronlauge (NaOH)-Gradienten zur Auftrennung von Mono- und Oligosacchariden mittels der HPLC-Anlage von Jasco.....	36
Tabelle 7. Zusammensetzung des Lysozym-Puffers.....	39
Tabelle 8. Zusammensetzung der CsTFA-Gradientenlösung.....	50
Tabelle 9. Position, Sequenz und Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer.....	53
Tabelle 10. Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze für ein Endvolumen von 50 μ l.....	54
Tabelle 11. PCR-Programme.....	55
Tabelle 12. Zusammensetzung des Ligationsansatzes.....	59
Tabelle 13. Zugangsnummern der hinterlegten Sequenzen.....	64
Tabelle 14. Verwendete Gase und ihre Reinheit.....	66
Tabelle 15. <i>In vivo</i> -Emission von N_2O durch neuseeländische Regenwürmer während einer sechs­stündigen Inkubation unter <i>in situ</i> -Bedingungen.....	68
Tabelle 16. Lösliche organische Verbindungen im Verdauungstraktinhalt von <i>L. rubellus</i> und <i>O. multiporus</i> sowie in den umgebenden Böden.....	78
Tabelle 17. H_2 -Bildung durch Regenwurmabschnitte und Hydrogenaseaktivität im Verdauungstraktinhalt von <i>L. terrestris</i>	80
Tabelle 18. Wasser- und Gesamtproteingehalt entlang des Verdauungstrakts von <i>L. terrestris</i> und im Boden.....	85
Tabelle 19. Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Boden vor (0 d) und nach (6 - 9 d) der Zugabe von <i>L. terrestris</i>	91
Tabelle 20. Höchstwahrscheinliche Keimzahlen (MPN) von Eisen(III)-Reduzierern und Glucose-verwertenden Anaerobiern aus Verdauungstraktinhalt von <i>A. caliginosa</i> , <i>L. terrestris</i> und umgebendem Boden.....	94
Tabelle 21. Einfluss von Glucose auf die Bildung von löslichen organischen Verbindungen in anoxischen Inkubationen von Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm von <i>L. terrestris</i> und in anoxischen Inkubationen von Boden.....	99
Tabelle 22. Einfluss von [^{12}C]- und [^{13}C]Glucose auf die Bildung von löslichen organischen Verbindungen in anoxischen Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i>	102
Tabelle 23. Analyse der 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose.....	109
Tabelle 24. Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Mittel- und Enddarminhalt von <i>L. terrestris</i> vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose.....	112

Gleichung 1. Denitrifikation.	14
Gleichung 2. Gesamtstoffmenge eines Gases.	33
Gleichung 3. Stoffmenge eines Gases in der Gasphase.	33
Gleichung 4. Allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase.	33
Gleichung 5. Physikalisch gelöster Anteil eines Gases.	33
Gleichung 6. Chemisch gelöster Anteil eines Gases.	33
Gleichung 7. Spezifische Hydrogenaseaktivität.	40
Gleichung 8. Für die Ligation benötigte Menge an PCR-Produkt.	60
Gleichung 9. Coverage.	63
Gleichung 10. Hurlbert-Formel.	64
Gleichung 11. Mittelwert.	65
Gleichung 12. Standardabweichung.	65
Gleichung 13. Standardfehler.	65
Gleichung 14. Fehlerfortpflanzung bei Addition und Subtraktion von Mittelwerten.	65
Gleichung 15. Fehlerfortpflanzung bei Multiplikation und Division von Mittelwerten.	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(g)	gasförmig
[H]	Reduktionsäquivalent
°C	Temperatur in Grad Celsius
¹³ C	stabiles Isotop von Kohlenstoff
A ₂₃₀ , A ₂₆₀ , A ₂₈₀	Absorption bei 230 nm, 260 nm, 280 nm
ad	auffüllen bis
Anammox	anaerobe Ammoniumoxidation
AOA	Ammoniumoxidation durch <i>Archaea</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pairs; Basenpaare
BSA	bovine serum albumine; Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CsTFA	Cäsiumtrifluoracetat
d	day; Tag
d. h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNR	dissimilatorische Nitratreduktion
DNRA	dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E _n	Redoxpotential
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
Fe	Eisen
FG	Frischgewicht

FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Gauge, Außendurchmesser
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	hour; Stunde
H ₂	molekularer Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
He	Helium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
K	Kelvin
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat
l	Liter
LB	Luria Bertani, Nährmedium
LPSN	List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
M	molar (mol pro Liter)
MCS	multiple cloning site; Insertionsstelle
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPN	most probable number; höchstwahrscheinliche Keimzahl
MspI	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Moraxella</i> sp. (ATCC 49670)
<i>n</i>	Stichprobenanzahl, Anzahl der Replikat
N	Stickstoff
<i>n</i>	Stoffmenge
n. a.	nicht anwendbar
n. b.	nicht bestimmt
N ₂	Distickstoff, molekularer Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid, Lachgas
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaNO ₃	Natriumnitrat

NaOH	Natronlauge
<i>nap</i>	Gen der periplasmatischen Nitratreduktase
Nap	Periplasmatische Nitratreduktase
<i>nar</i>	Gen der membrangebundenen Nitratreduktase
Nar	membrangebundene Nitratreduktase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
Nir	Nitritreduktase
<i>nir</i>	Nitritreduktasegen
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
Nor	NO-Reduktase
<i>nor</i>	NO-Reduktasegen
Nos	N ₂ O-Reduktase
<i>nos</i>	N ₂ O-Reduktasegen
NO _x ⁻	Nitrat/Nitrit
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm
OTU	operational taxonomic unit; künstliche taxonomische Einheit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PCR-H ₂ O	partikelfreies Wasser
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppb	parts per billion; Teile pro Milliarde Teile
ppm	parts per million; Teile pro Million Teile
r ²	Bestimmtheitsmaß
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid; ribosomale RNA
RT-PCR	reverse Transkription von RNA in cDNA
s	Sekunde
SIP	stable isotope probing; Stabile-Isotopenbeprobung
SLP	substrate level phosphorylation; Substratkettenphosphorylierung

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TC	total carbon, Gesamtkohlenstoff
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
T _m	Schmelztemperatur
TN	total nitrogen, Gesamtstickstoff
TOC	total organic carbon, gesamter organischer Kohlenstoff
tRF	terminales Restriktionsfragment
tRFLP	terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	1. units, Aktivitätseinheit bei Enzymen; 2. Umdrehungen
ÜNK	Übernachtkultur
V	1. Volt; 2. Volumen
v. a.	vor allem
v. Chr.	vor Christus
v/v	volume per volume; Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume; Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Regenwürmer

1.1.1 Diversität und geographische Verbreitung

Regenwürmer sind weltweit ein wichtiger Bestandteil der Bodenfauna und können bis zu 90 % der Evertebratenbiomasse in Böden stellen (Lee, 1985; Edwards, 2004b). In nahezu allen Böden - extrem kalte und extrem trockene Regionen ausgenommen - sind Regenwürmer zu finden (Lee und Foster, 1991; Edwards und Bohlen, 1996). In Gartenböden können pro Quadratmeter bis zu 420 Individuen, in Ackerböden bis zu 460, in Waldböden bis zu 1.000 und in Weide- bzw. Wiesenböden bis zu 2.000 Individuen vorkommen (Lee, 1985; Makeschin, 1997).

Taxonomisch betrachtet gehören Regenwürmer zu den *Oligochaeta* (Wenigborster), einer Unterklasse innerhalb der Klasse der *Clitellata* (Gürtelwürmer), die wiederum dem Stamm der *Annelida* (Ringelwürmer) angehören (Storch und Welsch, 2004; Westheide und Rieger, 2007). Weltweit gibt es etwa 3.000 beschriebene Regenwurmarten, die derzeit 23 Familien zugeordnet werden (Graff, 1983; Lee, 1985; Reynolds und Cook, 1993). Zu den artenreichsten Regenwurmfamilien zählen die *Eudrilidae* (Zentralafrika), die *Glossoscolecidae* (Südafrika, Südeuropa sowie Mittel- und Südamerika) und die *Megascolecidae* (Tropen und südliche Hemisphäre). In der nördlichen Hemisphäre ist die Familie der *Lumbricidae* heimisch (Wallwork, 1983; Reynolds und Cook, 1993; Omodeo, 1998; Storch und Welsch, 2004; Westheide und Rieger, 2007). In Deutschland gibt es nach bisherigen Kenntnissen 39 Arten, die alle zur Familie der *Lumbricidae* gehören (Graff, 1983; Buch, 1986). Der bekannteste und auch einer der größten einheimischen Regenwürmer ist *Lumbricus terrestris*, der bis zu 30 cm lang und mehr als 5 g schwer werden kann (Graff, 1983).

Aus ökologischer Sicht sind in Europa, Nordamerika, Australien und Asien die Regenwurmfamilien *Megascolecidae* und *Lumbricidae* am bedeutendsten (Edwards und Bohlen, 1996). Mehr als die Hälfte aller beschriebenen Regenwurmarten (ca. 1.500 Arten) gehören den *Megascolecidae* an. Die *Lumbricidae* umfassen nur ca. 320 beschriebene Arten, sind jedoch aufgrund ihrer inzwischen weltweiten Verbreitung von großer ökologischer Bedeutung. Es wird angenommen, dass die *Lumbricidae* während der letzten 300 bis 400 Jahre durch europäische Siedler in den gemäßigten Regionen der südlichen und nördlichen Hemisphäre verbreitet wurden (Lee, 1985). Die europäischen Regenwürmer wurden dort teils gezielt zur Verbesserung der Bodenqualität eingesetzt, teils unbemerkt im Schiffsballast oder in der Erde von Topf- und Gartenpflanzen mitgeführt (Wallwork, 1983; Lee, 1985;

Edwards und Bohlen, 1996). Im Zuge der Umwandlung von naturbelassenen Gebieten in landwirtschaftlich oder anderweitig für den Menschen nutzbare Flächen verschwanden viele Habitate der häufig hochspezialisierten, einheimischen Regenwurmfauna. Im Gegensatz dazu etablierten sich in den anthropogenen Böden nichtheimische (peregrine) Regenwurmart und breiteten sich dort sehr erfolgreich aus (Lee, 1961; Hendrix *et al.*, 2006). Vor allem auf geografisch isolierten Inseln wie Australien, Neuseeland, Neukaledonien und Papua-Neuguinea führte die Einschleppung gebietsfremder Tierarten zu einer grundlegenden Veränderung der Fauna (Lavelle und Spain, 2001; Nentwig *et al.*, 2004). Beispielsweise dominieren heutzutage in neuseeländischen Acker-, Wiesen- und Weideböden europäische *Lumbricidae*-Arten, während einheimische *Megascolecidae*-Arten nur noch in ungestörten Wald- und Graslandböden unter einer ursprünglichen Vegetationsdecke vorkommen (Lee, 1959a; Lee, 1961; Lee, 1985; Springett, 1992; Springett *et al.*, 1998).

1.1.2 Ökologische Relevanz

Bereits die alten Griechen erkannten die herausragende Bedeutung der Regenwürmer für die Bodenfruchtbarkeit und Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) bezeichnete sie als „Eingeweide der Erde“ (zitiert in Edwards, 2004a). Charles Darwin veröffentlichte im 19. Jahrhundert erste fundierte wissenschaftliche Beobachtungen über den Einfluss der Regenwürmer auf die Bodenentwicklung und war davon fasziniert, dass die gesamte Humusaufgabe bestimmter Böden immer wieder den Verdauungstrakt des Regenwurms passiert (Darwin, 1881). Tatsächlich kann ein Quadratmeter Boden bis zu einen Liter Verdauungstraktinhalt von Regenwürmern enthalten (Drake und Horn, 2007). Im Wesentlichen basiert die bodenbiologische Bedeutung der Regenwürmer auf ihrem Ernährungsverhalten (1.1.3) und ihrer Fähigkeit, Röhren und Gänge im Boden auszubilden (Lee, 1985; Edwards und Bohlen, 1996). Regenwürmer nehmen abgestorbenes Material (Laub, Streu, tote Bodentiere und Kot) zusammen mit mehr oder weniger großen Mengen an Mineralboden in den Verdauungstrakt auf (Judas, 1992; Curry und Schmidt, 2007), wo die organische Substanz gründlich mit Mineralboden und Verdauungsschleim (Mucus) vermischt und teilweise zersetzt wird (Edwards und Bohlen, 1996; Edwards, 2004a). Der Regenwurmkot wird teils in den Röhren, teils an der Bodenoberfläche abgegeben und ist im Vergleich zum umgebenden Boden reich an löslichem organischen Kohlenstoff, Nitrat und Ammonium (Parlé, 1963b; Lee, 1985; Scheu, 1987; Mulongoy und Bedoret, 1989; Tiwari *et al.*, 1989). Ebenso sind die Nährelemente Phosphor, Kalium, Calcium und Magnesium im Wurm Kot deutlich höher konzentriert als im Mineralboden (Graff, 1971; Lee, 1985; Mulongoy und Bedoret, 1989; Tiwari *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 2000). Auf diese Weise gelangen pflanzenverfügbare Nährstoffe in die tieferen, nährstoffarmen Bodenschichten, was zur langfristigen Erhaltung

der natürlichen Bodenfruchtbarkeit beiträgt (Mansell *et al.*, 1981; Devliegher und Verstraete, 1996; Brown *et al.*, 2004; Edwards, 2004a). Im Regenwurmkot bilden sich mit der Zeit Ton-Humus-Komplexe, welche die mineralische und die organische Substanz in äußerst stabilen Bodenaggregaten zusammen halten und dadurch das Risiko einer Verschlammung oder Erosion des Bodens reduzieren (Brown *et al.*, 2000; Scheffer und Schachtschabel, 2002).

Durch ihre Grabaktivitäten fördern Regenwürmer die tiefgründige Durchmischung und Belüftung des Bodens und erhöhen dessen Makroporosität, wodurch sich auch Wasserhalte- und Regenaufnahmefähigkeit des Bodens verbessern (Lee und Foster, 1991; Edwards, 2004a). Die Wände der Grabröhren werden von den Regenwürmern mit Schleim und Kot ausgekleidet und dienen vielen Bodenmikroorganismen als Lebensraum (Edwards und Bohlen, 1996). Weiterhin werden verlassene Röhren häufig von Pflanzenwurzeln für die Nährstoffaufnahme und die Ausbreitung im Boden genutzt (Brown *et al.*, 2000).

Regenwürmer sind außerdem von entscheidender Bedeutung für die Verbreitung und Keimung von Pflanzensamen, welche im Verdauungstrakt über weite Strecken transportiert werden können (Brown *et al.*, 2004; Aira *et al.*, 2009). Vom Regenwurm aufgenommene Samen werden entweder verdaut oder wieder ausgeschieden (Brown *et al.*, 2004; Eisenhauer *et al.*, 2009; Eisenhauer *et al.*, 2010). In letzterem Fall kann sich die Passage durch den Verdauungstrakt positiv (Pearce *et al.*, 1994; Eisenhauer *et al.*, 2009) oder negativ (Grant, 1983; Decaens *et al.*, 2003) auf Viabilität und Keimung der Samen auswirken. Ebenso können auch pflanzenpathogene Pilze und Bakterien von Regenwürmern verdaut oder verbreitet werden (Brown, 1995; Edwards und Bohlen, 1996). Durch die Aufnahme und die Verdauung von Nematoden leisten Regenwürmer einen wichtigen Beitrag zur Reduktion der Pflanzenschädlinge in Böden (Brown, 1995; Brown *et al.*, 2004). Auch wurden im Gewebe und im Kot von Regenwürmern Substanzen (Hormone, Auxine, Cytokinine) gefunden, die das Wachstum von Pflanzen fördern bzw. regulieren (Graff und Makeschin, 1980; Krishnamoorthy und Vajranabhaiah, 1986; Brown *et al.*, 2004).

Weiterhin können die Grabaktivitäten und das Ernährungsverhalten von Regenwürmern sowie die *in situ*-Bedingungen in deren Verdauungstrakt die Emissionen des Treibhausgases Distickstoffmonoxid (N₂O) und von Distickstoff (N₂) durch Böden beeinflussen (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Borken *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2006b; Rizhiya *et al.*, 2007). Regenwürmer können für bis zu 60 % der gesamten N₂O-Emission eines Bodens verantwortlich sein (Karsten, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Borken *et al.*, 2000) und es wird geschätzt, dass weltweit jährlich 3 x 10⁸ kg N₂O von Regenwürmern stammen (Drake und Horn, 2006, 2007).

Aufgrund ihres großen Einflusses auf die physikalischen, chemischen und biologischen Bodenprozesse werden Regenwürmer auch als „Ökosystem-Ingenieure“ bezeichnet (Jones *et al.*, 1994; Lavelle *et al.*, 1997).

1.1.3 Ökologische Gruppen

Regenwürmer stellen unterschiedliche ökologische Ansprüche an ihren Lebensraum, z. B. im Hinblick auf die Besiedlung bestimmter Bodenschichten oder ihre Ernährung. Nach der Klassifikation von Bouché werden Regenwürmer entsprechend ihrer Lebens- und Ernährungsweise in drei ökologische Gruppen (Ökotypen) eingeteilt (Bouché, 1977). Es werden epigäische, endogäische und anözische Regenwürmer unterschieden. Epigäische Regenwürmer (z. B. *Lumbricus rubellus* und *Eisenia foetida*) leben meist in der organischen Auflage auf der Bodenoberfläche und ernähren sich hauptsächlich von Laub und leicht zersetzter Pflanzenstreu (Bouché, 1977; Lee, 1985; Edwards und Bohlen, 1996). Da sie kaum Gangsysteme ausbilden, nehmen sie nur sehr wenig Mineralboden auf. Anözische Arten (z. B. *Lumbricus terrestris* und *Aporrectodea longa*) leben in tieferen Bodenschichten und bilden hauptsächlich vertikale Röhren, die mehrere Meter in die Tiefe reichen können. Ihre Nahrung besteht aus Mineralboden und Streu, die sie von der Bodenoberfläche in ihre Röhren ziehen. Endogäische Regenwürmer (z. B. *Aporrectodea caliginosa* und *Octolasion cyaneum*) leben im oberen Bereich des Mineralbodens. Ihre Gangsysteme bestehen hauptsächlich aus horizontalen Röhren und sie fressen größtenteils Mineralboden, der mit organischem Kohlenstoff (z. B. aus abgestorbenem und bereits stark zersetztem Pflanzenmaterial) angereichert ist. Die Vertreter dieser drei ökologischen Gruppen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Habitats und ihrer Ernährungsstrategie, sondern auch bezüglich anderer Merkmale. Beispielsweise ist die Kutikula der epigäischen Regenwürmer wesentlich stärker pigmentiert als die der endogäischen Regenwürmer. Anözische Regenwürmer sind meist nur am Vorderende pigmentiert (Bouché, 1977; Edwards, 2004a). Weiterhin unterscheiden sich die ökologischen Gruppen in ihrer Darmpassagezeit, welche bei epigäischen Arten wesentlich länger ist als bei endogäischen Arten und bei anözischen Arten stark variiert (Bouché, 1977; Wallwork, 1983; Lee, 1985).

1.1.4 Verdauungssystem

Das Verdauungssystem der Regenwürmer wird in der Literatur meist am Beispiel der *Lumbricidae* (häufig am Beispiel von *L. terrestris*) beschrieben und kann im Wesentlichen auf andere Regenwurmfamilien übertragen werden (Edwards und Bohlen, 1996). Der Verdauungstrakt zieht sich in gerader Form durch die gesamte Länge des Körpers und besteht aus Mundöffnung, Mundhöhle, Pharynx (Schlundkopf), Ösophagus (Speiseröhre), Kropf (Drüsenmagen), Muskelmagen, Darm und Anus (Abbildung 1; Wallwork, 1983; Peters und Walldorf, 1986; Edwards und Bohlen, 1996; Storch und Welsch, 1999; Westheide und Rieger, 2007). Mit dem dorsal stark verdickten Pharynx wird die Nahrung aufgetupft und durch eine Serie von Kontraktionen nach innen gepumpt. Unterstützt wird die Nahrungsaufnahme durch die Saugwirkung der Mundhöhlenwand. Der Pharynx ist dicht mit

Speicheldrüsen besetzt, die polysaccharidhaltigen Mucus sezernieren. Der Mucus erleichtert die Passage der Nahrung durch den Verdauungstrakt und enthält die Verdauungsenzyme Amylase und Protease. Im Ösophagus befinden sich Kalkdrüsen, welche Calciumcarbonat abgeben und dadurch wahrscheinlich an der pH-Regulation im Blut und in der Coelomflüssigkeit beteiligt sind. Auf den Ösophagus folgt der rundliche Kropf, der die aufgenommene Nahrung sammelt, bevor sie im Muskelmagen mit Hilfe der chitinhaltigen Membran mechanisch zerkleinert wird. Durch das Abreiben der Membran werden die in ihr enthaltenen Verdauungsenzyme freigesetzt und mit dem Nahrungsbrei vermischt. Der Darmkanal kann in Vorder-, Mittel- und Enddarm untergliedert werden und dient der eigentlichen Verdauung und Resorption. Die Typhlosolis, eine dorsale Einfaltung von Vorder- und Mitteldarmwand, bewirkt eine Vergrößerung der sezernierenden und resorbierenden Fläche. Durch peristaltische Bewegungen der Muskulatur wird der Nahrungsbrei durch den Darmkanal befördert. Unverdaute Bestandteile werden mit peritrophischen Membranen, die von den Mitteldarmepithelzellen sezerniert werden, umhüllt und als Kotkrümel über den Anus ausgeschieden.

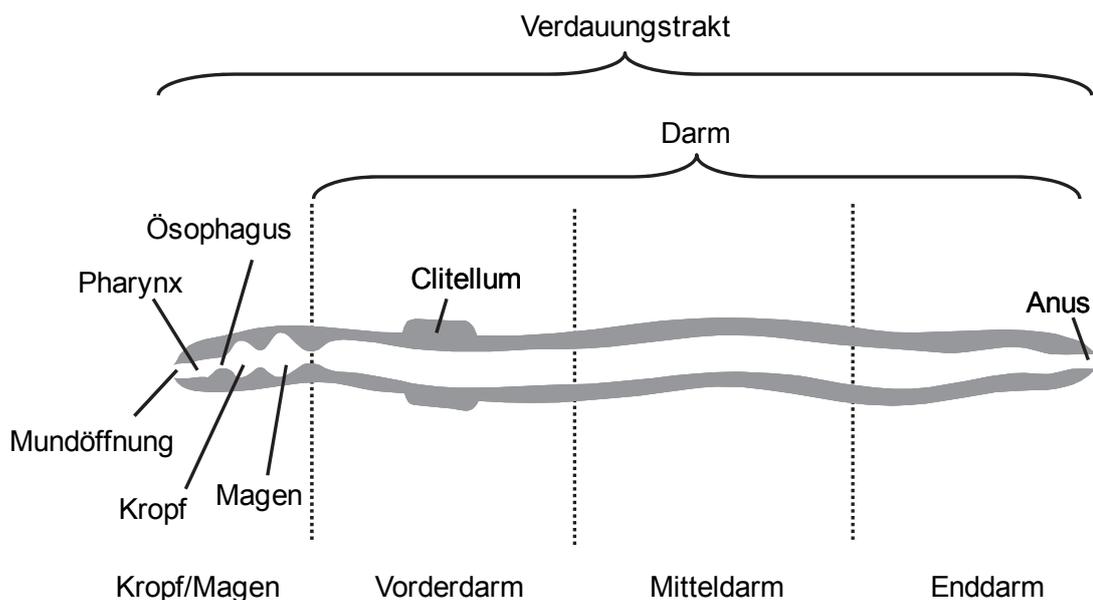


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Verdauungstrakts eines Regenwurms am Beispiel von *L. terrestris* (modifiziert nach Horn *et al.*, 2003b).

Pro Tag können Regenwürmer das 5- bis 8-Fache ihres Körpergewichts an Boden aufnehmen (Curry und Schmidt, 2007). Der Boden ist im Allgemeinen arm an leicht verwertbaren Nährstoffen, weshalb Regenwürmer große Mengen davon umsetzen müssen, um ihren Energiebedarf zu decken (Edwards und Bohlen, 1996). Folglich sind bei endogäischen Regenwürmern, die überwiegend Mineralboden aufnehmen, die Assimilations-

effizienzen mit 1 bis 9 % sehr niedrig (Bolton und Phillipson, 1976; Scheu, 1991; Martin *et al.*, 1992). Für epigäische Regenwürmer, die sich hauptsächlich von kohlenstoffreicher Pflanzenstreu ernähren, sind die Assimilationseffizienzen wesentlich höher und liegen zwischen 30 und 70 % (Dickschen und Topp, 1987; Daniel, 1991).

Die Enzyme Chitinase, Xylanase, Lichenase, Lipase, Phosphatase, Protease, Cellulase und weitere Glucosidasen wurden im Darm verschiedener Regenwurmfamilien nachgewiesen (Tracey, 1951; Heran, 1956; Laverack, 1963; Parlé, 1963a; Urbášek und Chalupsky, 1991; Urbášek und Pižl, 1991; Lattaud *et al.*, 1998; Garvin *et al.*, 2000) und ermöglichen dort die Verdauung von pflanzlichem Material, Nematoden, Pilzen, Protozoen und Bakterien (Brown *et al.*, 2000; Curry und Schmidt, 2007). Das Vorkommen bestimmter Verdauungsenzyme und deren Aktivitäten scheinen dabei an die Ernährungsweise der Regenwürmer angepasst zu sein (Lattaud *et al.*, 1998; Curry und Schmidt, 2007). Ob die Enzyme vom Wurm selbst und/oder von aufgenommenen Mikroorganismen stammen, ist noch nicht vollständig geklärt (Curry und Schmidt, 2007). Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass einige Regenwurmartens eigene Cellulasen sekretieren (Tracey, 1951; Urbášek, 1990; Nozaki *et al.*, 2009), während andere Regenwurmartens auf die Beteiligung von Mikroorganismen am Celluloseabbau angewiesen sind (Urbášek, 1990; Lattaud *et al.*, 1998).

1.1.5 Mikroorganismen im Verdauungstrakt

Die Mikrobiologie im Verdauungstrakt des Regenwurms war und ist Gegenstand zahlreicher Studien (z. B. Bassalik, 1913; Parlé, 1963a; Krištůfek *et al.*, 1993; Karsten und Drake, 1995; Furlong *et al.*, 2002; Horn *et al.*, 2003b; Singleton *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2004; Drake und Horn, 2006, 2007; Byzov *et al.*, 2009; Depkat-Jakob *et al.*, 2010; Nechitaylo *et al.*, 2010). Während in den Verdauungstrakten von Wiederkäuern und Termiten eine endogene, spezifische Mikrobiota vorzufinden ist, die in speziellen Kompartimenten in enger symbiotischer Assoziation mit dem Wirt lebt und essentiell am Abbau pflanzlichen Materials beteiligt ist (Schultz und Breznak, 1978; Malburg Jr. *et al.*, 1992; Flint, 1997; Brune, 2006; Schlegel und Jannasch, 2006; Janssen und Kirs, 2008; Russell und Moselio, 2009), scheint die Mikrobiota des Regenwurmverdauungstrakts vorwiegend aus aufgenommenen Bodenmikroorganismen zu bestehen (Edwards und Bohlen, 1996; Furlong *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2006a). Zwar gibt es filamentöse Mikroorganismen, die mit dem Darmepithel des Regenwurms assoziiert sind (Jolly *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 2009; Thakuria *et al.*, 2010), diese scheinen jedoch ebenfalls aus dem Boden zu stammen und quantitativ nicht signifikant zu sein (Drake und Horn, 2007; Thakuria *et al.*, 2010).

Aus dem Verdauungstrakt diverser Regenwurmarten wurden bisher Vertreter der *Alphaproteobacteria* (*Sinorhizobium*), *Betaproteobacteria* (*Dechloromonas* und *Ralstonia*) und *Gammaproteobacteria* (*Aeromonas*, *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Vibrio* und *Pseudomonas*) sowie der *Cytophaga-Flavobacteria* (*Flavobacterium*), *Firmicutes* (*Bacillus*, *Clostridium* und *Paenibacillus*) und *Actinobacteria* (*Micromonospora*, *Microbacterium* und *Streptomyces*) isoliert (Citernes *et al.*, 1977; Márialigeti, 1979; Ravasz *et al.*, 1986; Krištůfek *et al.*, 1993; Toyota und Kimura, 2000; Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005; Drake und Horn, 2007; Byzov *et al.*, 2009). Viele dieser Isolate sind Nitrat- bzw. Nitritreduzierer, Denitrifikanten oder Gärer (Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005; Drake und Horn, 2007).

Mit dem Boden aufgenommene Pilzhyphen und Protozoen bilden vermutlich nur einen geringen Anteil der aktiven Mikrobiota im Regenwurmverdauungstrakt, da sie entweder im vorderen Bereich des Verdauungstrakts mechanisch zerkleinert oder während der Darmpassage verdaut werden (Krištůfek *et al.*, 1992; Bonkowski und Schaefer, 1997; Schönholzer *et al.*, 1999; Schönholzer *et al.*, 2002). Ebenso werden bestimmte Mikroorganismengruppen im Regenwurm selektiv verdaut (Drake und Horn, 2007). Dazu können Mikroorganismen gehören, die empfindlich auf bestimmte Bestandteile des Verdauungsschleims reagieren (Khomyakov *et al.*, 2007; Oleynik und Byzov, 2008) oder ein großes Zellvolumen aufweisen und deshalb leicht im Muskelmagen aufgeschlossen werden können (1.1.4; Krištůfek *et al.*, 1992; Clegg *et al.*, 1995; Wolter und Scheu, 1999).

Die Gesamtzellzahlen im Verdauungstrakt von *Lumbricidae*-Arten liegen zwischen 6×10^9 und 2×10^{10} Zellen pro Gramm Trockengewicht und unterscheiden sich nur marginal von den Gesamtzellzahlen der umgebenden Böden (Krištůfek *et al.*, 1995; Schönholzer *et al.*, 1999; Wolter und Scheu, 1999; Drake und Horn, 2007). Demgegenüber ist die Kultivierbarkeit von aeroben und anaeroben Mikroorganismen aus dem Regenwurmverdauungstrakt deutlich erhöht (Parlé, 1963a; Karsten und Drake, 1995; Karsten, 1997; Karsten und Drake, 1997; Ihssen *et al.*, 2003). Beispielsweise sind die Zellzahlen von allgemeinen Anaerobiern und Denitrifikanten im Regenwurmverdauungstrakt bis zu drei Zehnerpotenzen höher als im Boden (Drake und Horn, 2007).

Der Verdauungstrakt des Regenwurms gilt als „mutualistisches Verdauungssystem“, in welchem mit der Nahrung aufgenommene Bodenmikroorganismen durch den leicht verwertbaren Kohlenstoff des sekretierten Verdauungsschleims stimuliert werden und durch die Produktion von Exoenzymen den Abbau von organischer Substanz unterstützen (Barois und Lavelle, 1986; Lavelle *et al.*, 1995; Trigo *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000). Belüftete Böden sind im Hinblick auf das Nährstoffangebot, die Wasseraktivität und den pH-Wert ein heterogener Lebensraum, in welchem die Aktivitäten anaerober Bodenmikroorganismen auf die anoxischen Mikrozonen in den Bodenaggregaten beschränkt sind (Lavelle und Spain, 2001). Im Gegensatz dazu sind die *in situ*-Bedingungen des Regenwurmverdauungstrakts

äußerst konstant und bieten ideale Voraussetzungen für Bodenanaerobier, die zusammen mit der Nahrung in den Verdauungstrakt gelangen (Abbildung 2; Horn *et al.*, 2003b; Drake und Horn, 2006, 2007). Sauerstofffreie Bedingungen, ein nahezu neutraler pH-Wert, ein hoher Wassergehalt sowie hohe Konzentrationen an organischen Verbindungen führen zur Aktivierung von aufgenommenen anaeroben Bodenmikroorganismen.

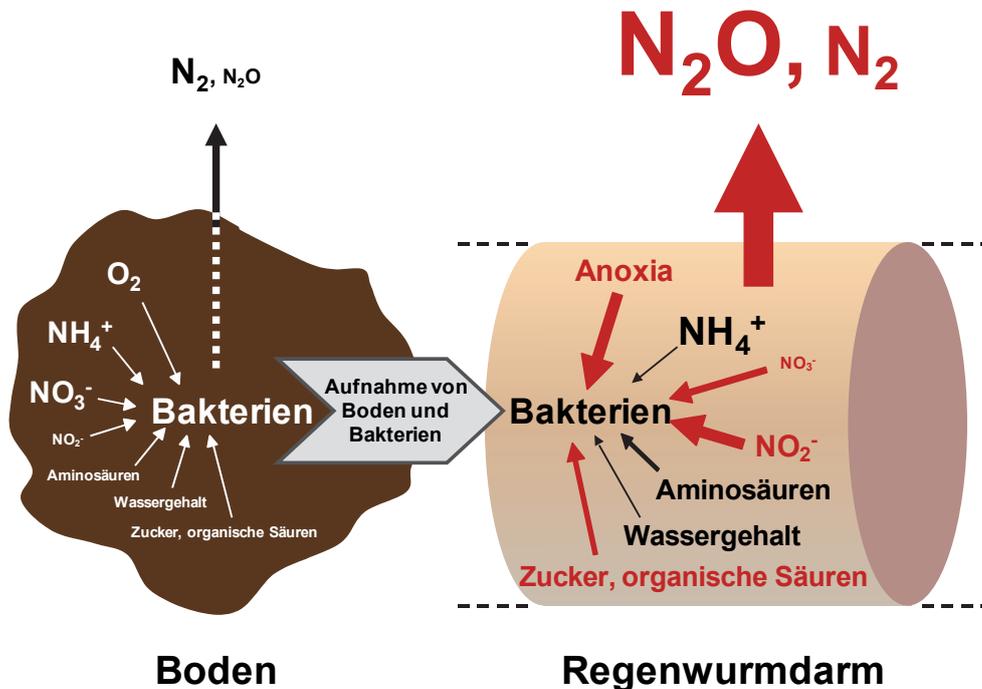


Abbildung 2. Hypothetisches Modell zur selektiven Aktivierung von anaeroben Bodenmikroorganismen im Regenwurmverdauungstrakt (modifiziert nach Drake und Horn, 2007). Die relativen Konzentrationen der Verbindungen sind durch die Schriftgröße angedeutet; die Pfeilstärken symbolisieren den Effekt auf die Bildung von N_2O und N_2 .

Die Emission von N_2O und N_2 durch Regenwürmer ist auf die synergistische Aktivität von aufgenommenen Denitrifikanten sowie nitrat- und nitritreduzierenden Mikroorganismen zurückzuführen (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2003b; Ihssen *et al.*, 2003; Horn, 2004; Horn *et al.*, 2006b). Bisherige Erkenntnisse sprechen dafür, dass Nitrat im Regenwurmverdauungstrakt größtenteils zu N_2O oder N_2 und nicht zu Ammonium umgesetzt wird (Ihssen *et al.*, 2003). Obwohl die *in situ*-Bedingungen des Regenwurmverdauungstrakts Acetogene (Drake *et al.*, 2006) und Methanogene (Whitman *et al.*, 2006) begünstigen sollten, scheinen diese im Verdauungstrakt weder aktiviert zu werden noch metabolisch relevant zu sein (Hornor und Mitchell, 1981; Karsten und Drake, 1995). Demgegenüber sind gärende Mikroorganismen im Verdauungstrakt des Regenwurms abundant (Karsten und Drake, 1997; Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005). Weiterhin deuten hohe Konzentrationen von Sacchariden (z. B. bis zu 100 mM Glucose [Horn *et al.*, 2003b]),

Aminosäuren und organischen Säuren (z. B. Formiat, Acetat, Succinat und Lactat) darauf hin, dass diverse Gärungsprozesse im Regenwurmverdauungstrakt hoch aktiv sind (Drake und Horn, 2007).

1.2 Gärung (Fermentation)

Kohlenstoff (C) ist Hauptbestandteil aller Klassen von Makromolekülen und kann bis zu 50 % des Trockengewichts einer Zelle bilden (Madigan *et al.*, 2009). Im Kohlenstoff-Kreislauf erfüllen Mikroorganismen eine bedeutende Funktion, da sie den in organischen Verbindungen gespeicherten Kohlenstoff in Kohlendioxid (CO₂) zurückführen (Fuchs, 2007). Tatsächlich ist der mikrobielle Abbau von organischer Substanz die mengenmäßig bedeutendste Quelle für in die Atmosphäre freigesetztes CO₂ (Madigan *et al.*, 2009).

Wenn weder Sauerstoff (O₂) noch alternative Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Nitrat oder Eisen(III) vorhanden sind, wird ein Großteil des Kohlenstoffs durch Gärung (Fermentation) abgebaut (McInerney und Bryant, 1981). Viele Gärer sekretieren Exoenzyme, die Biopolymere zu vergärbaren Verbindungen hydrolysieren (Winkelman, 1992; Fuchs, 2007). Die eigentliche Gärung findet im Cytosol statt und ist ein intern ausgeglichener Oxidations-Reduktionsprozess, bei dem Kohlenstoff aus derselben organischen Verbindung teilweise oxidiert und teilweise reduziert wird (White, 2007). Gärer benötigen daher keinen exogenen Elektronenakzeptor (Madigan *et al.*, 2009). Bei der Gärung vollzieht sich die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) im Allgemeinen durch Substratkettenphosphorylierung („substrate level phosphorylation“, SLP) - ein Mechanismus, bei dem die Energie instabiler Zwischenprodukte der Gärung in der Bildung von Phosphorsäureanhydridbindungen zwischen Phosphatresten und ADP konserviert wird (Thauer *et al.*, 1977). Die Fähigkeit, Energie über Gärungsprozesse zu gewinnen, ist bei *Eukarya*, *Archaea* und *Bacteria* weit verbreitet (Skinner, 1975), wobei die eukaryotischen Gärer auf wenige Substrate beschränkt sind (Madigan *et al.*, 2009). Prokaryotische Gärer, d. h. obligate Anaerobier und fakultative Aerobier, können dagegen ein breites Spektrum an Substraten vergären (Tabelle 1). Dazu zählen Saccharide, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Lipide, Glycerin oder aromatische Verbindungen (Winkelman, 1992; Madigan *et al.*, 2009). Eine für die Gärung bedeutende Substratgruppe sind die Saccharide, welche hauptsächlich über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) oder den Entner-Doudoroff-Weg (2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat [KDPG]-Weg) zu Pyruvat (dargestellt durch den Pfeil zwischen C₆ und C₃ in Abbildung 3) und abschließend zu Gärungsprodukten umgewandelt werden.

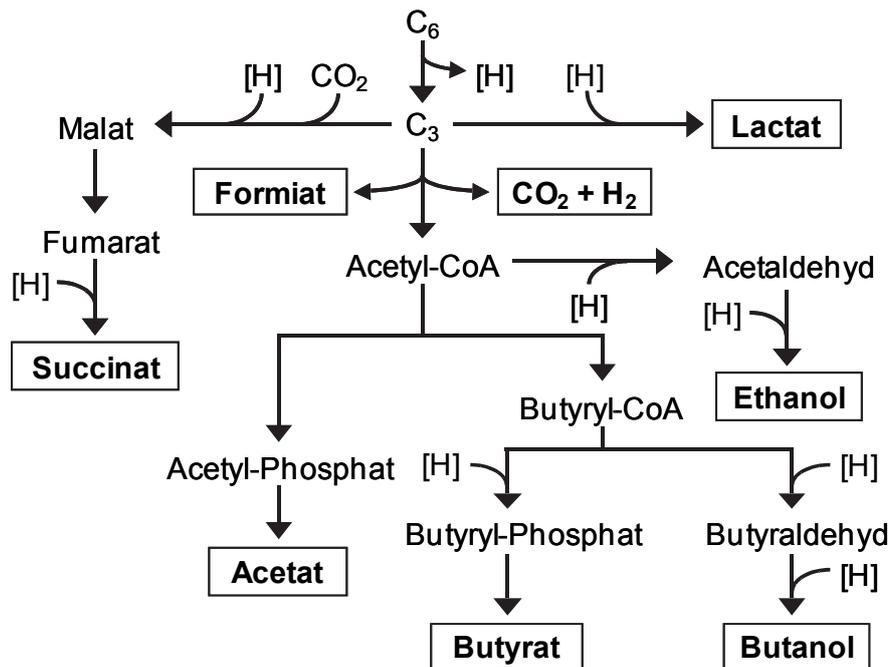


Abbildung 3. Metabolischer Ausgangspunkt charakteristischer Gärungsprodukte (umrahmt), die bei klassischen Gärungen entstehen (basierend auf Informationen von Gottschalk, 1986; Buckel, 2005; Dürre, 2005). Die gebildeten Produkte sind abhängig von den *in situ*-Bedingungen und dem Mikroorganismus. C₆, Hexosen; C₃, Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat; CoA, Coenzym A; [H], Reduktionsäquivalente.

Klassische Vergärungen von Glucose führen zur Bildung von einem (z. B. heterofermentative Milchsäuregärung), zwei (z. B. homofermentative Milchsäuregärung) oder drei ATPs (z. B. Buttersäuregärung) (Gottschalk, 1986). Bei der anaeroben Verwertung von Glucose werden aufgrund der geringen ATP-Ausbeute etwa 90 % der Glucose zur ATP-Synthese und nur 10 % zur Biosynthese von Zellmasse eingesetzt (Antranikian, 2006). Charakteristische Gärungsprodukte sind diverse organische Säuren sowie Kohlendioxid (CO₂) und molekularer Wasserstoff (H₂) (Abbildung 3 und Tabelle 1). Diese primären Gärungsprodukte werden ausgeschieden und dienen anderen (sekundären) Gärern als Substrat (McInerney und Bryant, 1981; Drake *et al.*, 2009). Beispielsweise entsteht bei der Vergärung von Lactat über den Methylmalonyl-CoA-Weg (z. B. bei Propionibakterien [Stackebrandt und Schaal, 2006]) oder den Acrylyl-CoA-Weg (z. B. bei Clostridien [Wiegel *et al.*, 2006]) Propionat als Hauptgärungsprodukt (Tabelle 1). Auch andere Organismengruppen, wie Denitrifikanten (1.3.2.1; Knowles, 1982; Tiedje, 1988), Acetogene (Drake *et al.*, 2006; Drake *et al.*, 2008), Methanogene (Zinder, 1993; Drake *et al.*, 2009) oder Eisen(III)-Reduzierer (Lovley, 2006) können bestimmte Gärungsprodukte umsetzen.

Tabelle 1. Beispiele von Gärungstypen (basierend auf Informationen von Gottschalk, 1986; McInerney, 1988; Bott, 1997; Schlegel und Jannasch, 2006; Fuchs, 2007; Madigan et al., 2009).

Gärungstyp	Produkte	Beispielorganismen und -gattungen
Alkoholische Gärung	Ethanol, CO ₂	<i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Saccharomyces</i>
Propionsäuregärung	Propionat, Acetat, CO ₂	<i>Clostridium propionicum</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Propionibacterium</i>
Gemischte Säuregärung	Ethanol, 2,3-Butandiol, Succinat, Lactat, Acetat, Formiat, H ₂ , CO ₂	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>
Buttersäuregärung	Butyrat, Acetat, H ₂ , CO ₂	<i>Clostridium butyricum</i>
Homofermentative Milchsäuregärung	Lactat	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Heterofermentative Milchsäuregärung	Lactat, Ethanol, CO ₂	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>Bifidobacterium</i> -Gärung	Acetat, Lactat	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Stickland-Gärung	Organische Säure, NH ₃ , H ₂	<i>Clostridium bifermentans</i> , <i>Clostridium sticklandii</i>
Vergärung von Citrat	Acetat, Formiat, Hydrogencarbonat	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Vergärung von Succinat	Propionat, Hydrogencarbonat	<i>Propionigenium modestum</i>
Vergärung von Alanin	Propionat, Acetat, CO ₂	<i>Clostridium propionicum</i>
Vergärung von Glutamat	Acetat, Butyrat, CO ₂ , H ₂ , NH ₃	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
Vergärung von Isoleucin	2-Methylbutyrat, CO ₂ , NH ₃	<i>Spirochaeta isovalerica</i>
Vergärung von Lysin	Acetat, Butyrat, NH ₃	<i>Clostridium subterminale</i>
Vergärung von Valin	Isobutyrat, CO ₂ , NH ₃	<i>Spirochaeta isovalerica</i>

Gärer spielen beim Abbau organischer Substanz in anoxischen Habitaten eine zentrale Rolle und kommen in Sedimenten (Lovley und Klug, 1982; Köpke et al., 2005; Müller et al., 2008), Reisfeldböden (Chin et al., 1998; Chidthaisong und Conrad, 2000), Moorböden (Hamberger et al., 2008; Drake et al., 2009; Wüst et al., 2009) sowie im Pansen von Wiederkäuern (Malburg Jr. et al., 1992; Flint, 1997; Schlegel und Jannasch, 2006) und in Verdauungstrakten von anderen Tieren sowie Menschen (Kane, 1997; Schlegel und Jannasch, 2006; Egert et al., 2007; Louis und Flint, 2009) vor.

1.3 Nitratreduzierende Prozesse

Nach Kohlenstoff ist Stickstoff (N) das am häufigsten in der Zelle vorkommende Element (Madigan *et al.*, 2009). Stickstoff ist essentieller Bestandteil von Aminosäuren, Proteinen, Nukleinsäuren und anderen wichtigen Zellkomponenten (Rudolf und Kroneck, 2005). In der Natur treten Stickstoffverbindungen in den Oxidationsstufen +V (wie in Nitrat) bis -III (wie in Ammonium) auf (Abbildung 4). Die Stickstoffverbindungen sind hierbei ständigen Umbildungsprozessen unterworfen, die fast ausschließlich von Mikroorganismen katalysiert werden (Rudolf und Kroneck, 2005). Die mikrobiellen Prozesse der Stickstofftransformation sind immer noch nicht vollständig aufgeklärt (Jetten, 2008). So wurden erst in den vergangenen Jahren die anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox [Strous *et al.*, 1999]) sowie die Ammoniumoxidation durch *Archaea* (AOA [Kalachniuk *et al.*, 1994; Könneke *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2007]) entdeckt.

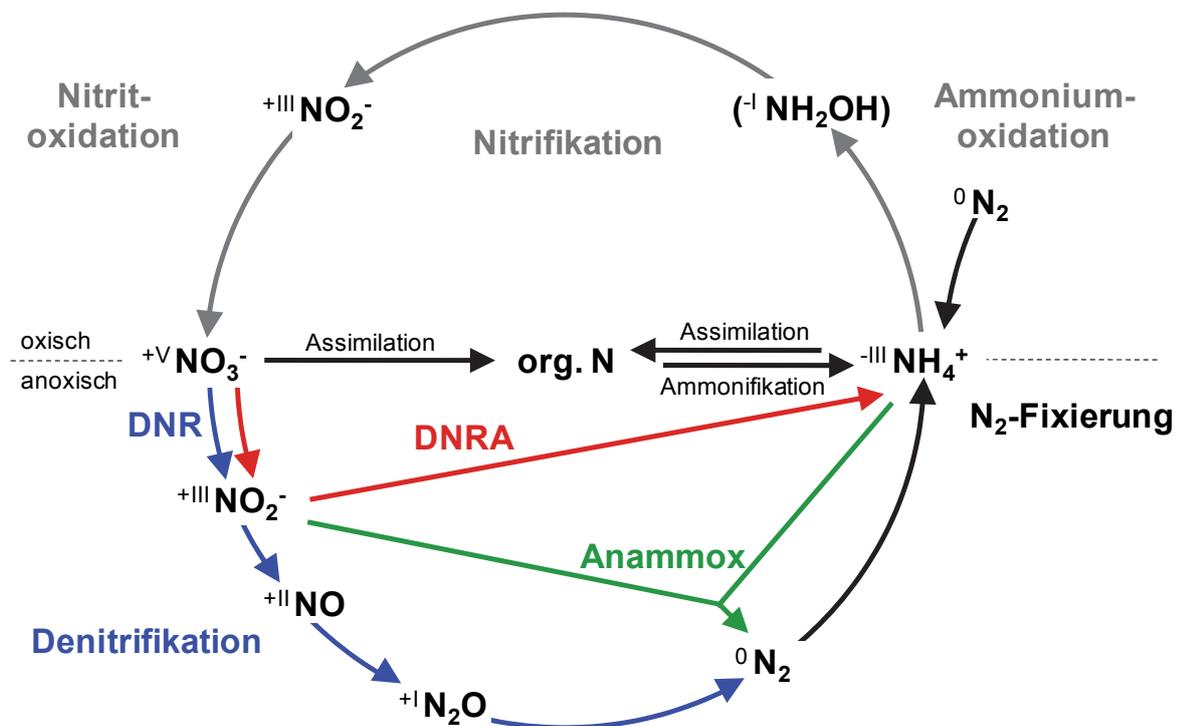


Abbildung 4. Redoxkreislauf des Stickstoffs (modifiziert nach Schramm, 2003; Zumft und Kroneck, 2007; Madigan *et al.*, 2009). Nitritoxidation und Ammoniumoxidation bilden zusammen die Nitrifikation. DNR, dissimilatorische Nitratreduktion; DNRA, dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium; Anammox, anaerobe Ammoniumoxidation; NO_3^- , Nitrat; NO_2^- , Nitrit; NO , Stickstoffmonoxid; N_2O , Distickstoffmonoxid; N_2 , Distickstoff; NH_4^+ , Ammonium; (NH_2OH), Hydroxylamin (intrazelluläres Intermediat). Römische Ziffern geben die Oxidationszahl des Stickstoffs in der jeweiligen Verbindung an.

Die Nitratreduktion spielt eine Schlüsselrolle im Stickstoffkreislauf (Abbildung 4), denn sie ist der Ausgangspunkt dreier grundlegend verschiedener Stoffwechselwege: der assimilatorischen Nitratreduktion, der Denitrifikation und der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) (Tiedje, 1988; Zumft, 1997; Rudolf und Kroneck, 2005; Richardson *et al.*, 2007).

1.3.1 Assimilatorische Nitratreduktion

Die assimilatorische Nitratreduktion über Nitrit zu Ammonium (Abbildung 4) dient der Biosynthese von stickstoffhaltigen Verbindungen und ist bei Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Pflanzen verbreitet (Rudolf und Kroneck, 2005). Die Expression der beteiligten Enzyme wird nur bei Stickstoffmangel induziert und erfolgt unabhängig von der O₂-Versorgung der Zellen (Tiedje, 1988; Fuchs, 2007). Bei Prokaryoten wird die assimilatorische Nitratreduktion durch zwei im Cytoplasma lokalisierte Enzyme katalysiert. Die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit wird von der assimilatorischen Nitratreduktase (Nas) durchgeführt. Nitrit wird daraufhin von der assimilatorischen Nitritreduktase (Nir) in einem sechs-Elektronen-Schritt zu Ammonium reduziert, welches dann zur Synthese von Glutamin, der ersten organischen Stickstoffverbindung, zur Verfügung steht (Stolz und Basu, 2002).

1.3.2 Dissimilatorische Nitratreduktion

Im Gegensatz zur assimilatorischen Nitratreduktion dienen die Prozesse der dissimilatorischen Nitratreduktion vornehmlich der Konservierung von Energie unter anoxischen Bedingungen und sind bis auf wenige Ausnahmen auf Prokaryoten beschränkt (Zumft, 1997; Stolz und Basu, 2002).

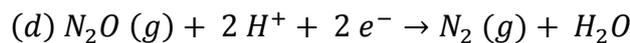
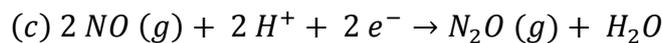
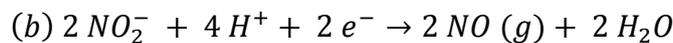
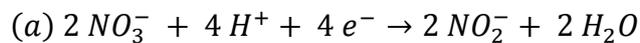
Die dissimilatorische Reduktion von Nitrat zu Nitrit wird entweder von der membrangebundenen (*narGHI*-kodierten) Nitratreduktase oder der periplasmatischen (*napAB*-kodierten) Nitratreduktase katalysiert (Zumft, 1997; Richardson *et al.*, 2007). Nitratreduzierer und Denitrifikanten können nur eine der beiden Nitratreduktasen oder aber beide Enzyme besitzen (Philippot, 2005). Das gebildete Nitrit wird entweder ausgeschieden oder in gasförmige Stickstoffverbindungen überführt (Denitrifikation) oder zu Ammonium reduziert (DNRA) (Zumft, 1997). Im Regelfall sind Prokaryoten entweder zur Denitrifikation oder zur DNRA fähig (Zumft, 1997).

1.3.2.1 Denitrifikation

Die Denitrifikation ist der Hauptweg, auf welchem freier Stickstoff biogen gebildet wird (Madigan *et al.*, 2009), und umfasst die sequentielle Reduktion von Nitrat (NO₃⁻) über Nitrit (NO₂⁻), Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (N₂O) zu Distickstoff (N₂) (Gleichung 1; Zumft, 1997). Nahezu alle Denitrifikanten sind fakultative Aerobier und bevorzugen O₂ als

terminalen Elektronenakzeptor (Shapleigh, 2006). Nur wenn kein O₂ verfügbar und eine anorganische N-Quelle in Form von Nitrat und/oder Nitrit vorhanden ist, werden die Denitrifikationsenzyme exprimiert (Zumft, 1997; Baker *et al.*, 1998). In diesem Fall nutzen Denitrifikanten die positiven Redoxpotentiale von Nitrat, Nitrit, NO und N₂O zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Cytoplasmamembran und konservieren über die Elektronentransportkettenphosphorylierung Energie (Rudolf und Kroneck, 2005). Nicht alle Organismen sind im Besitz der vollständigen Elektronentransportkette. Als Denitrifikanten werden nur diejenigen bezeichnet, die Nitrit zu einer gasförmigen Stickstoffverbindung (d. h. N₂O oder N₂) reduzieren können (Zumft, 1997; Rudolf und Kroneck, 2005; Shapleigh, 2006).

Gleichung 1. Denitrifikation (Zumft, 1997).



(g), gasförmig.

Die für die einzelnen Schritte verantwortlichen Enzyme sind die Nitratreduktasen (Gleichung 1a, 1.3.2), Nitritreduktasen (Gleichung 1b), NO-Reduktasen (Gleichung 1c) und N₂O-Reduktasen (Gleichung 1d). Die Nitritreduktasen sind die Schlüsselenzyme der Denitrifikation, da sie den Übergang von Nitrit zu NO (Gleichung 1b), der ersten gasförmigen Stickstoffverbindung, katalysieren (Zumft, 1997). Die Nitritreduktion wird entweder von einer Kupfer (*nirK*-kodierten)- oder einer Cytochrom *cd1* (*nirS*-kodierten)-abhängigen Nitritreduktase durchgeführt (Rinaldo und Cutruzzolà, 2007). Beide Enzyme sind im Periplasma lokalisiert und können ebenfalls O₂ reduzieren. Welche der beiden Nitritreduktasen eingesetzt wird, ist nicht phylogenetisch festgelegt. Beide Nitritreduktasen können bei Vertretern derselben Gattung gefunden werden, jedoch nie gleichzeitig in derselben Zelle auftreten (Shapleigh, 2006). Die Reduktion von NO zu N₂O (Gleichung 1c) findet an der Außenseite der Cytoplasmamembran statt und wird durch die membranständige (*norCB*-kodierte) NO-Reduktase katalysiert. Der letzte Schritt der Denitrifikation, die Umwandlung von N₂O zu N₂ (Gleichung 1d), wird von der periplasmatischen (*nosZ*-kodierte) N₂O-Reduktase durchgeführt. Die meisten N₂O-Reduktasen werden durch Acetylen gehemmt (Yoshinari und Knowles, 1976), sodass der Anteil an gebildetem N₂ ebenfalls als N₂O frei wird. Daher wird Acetylen häufig zur Bestimmung der kompletten Denitrifikationsaktivität eingesetzt (Tiedje, 1988).

Signalmoleküle bei der Regulation der Denitrifikation sind O_2 , Nitrat, Nitrit und NO . Die N_2O -Reduktase Nos wird im Vergleich zu den anderen Denitrifikationsenzymen verzögert exprimiert, was auf die sequentielle Induktion der Denitrifikationsgene hinweist (Van Spanning *et al.*, 2007). Intermediate der Denitrifikation können akkumulieren, wenn ein Denitrifikationsenzym fehlt (siehe oben) oder die Kinetik der Denitrifikation limitiert wird. Letzteres tritt ein, wenn im Vergleich zu den verfügbaren Elektronenakzeptoren zu wenige Elektronendonatoren zur Verfügung stehen, die Denitrifikationsbedingungen zu kurz andauern oder saure Bedingungen herrschen (Tiedje, 1988; Thomsen *et al.*, 1994; Baumann *et al.*, 1996; Stevens *et al.*, 1998). Beispielsweise erhöht sich der Anteil an gebildetem N_2O bei einem pH-Wert < 7 (Simek und Cooper, 2002; Cuhel *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010), was auf eine Inhibierung der N_2O -Reduktase bei niedrigem pH zurückgeführt werden kann (Weier und Gilliam, 1986; Kesik *et al.*, 2006; Zumft und Körner, 2007).

Die meisten Denitrifikanten sind organotroph und nutzen Zucker und/oder organische Säuren als Kohlenstoff- und Energiequelle (Tiedje, 1988; Shapleigh, 2006). Einige Denitrifikanten können zudem durch Fermentation wachsen. Dazu zählen *Wollinella succinogenes*, *Azospirillum* sp., *Chromobacterium* sp. und *Bacillus* sp. Es gibt aber auch lithotrophe und phototrophe Denitrifikanten (Tiedje, 1988).

Aus phylogenetischer Sicht ist die Gruppe der denitrifizierenden Mikroorganismen äußerst divers und auf viele unterschiedliche Gruppen verteilt. Viele Denitrifikanten sind unter den gramnegativen Bakterien, vor allem innerhalb der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, zu finden. Die Fähigkeit zur Denitrifikation besitzen aber auch viele grampositive Bakterien, z. B. *Bacilli*-Arten und Vertreter der *Actinobacteria* (Tiedje, 1988; Shapleigh, 2006). Unter mikrooxygenen Bedingungen können auch Nitrifizierer durch die Reduktion von Nitrit N_2O und N_2 bilden (Poth und Focht, 1985). Ebenso können einige *Archaea*, darunter die Gattungen *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Ferroglobus* und *Pyrobaculum* denitrifizieren (Cabello *et al.*, 2004; Shapleigh, 2006). Auch einige Pilze wie z. B. *Fusarium oxysporum* und *Cylindrocarpum tonkinense* besitzen die Fähigkeit, Nitrat oder Nitrit zu gasförmigen Stickstoffverbindungen zu reduzieren (Saddler *et al.*, 1983; Shoun und Tanimoto, 1991; Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997). Die Denitrifikationsenzyme der Pilze sind ähnlich zu denen der Bakterien und in den Mitochondrien lokalisiert (Kobayashi *et al.*, 1996; Takaya *et al.*, 2003). Das Endprodukt ist meist N_2O (Zumft, 1997).

Da die Fähigkeit zur Denitrifikation in einer Vielzahl taxonomischer Gruppen verbreitet ist, sind 16S rRNA-basierte Methoden nicht für die Diversitätsanalyse von Denitrifikanten geeignet. Vielmehr werden zu diesem Zweck Markergene eingesetzt, die für verschiedene am Prozess der Denitrifikation beteiligte Enzyme kodieren (Bothe *et al.*, 2000; Philippot und Hallin, 2005). Bisher wurden Primer für die Gene *narG* (Gregory *et al.*, 2000; Philippot *et al.*, 2002), *narH* (Petri und Imhoff, 2000), *napA* (Flanagan *et al.*, 1999), *nirK/nirS* (Braker *et al.*,

1998; Hallin und Lindgren, 1999), *norB* (Braker und Tiedje, 2003) und *nosZ* (Scala und Kerkhof, 1998; Rich *et al.*, 2003; Throbäck *et al.*, 2004) entwickelt.

Der Prozess der Denitrifikation ist in Böden, Sedimenten, Abwassersystemen, Kläranlagen sowie in aquatischen und marinen Habitaten weit verbreitet (z. B. Focht und Chang, 1975; Sørensen, 1978; Schramm *et al.*, 1999; Inwood *et al.*, 2007; Enwall und Hallin, 2009; Palmer *et al.*, 2010) und weist zudem eine hohe ökologische Relevanz auf. Durch Denitrifikation entsteht das Treibhausgas N₂O, dessen Klimaerwärmungspotential etwa 300 x höher ist als das von CO₂ (Forster *et al.*, 2007; Wuebbles, 2009). In der oberen Stratosphäre ist N₂O wesentlich an der Zerstörung der Ozonschicht beteiligt (Ravishankara *et al.*, 2009; Wuebbles, 2009). In der Abwasserbehandlung wird die Denitrifikation gezielt zur Stickstoffentfernung eingesetzt; den landwirtschaftlich genutzten Böden werden durch Denitrifikation pflanzlich verfügbare N-Quellen entzogen (Fuchs, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA)

Die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium dient neben der Energiekonservierung der Detoxifikation von in der Zelle akkumuliertem Nitrit und der Bereitstellung von Ammonium für die Biosynthese. Zunächst wird Nitrat unter Konservierung von Energie zu Nitrit umgesetzt (1.3.2). Nitrit wird im Anschluss zu Ammonium reduziert, ohne dass weitere Intermediate freigesetzt werden. Dieser Schritt wird entweder von einer membrangebundenen (*nrfA*-kodierten) oder einer cytoplasmatischen (*nirb*-kodierten) Nitritreduktase katalysiert. Nur NrfA koppelt die Nitritreduktion an die Konservierung von Energie, weshalb dieser Prozess auch als respiratorische Ammonifikation bezeichnet wird (Simon, 2002; Fuchs, 2007). Als Elektronendonatoren dienen dabei häufig H₂ und Formiat. Bei der Reduktion mit NirB (fermentative Ammonifikation) dient Nitrit hingegen in erster Linie als Elektronensenke (Simon, 2002). Während die membrangebundene respiratorische Nitritreduktase nur unter anoxischen Bedingungen exprimiert wird, ist die periplasmatische Nitritreduktase auch in Gegenwart von O₂ aktiv (Shapleigh, 2006). Als Nebenprodukt der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium kann auch N₂O entstehen, das vermutlich durch eine unspezifische Reaktion von Nitrit mit einer Nitratreduktase gebildet wird (Bleakley und Tiedje, 1982; Smith, 1983).

Der Prozess der dissimilatorischen Nitratreduktion kann in anoxischen Habitaten mit leicht verfügbaren organischen Kohlenstoffquellen, wie z. B. in anoxischen Sedimenten, Klärschlamm und dem Pansen, eine bedeutende Rolle spielen (Kaspar und Tiedje, 1981; Kaspar *et al.*, 1981; Tiedje, 1988; Binnerup *et al.*, 1992; Kelso *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur Denitrifikation findet man die dissimilatorische Nitratreduktion zu Nitrit und/oder Ammonium häufig bei Mikroorganismen mit einem fermentativen Stoffwechsel. Dazu gehören viele Gattungen der fakultativ aeroben *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*,

Citrobacter, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* und *Erwinia*), aber auch obligate Anaerobier wie *Clostridium* sp., *Wollinella succinogenes*, *Veillonella alcalescens*, *Selenomonas ruminantium* und *Desulfovibrio* sp., sowie einige *Bacillus*-Arten (Tiedje, 1988).

1.4 Hypothesen und Zielsetzung

Das interdisziplinäre Promotionsprojekt beschäftigt sich mit dem Einfluss von Regenwürmern auf den Kohlenstoff- und den Stickstoffkreislauf in belüfteten Böden. Die Emission von N_2O und N_2 durch europäische Regenwürmer ist vor allem auf die Aktivität von in den Verdauungstrakt aufgenommenen Boden-Denitrifikanten zurückzuführen. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Emission von N_2O ein allgemeingültiges Merkmal von Regenwürmern ist und ob diese Eigenschaft unabhängig von deren taxonomischen Einordnung und geografischen Verbreitung auftritt. Die anoxische kohlenstoffreiche Umgebung im Verdauungstrakt des Regenwurms bietet zudem ideale Bedingungen für gärende Mikroorganismen. Bislang ist jedoch nicht vollständig geklärt, welche Gärungsprozesse im Verdauungstrakt relevant sind und welche Mikroorganismen am Abbau organischer Substanz im Verdauungstrakt des Regenwurms beteiligt sind.

Der vorliegenden Arbeit lagen daher folgende Hypothesen und Ziele zugrunde:

1. Die *in vivo*-Emission von N_2O aufgrund von Denitrifikation im Verdauungstrakt ist ein universelles Merkmal von Regenwürmern.
 - Analyse von neuseeländischen Regenwürmern (*Megascolecidae* und *Lumbricidae*) hinsichtlich (a) der Emission von N_2O unter *in situ*-Bedingungen und (b) des N_2O -Emissionspotentials.
 - Vergleichende Analyse der Diversität potentieller Denitrifikanten aus dem Verdauungstrakt von neuseeländischen Regenwürmern und aus dem Boden.
2. Die *in situ*-Bedingungen im Verdauungstrakt von europäischen Regenwürmern (*Lumbricidae*) aktivieren neben der Denitrifikation auch Gärungen.
 - Charakterisierung der *in situ*-Parameter entlang des Verdauungstrakts.
 - Identifikation von anaeroben Prozessen des Kohlenstoff- und Stickstoffkreislaufs entlang des Verdauungstrakts.
 - Identifikation von metabolisch aktiven und Glucose-verwertenden *Bacteria* aus dem Verdauungstrakt des Regenwurms.

2 MATERIAL UND METHODEN

Unter Anwendung eines breiten Methodenspektrums sollte ein möglichst umfassendes Bild der mikrobiellen Kohlenstoff- und Stickstofftransformationen im Verdauungstrakt des Regenwurms gewonnen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen daher prozessorientierte Inkubationsversuche, physikalisch-chemische Analytik, *in situ*-Messungen mit Mikrosensoren sowie mikrobiologische und molekularbiologische Methoden zum Einsatz.

2.1 Standorte und Probenahme

Regenwürmer und Bodenproben wurden in Bayreuth (Deutschland) und Palmerston North (Neuseeland) gesammelt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Parameter der Probenahmeflächen. ^a

	Probenahmefläche ^b , Art der Fläche		
	TW, Wiese	PS, Wiese	FS, Wald
Ort	Bayreuth, Deutschland	Palmerston North, Neuseeland	Palmerston North, Neuseeland
Koordinaten	49°55'41"N, 11°31'52"O	40° 23'27"S, 175°37'20"O	40°22'57"S, 175°37'07"O
pH (H ₂ O)	6,8 ± 0,1	5,8 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Wassergehalt (%)	31,6 ± 6,3	25,5 ± 0,7	33,2 ± 1,7
NH ₄ ⁺ (μmol l [Wassergehalt] ⁻¹) ^c	50,0 ± 28,1	11,4 ± 1,4	10,4 ± 1,6
NO ₃ ⁻ (μmol l [Wassergehalt] ⁻¹) ^c	280,0 ± 123,4	17,3 ± 12,0	73,5 ± 6,9
NO ₂ ⁻ (μmol l [Wassergehalt] ⁻¹) ^c	40,0 ± 12,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
TC (mg g _{TG} ⁻¹) ^d	41 ± 11	24 ± 1	38 ± 7
TOC (mg g _{TG} ⁻¹) ^d	30 ± 7	23 ± 1	37 ± 7
TN (mg g _{TG} ⁻¹) ^d	4 ± 1	2 ± 0	4 ± 0
Referenz	Horn <i>et al.</i> , 2003b	diese Arbeit	diese Arbeit

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei bis fünf Replikaten (± Standardabweichung).

^b TW, „Trafo Wiese“; PS, „Pasture Soil“; FS, „Forest Soil“.

^c bezogen auf den Wassergehalt des Bodens.

^d TC, Gesamtkohlenstoff („total carbon“); TOC, gesamter organischer Kohlenstoff („total organic carbon“); TN, Gesamtstickstoff („total nitrogen“); bezogen auf das Trockengewicht (TG) des Bodens.

An mehreren zufällig ausgewählten Stellen wurden Erdblocke mit einem Spaten ausgehoben und vorsichtig zerteilt. Regenwürmer wurden in abgedunkelten, mit Boden gefüllten Gefäßen und Bodenproben in sterilen Plastikgefäßen transportiert. Regenwürmer und Bodenproben wurden bei 15 °C im Dunkeln aufbewahrt. Für mikrobiologische Untersuchungen wurden die Proben steril entnommen und im Labor sofort weiterverarbeitet. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die Proben steril entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2 Untersuchte Regenwurmart

Die Bestimmung der Regenwürmer erfolgte nach Betäubung mit Ethanol (40 %) mit Hilfe von Standardliteratur (Abbildung 5; Lee, 1959b; Schaefer, 2000). In Wiesenboden der Probenahme­fläche TW in Bayreuth (Tabelle 2) wurden die Arten *Aporrectodea caliginosa* und *Lumbricus terrestris* in 10 - 20 cm Tiefe gefunden. Regenwürmer der Art *L. terrestris* wurden meist in großer Stückzahl benötigt und in diesem Fall käuflich erworben (ANZO Fachgeschäft, Bayreuth oder Aqua Center, Mainleus; beide Deutschland). Die gekauften Würmer wurden vor Versuchsbeginn für mindestens fünf Tage in frischem Boden der Probenahme­fläche TW bei 15 °C im Dunkeln gehalten. In Palmerston North wurden in Wiesenboden der Probenahme­fläche PS (Tabelle 2) *Aporrectodea rosea* und *Lumbricus rubellus* in 0 - 5 cm Tiefe gefunden, während *Octochaetus multiporus* und *Octolasion cyaneum* aus Waldboden der Probenahme­fläche FS in 20 - 30 cm Tiefe stammten.

***Aporrectodea caliginosa*** (SAVIGNY)

Familie: *Lumbricidae*
 Ökolog. Gruppe: endogäisch
 Länge: 6 - 17 cm
 heimisch in: Europa

***Aporrectodea rosea*** (SAVIGNY)

Familie: *Lumbricidae*
 Ökolog. Gruppe: endogäisch
 Länge: 2 - 8 cm
 heimisch in: Europa

***Lumbricus rubellus*** (HOFFMEISTER)

Familie: *Lumbricidae*
 Ökolog. Gruppe: epigäisch
 Länge: 7 - 15 cm
 heimisch in: Europa

***Lumbricus terrestris*** (LINNÉ)

Familie: *Lumbricidae*
 Ökolog. Gruppe: anözisch
 Länge: 9 - 30 cm
 heimisch in: Europa

***Octochaetus multiporus*** (BEDDARD)

Familie: *Megascolecidae*
 Ökolog. Gruppe: endogäisch
 Länge: 18 - 30 cm
 heimisch in: Neuseeland

***Octolasion cyaneum*** (SAVIGNY)

Familie: *Lumbricidae*
 Ökolog. Gruppe: endogäisch
 Länge: 6 - 18 cm
 heimisch in: Europa

Abbildung 5. Untersuchte Regenwurmarten. Die Fotografien zeigen Regenwürmer, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Informationen zu den einzelnen Arten wurden der Standardliteratur (Lee, 1959b; Edwards und Bohlen, 1996; Schaefer, 2000) entnommen.

2.3 Bestimmung der Darmpassagezeit

Die Darmpassagezeit bezeichnet den Zeitraum, den der Boden von der Aufnahme durch die Mundöffnung bis zur Ausscheidung durch den Anus benötigt (Hartenstein *et al.*, 1981). Zur Abschätzung der Fitness und Fressaktivität der käuflich erworbenen *L. terrestris* wurde die durchschnittliche Darmpassagezeit bestimmt (Hartenstein *et al.*, 1981). Die Würmer wurden mit doppelt entsalztem Wasser (ddH₂O) gewaschen und auf frischen Boden der Probenahme fläche TW (Tabelle 2) gesetzt. Zwei Tage später wurden die Würmer ausgegraben und auf blau gefärbten Boden (2 g Coomassie Brilliantblau R pro kg Boden) umgesetzt. Nach 6 h wurden im 1-h-Takt jeweils drei Würmer ausgegraben und zur kompletten Entleerung auf Petri-Schalen gesetzt. Die Fütterungszeit auf blau gefärbtem Boden, die für die Blaufärbung von mindestens 95 % aller Kothaufen nötig war, wurde als Darmpassagezeit definiert. Nach elfstündiger Haltung auf blau gefärbtem Boden waren die Kothaufen erstmals zu mehr als 95 % blau gefärbt (Abbildung 6). Die daraus resultierende Darmpassagezeit von 11 h für käuflich erworbene *L. terrestris* entspricht der Darmpassagezeit von feldfrischen *L. terrestris* (Hartenstein und Amico, 1983). Käuflich erworbene *L. terrestris*, die für mindestens zwei Tage auf feldfrischem Boden gehalten wurden, wiesen folglich eine ähnliche Fitness und Fressaktivität wie feldfrische Würmer auf.

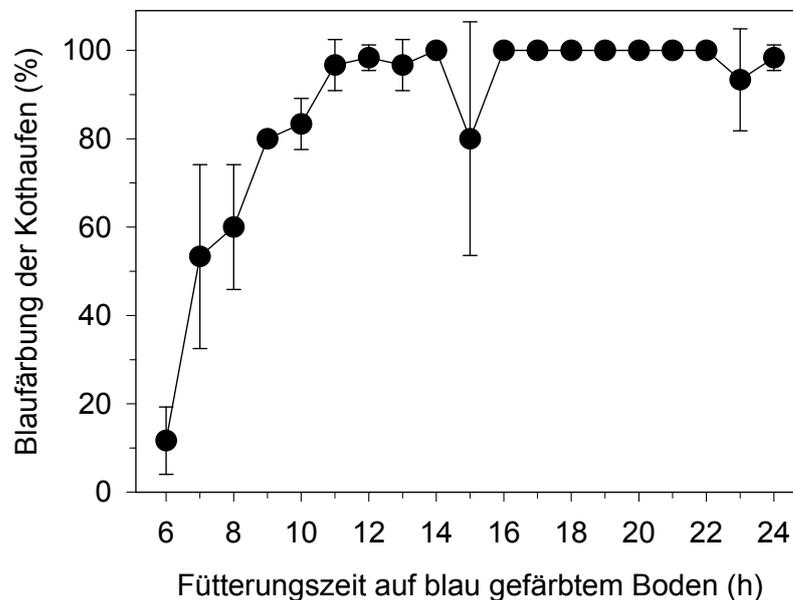


Abbildung 6. Blaufärbung der Kothaufen von *L. terrestris* in Abhängigkeit von der Fütterungszeit auf blau gefärbtem Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (\pm Standardabweichung).

2.4 Mikrosensormessungen

2.4.1 Allgemein

Mikrosensoren ermöglichen die Messung physikalisch-chemischer Parameter mit einer hohen räumlichen Auflösung in einer annähernd ungestörten Mikroumwelt (Revsbech und Jørgensen, 1986). Amperometrische Mikrosensoren messen den Stromfluss, der durch eine elektrochemische Reaktion (Oxidation oder Reduktion) eines Analyten in der Sensorspitze entsteht; potentiometrische Sensoren messen Spannungsdifferenzen zwischen einer Arbeits- und einer Referenzelektrode (Schramm, 2006). Mikrobiosensoren kombinieren amperometrische Mikrosensoren mit einer biologischen Komponente (z. B. immobilisierte Enzyme oder aktive Bakterienzellen), die eine für den Mikrosensor nicht detektierbare Verbindung in eine detektierbare Verbindung umwandelt (Schramm, 2006). Die amperometrischen Mikrosensoren für H_2 (Witty, 1991), N_2O (Andersen *et al.*, 2001), NO (Schreiber *et al.*, 2008) und O_2 (Revsbech *et al.*, 1989) waren miniaturisierte Clark-Elektroden (Clark *et al.*, 1953) mit einer internen Referenzelektrode und einer Schutzkathode bzw. -anode. Der Biosensor zur Messung von Nitrat/Nitrit (NO_x^-) bestand aus einem amperometrischen N_2O -Mikrosensor, dem eine Reaktionskammer mit denitrifizierenden, N_2O -Reduktase-negativen Bakterien vorgelagert war (Larsen *et al.*, 1997). Die potentiometrischen Mikrosensoren zur Messung des Redoxpotentials waren miniaturisierte Platinelektroden (Revsbech und Jørgensen, 1986). Alle Sensoren wiesen einen Spitzendurchmesser $< 25 \mu m$ auf.

In Bayreuth wurden alle Messungen mit Mikrosensoren von Unisense (Århus, Dänemark) durchgeführt. Die Mikrosensoren wurden an einen Mikromanipulator (Märtzhäuser, Wetzlar, Deutschland) montiert, der eine präzise Bewegung der Mikrosensoren in horizontaler und vertikaler Richtung ermöglichte (Abbildung 7A-C). Die Position des Sensors wurde mit einem Stereomikroskop (Wild Heerbrugg M8 Zoom, Gais, Schweiz) überprüft (Abbildung 7D). Amperometrische Mikrosensoren wurden mit einem Picoammeter (PA2000, Unisense, Århus, Dänemark) polarisiert. Die Signale wurden mit einem Schreiber (Goerz Servogor 110, Kipp & Zonen, Reichenbach, Deutschland) aufgezeichnet. Potentiometrische Mikrosensoren wurden zusammen mit einer $Ag/AgCl$ -Referenzelektrode an einen mV-Meter mit integriertem A/D-Wandler (Unisense, Århus, Dänemark) angeschlossen, der mit einem Computer verbunden war. Die Signale wurden mit der Software SensorTrace Basic 2.0 (Unisense, Århus, Dänemark) aufgezeichnet. Die Mikrosensoren wurden unmittelbar vor jeder Messung und unter Berücksichtigung der Raumtemperatur kalibriert. Die Kalibration von N_2O -Mikrosensoren erfolgte in ddH_2O durch stufenweise Zugabe von N_2O -gesättigtem ddH_2O (27,05 mM bei 20 °C). O_2 -Mikrosensoren wurden in N_2 - und luftgesättigter Saline (0,9 % NaCl) kalibriert und H_2 -Mikrosensoren wurden in Saline (0,9 % NaCl) durch stufenweise

Zugabe von H₂-gesättigtem ddH₂O (0,813 mM bei 20 °C) kalibriert. Für die Kalibration der Redoxelektroden wurden Chinhydron-Redoxpufferlösungen (1000 ml Pufferlösung pH 4 bzw. pH 7, 10 g Chinhydron) verwendet. Entsprechend der gebräuchlichen Vorgehensweise wurde das Redoxpotential in Bezug zur Norm-Wasserstoff-Elektrode angegeben (E_h), deren Standardredoxpotential E_0 als 0 mV definiert ist (Mortimer, 2001). Die Umrechnung wurde automatisch bei Durchführung der Kalibration vorgenommen.

Die NO-Mikrosensoren und NO_x⁻-Biosensoren wurden von Frank Schreiber (AG Mikrosensoren, Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen) konstruiert. Die entsprechenden Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Frank Schreiber am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt. Der Aufbau des Messstandes war wie oben beschrieben. Jedoch wurde der Mikromanipulator über einen Motor angetrieben (VT-80 Lineartisch, Micos, Eschbach, Deutschland; mit einem 3564-K-024-BC Motor, Faulhaber Group, Schönaich, Deutschland) und über die Software μ -Profilier (Max-Planck-Innovation GmbH, München, Deutschland) gesteuert. Die Signale wurden mit einem Datenaufnahmesystem (DAQCard-AI-16XE-50, National Instruments, Austin, TX, USA) und der Software μ -Profilier aufgezeichnet. Die Kalibration der NO-Mikrosensoren und Biosensoren erfolgte in anoxischem Natrium-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,3 bzw. pH 6,8) durch stufenweise Zugabe einer NO- bzw. Natriumnitrat (NaNO₃)-Stammlösung.

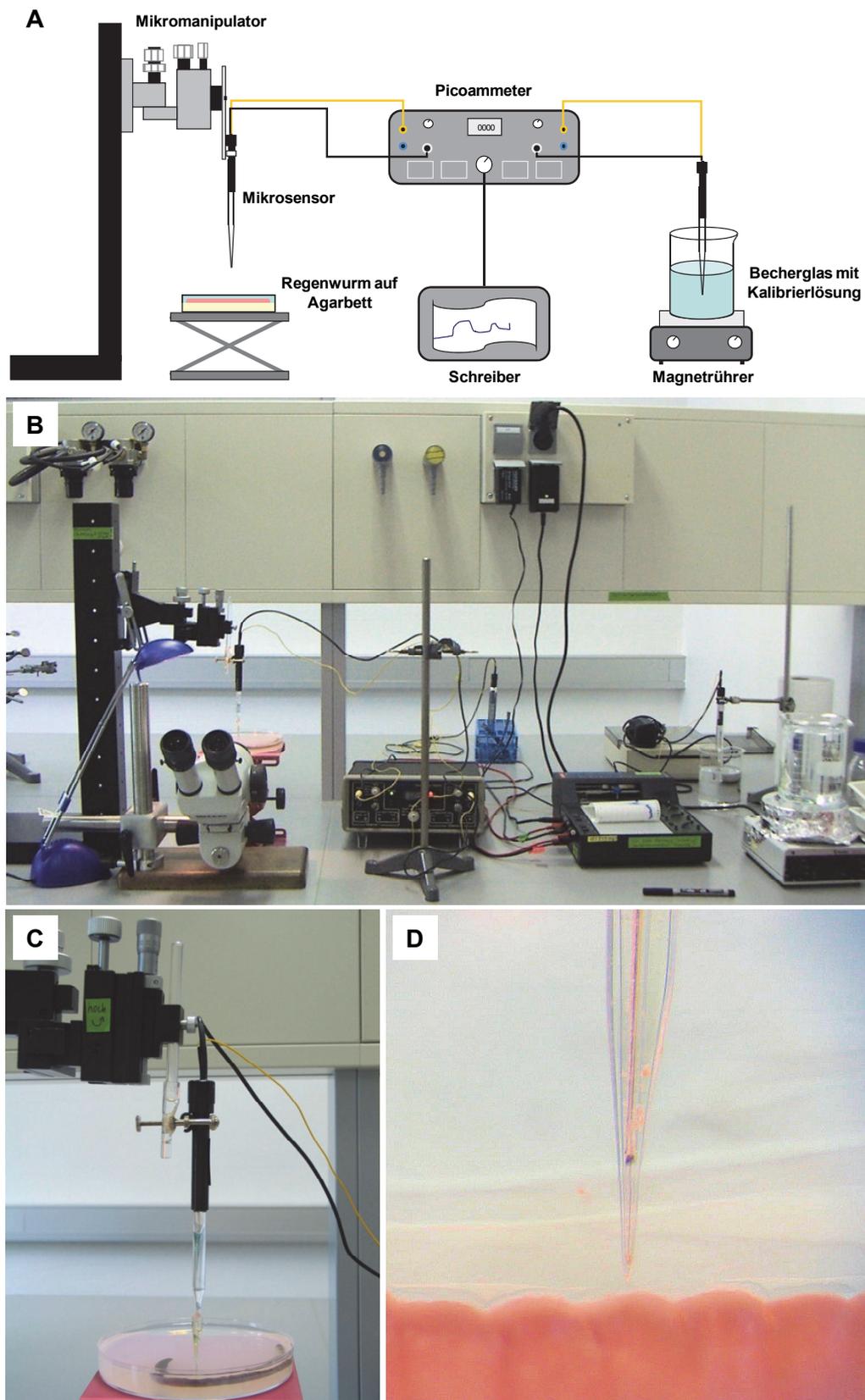


Abbildung 7. Aufbau des Messstandes für Mikrosensormessungen. Schematische Zeichnung (A; modifiziert nach Unisense, 2010) und Fotografie (B) am Beispiel eines amperometrischen Mikrosensors. N_2O -Mikrosensor auf der Oberfläche eines sedierten *L. terrestris* (C und D).

2.4.2 Messungen in Regenwürmern

Mittels Mikrosensormessungen wurden das *in situ*- E_h und die *in situ*-Konzentrationen von H_2 , NO_x^- , NO , N_2O , und O_2 im Regenwurm *L. terrestris* bestimmt. Um eine Entleerung des Darms zu verhindern, wurden die Regenwürmer zuerst für 5 min mit CO_2 (100 %) begast und anschließend für 20 min mit Ethanol (20 %) betäubt. Die Regenwürmer wurden in einer Petrischale auf eine Agarschicht (1,5 %) gelegt und mit Agar und ddH_2O (für die Messung von NO_x^- , NO und N_2O) oder Agar und Saline (0,9 % NaCl) (für die Messung von H_2 , O_2 und E_h) überschichtet (Abbildung 7C und D). Es wurden radiale Konzentrationsprofile für Kropf/Magen, Vorderdarm, Mitteldarm und Enddarm des Regenwurms (Abbildung 1) gemessen. Alternativ wurden Zweipunkt-Messungen an der Wurmoberfläche und im Wurmzentrum durchgeführt und die Differenz der beiden Werte als *in situ*-Konzentration im Verdauungstrakt angegeben.

In Vorversuchen wurden N_2O - und NO_x^- -Mikrosensoren exemplarisch auf ihre Funktionstüchtigkeit im Regenwurm hin überprüft und deren Reaktion auf Konzentrationsänderungen der Analyten getestet. Hierfür wurden die Mikrosensortippen im Zentrum des Vorderdarms von *L. terrestris* positioniert. Mit einer Hamilton-Spritze wurde ein definiertes Volumen von N_2O -gesättigtem ddH_2O bzw. einer $NaNO_3$ -Stammlösung in den Vorderdarm injiziert und die Signaländerung mit zunehmender Zeit verfolgt (Abbildung 8 und Abbildung 9).

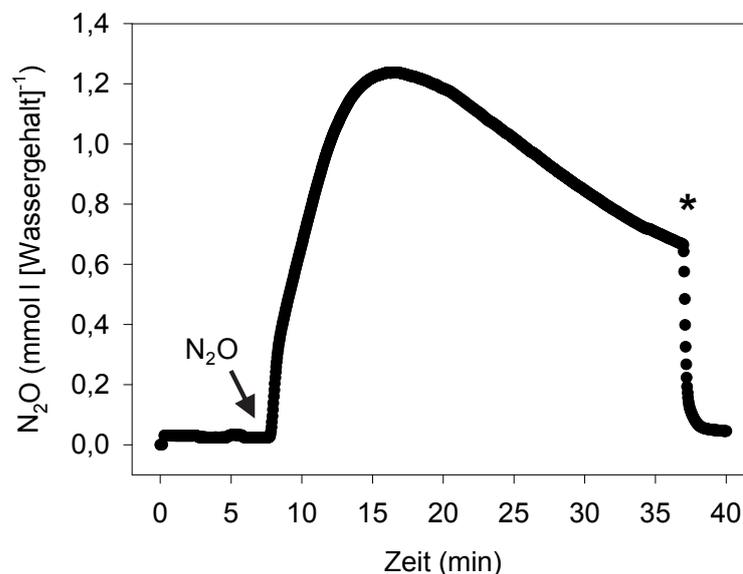


Abbildung 8. Reaktion des N_2O -Mikrosensors auf die Injektion von N_2O in den Vorderdarm von *L. terrestris*. Der Pfeil markiert die Injektion von 10 μ l N_2O -gesättigtem ddH_2O (27,05 mM bei 20 °C) in das Wurmzentrum. Der Stern markiert die Entnahme des Mikrosensors aus dem Wurm.

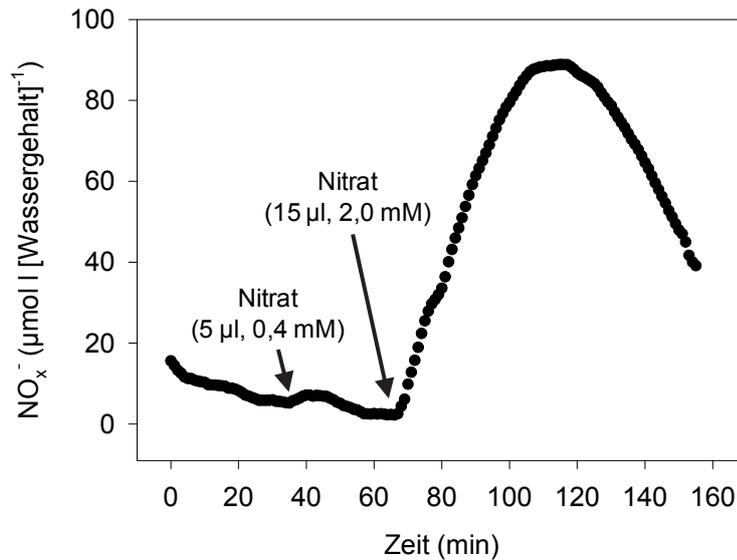


Abbildung 9. Reaktion des NO_x⁻-Biosensors auf die Injektion von Nitrat in den Vorderdarm von *L. terrestris*. Die Pfeile markieren die Injektionen von unterschiedlich konzentrierten NaNO₃-Lösungen (0,4 mM bzw. 2,0 mM) in das Wurmzentrum.

Der N₂O-Mikrosensor sprach ohne zeitliche Verzögerung auf die Injektion von 10 μl N₂O-gesättigtem ddH₂O und die damit erhöhte Konzentration von N₂O an und reagierte ebenfalls sofort auf die niedrigen N₂O-Konzentrationen außerhalb des Wurms (Abbildung 8). Auch der NO_x⁻-Biosensor sprach direkt auf die Injektion von 5 μl NaNO₃-Lösung (0,4 mM) an (Abbildung 9). Nach der Injektion von 15 μl NaNO₃-Lösung (2,0 mM) dauerte es jedoch länger (ca. 30 min), bis der Biosensor ein stabiles Signal lieferte. Möglicherweise wird bei hohen Nitratkonzentrationen eine längere Zeit benötigt, bis das Nitrat vollständig durch die Membran in die Reaktionskammer diffundiert und/oder von den denitrifizierenden Bakterien zu N₂O umgesetzt wird. Mit beiden Mikrosensoren wurde eine Abnahme des jeweiligen Analyten mit zunehmender Zeit beobachtet. Mögliche Gründe für die Abnahme der Nitrat- und N₂O-Konzentrationen im Vorderdarm könnten Diffusion und/oder mikrobielle Stickstofftransformationen wie Denitrifikation und dissimilatorische Nitratreduktion sein.

2.4.3 Messungen in Wurmkammern

Mikrosensoren wurden auch eingesetzt, um die *in situ*-Konzentrationen von N₂O und O₂ in Wurmrohren und Kothaufen zu bestimmen. Hierfür wurden Regenwürmer (*L. terrestris*) in Wurmkammern aus Acrylglas (30 cm x 20 cm x 1,5 cm bzw. 30 cm x 30 cm x 3 cm; Mechanische Werkstatt der Universität Bayreuth) gesetzt. Die Würmer wurden für ein bis drei Tage in den Wurmkammern bei 15 °C im Dunkeln gehalten, wo sie ein Röhrensystem ausbildeten. Die Signalschwankungen der Mikrosensoren waren an der Luft wesentlich höher als in den Kalibrierlösungen und überdeckten die durch Konzentrationsunterschiede

verursachten Signaländerungen. Daher war die Messung von N_2O und O_2 in Wurmröhren und Kothaufen nicht möglich.

2.5 Inkubationsversuche (Mikrokosmen)

Zur Bestimmung des Denitrifikations- und Gärungspotentials wurden verschiedene prozessorientierte Inkubationsversuche mit Regenwürmern, Regenwurmabschnitten, Verdauungstrakten, Verdauungstraktinhalten und Boden durchgeführt.

2.5.1 Regenwürmer

Die Regenwürmer (*A. caliginosa*, *A. rosea*, *L. rubellus*, *L. terrestris*, *O. cyaneum* und *O. multiporus*; Abbildung 5) wurden mit sterilem ddH_2O gewaschen, abgetupft und gewogen. Die Würmer wurden in Serumflaschen (verschiedene Volumina; CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) überführt und unter oxischen Bedingungen im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Wurmgröße wurden ein Wurm oder mehrere Würmer in einer Serumflasche inkubiert. Die Mikrokosmen wurden in mindestens drei Replikaten angesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden 0,1 - 5 ml der Gasphase entnommen, um die Konzentration von H_2 und/oder N_2O zu bestimmen (2.6.5).

Zur Bestimmung des Denitrifikationspotentials wurden die Würmer mit ca. 0,4 ml einer sterilen Natriumnitrat (NaNO_3)- oder Natriumnitrit (NaNO_2)-Lösung (jeweils 2 mM) beträufelt (Matthies *et al.*, 1999) und/oder mit 15 % (v/v) sterilem Acetylen in der Gasphase inkubiert. Acetylen hemmt die N_2O -Reduktase und führt dazu, dass der Anteil an gebildetem N_2 ebenso als N_2O frei wird (Yoshinari und Knowles, 1976).

Um den Einfluss von erhöhten Nitratkonzentrationen im umgebenden Boden auf die N_2O -Bildung im Verdauungstrakt und die N_2O -Emission durch Regenwürmer zu untersuchen, wurden die Würmer (*L. terrestris*) in Boden mit unterschiedlich hohen Nitratkonzentrationen gehalten. Mit einer Sprühflasche wurde sterile NaNO_3 -Lösung (20 mM) auf frischen Boden der Probenahmefläche TW (Tabelle 2) aufgebracht, sodass die Endkonzentrationen im Boden etwa 4 mmol bzw. 6 mmol l (Wassergehalt)⁻¹ betragen. Als Kontrolle diente Boden, dem dasselbe Volumen an sterilem ddH_2O zugegeben wurde. Die Würmer wurden mit sterilem ddH_2O gewaschen, abgetupft, in Bechergläser mit 250 g Boden gesetzt (ein Wurm pro Becherglas) und bei 15 °C im Dunkeln gehalten. Nach sechs bis neun Tagen wurde die Hälfte der Würmer mit sterilem ddH_2O gewaschen, in Serumflaschen überführt und für 3 - 4 h unter oxischen Bedingungen im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1,5 h wurde der Gasphase 15 % (v/v) steriles Acetylen zugesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden 100 μl der Gasphase entnommen, um die Konzentration von N_2O zu messen (2.6.5). Bei der anderen Hälfte der Würmer wurden die *in situ*- N_2O -Konzentrationen im Verdauungstrakt

mittels Mikrosensormessungen ermittelt (2.4.2). Die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit im Boden wurden colorimetrisch bestimmt (2.6.7.3 und 2.6.7.4).

2.5.2 Regenwurmabschnitte

Um die N_2O -Bildung zu lokalisieren und den Anteil der N_2O - und N_2 -Bildung entlang des Regenwurmdarms abzuschätzen, wurden Körperabschnitte von *L. terrestris* (Abbildung 5) separat inkubiert. Die Würmer wurden mit sterilem ddH_2O gewaschen, abgetupft und auf einer sterilen Unterlage für 5 min auf Eis sediert. Unter anoxischen Bedingungen in einer O_2 -freien Kammer (Gasphase 100 % N_2 , Mecaplex, Grenchen, Schweiz) wurden die Würmer in jeweils vier Abschnitte zerteilt, die Kropf/Magen, Vorderdarm, Mitteldarm oder Enddarm enthielten (Abbildung 1). Je zwei Regenwurmabschnitte desselben Bereichs wurden in eine Serumflasche überführt und bei Raumtemperatur unter anoxischen Bedingungen (Gasphase 100 % Argon) für 3 - 4 h inkubiert. Die Hälfte der Wurmabschnitte wurde mit 15 % (v/v) sterilem Acetylen in der Gasphase inkubiert (Yoshinari und Knowles, 1976). Die Mikrokosmen wurden in Triplikaten (durchschnittliches Frischgewicht pro Replikat $2,6 \pm 0,9$ g) angesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden 100 μ l der Gasphase entnommen, um die Konzentration von N_2O zu bestimmen (2.6.5).

2.5.3 Verdauungstrakte

Für die Inkubation von Verdauungstrakten wurden die Regenwürmer (*L. terrestris*, *L. rubellus* und *O. multiporus*; Abbildung 5) mit sterilem ddH_2O gewaschen und durch kurzes Eintauchen in 70 °C heißes ddH_2O getötet (Singleton *et al.*, 2003). Unter anoxischen Bedingungen in einer O_2 -freien Kammer (Gasphase 100 % N_2) wurde der Verdauungstrakt durch einen longitudinalen Schnitt freigelegt und in einem Stück entnommen. In Palmerston North wurden die Verdauungstrakte unter oxischen Bedingungen entnommen, in Serumflaschen gegeben und sofort mit Argon (100 %) begast. Die Mikrokosmen wurden in vier Replikaten (drei bis vier Verdauungstrakte pro Replikat; durchschnittliches Frischgewicht pro Replikat $4,5 \pm 0,8$ g) angesetzt. Die Verdauungstrakte wurden bei Raumtemperatur unter anoxischen Bedingungen (Gasphase 100 % Argon) für 6 - 9 h inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 500 μ l der Gasphase entnommen, um die Konzentration von H_2 (*L. terrestris*) oder N_2O (*L. rubellus* und *O. multiporus*) zu bestimmen (2.6.5).

2.5.4 Boden und Verdauungstraktinhalt

Die folgenden Inkubationsversuche dienten der Bestimmung des Gärungspotentials von Boden und Inhalt aus verschiedenen Verdauungstraktregionen sowie der Identifikation von Gärungsprozessen im Verdauungstraktinhalt. Das Monosaccharid Glucose wurde als

Modellsubstrat gewählt und in einer Konzentration von 10 mmol l (Wassergehalt)⁻¹ verwendet, die im Regenwurmdarm *in situ*-relevant ist (Horn *et al.*, 2003b; Drake und Horn, 2007). Das zentrale Ziel war die Identifikation von aktiven gärenden Mikroorganismen im Verdauungstraktinhalt durch den Einsatz von ¹³C-markierter Glucose (Prinzip der Stablen-Isotopenbeprobung: 2.8.5.1).

Die Regenwürmer (*L. terrestris*; Abbildung 5) wurden stets mit sterilem ddH₂O gewaschen, durch kurzes Eintauchen in 70 °C heißes ddH₂O getötet und unter anoxischen Bedingungen in einer O₂-freien Kammer (Gasphase 100 % N₂) sezziert. Der Verdauungstrakt wurde mit einem longitudinalen Schnitt eröffnet und der Inhalt für anschließende Inkubationsversuche entnommen.

2.5.4.1 Boden und Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm

Der Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm von 35 Würmern (durchschnittliches Frischgewicht 4,5 ± 1,4 g) und Bodenproben der Probenahmeffläche TW (Tabelle 2) wurden mit sterilem, anoxischem Natrium-Phosphat-Puffer (16,3 mM, pH 7) homogenisiert (1 : 10 w/v) und auf vier 50-ml-Nunc-Röhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) verteilt. Aus einer sterilen anoxischen Stammlösung (100 mM) wurde [¹²C]Glucose zugegeben, sodass die Endkonzentration im Homogenisat 10 mmol l (Wassergehalt)⁻¹ betrug. Als Kontrolle diente ein un-supplementierter Ansatz. Die Mikrokosmen wurden in Duplikaten angesetzt und bei 15 °C im Dunkeln für 24 h inkubiert. Die Gasphase war N₂ (100 %). In 1-h-Abständen wurden 300 µl der Gas- und 150 µl der Flüssigphase entnommen und die Konzentrationen von CO₂, H₂, N₂O (2.6.5) und löslichen organischen Verbindungen (2.6.6) bestimmt.

2.5.4.2 Inhalt aus Mittel- und Enddarm für Stabile-Isotopenbeprobung

Der Inhalt aus Mittel- und Enddarm von 45 Würmern (durchschnittliches Frischgewicht von 4,2 ± 0,7 g) wurde mit sterilem, anoxischen Natrium-Phosphat-Puffer (32,6 mM, pH 7) homogenisiert (1 : 10 w/v) und auf drei 50-ml-Nunc-Röhrchen verteilt. Aus sterilen anoxischen Stammlösungen (100 mM) wurde [¹²C]- bzw. [¹³C]Glucose zugegeben, sodass die Endkonzentration im Homogenisat 10 mmol l (Wassergehalt)⁻¹ betrug. Als Kontrolle diente ein un-supplementierter Ansatz. Die Mikrokosmen wurden in Triplikaten angesetzt und bei 15 °C im Dunkeln für 51 h inkubiert. Die Gasphase war N₂ (100 %). In 6-h-Abständen wurden 500 µl der Gas- und 150 µl der Flüssigphase entnommen und die Konzentrationen von CO₂, H₂ (2.6.5) und löslichen organischen Verbindungen (2.6.6) bestimmt. Zu Beginn der Inkubation sowie nach 24 h und 51 h wurden 1,5 ml Probe für molekularbiologische Analysen (2.8) entnommen und bei -80 °C gelagert.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Extraktion von Boden und Verdauungstraktinhalt

Die Regenwürmer (*L. terrestris*, *L. rubellus* und *O. multiporus*; Abbildung 5) wurden mit sterilem ddH₂O gewaschen, durch kurzes Eintauchen in 70 °C heißes ddH₂O getötet und an der Luft seziiert. Der Inhalt von Kropf/Magen, Vorderdarm, Mitteldarm und Enddarm (Abbildung 1) wurde separat (*L. terrestris*) oder gesammelt (*L. rubellus* und *O. multiporus*) entnommen und sofort auf Eis gestellt. Der Verdauungstraktinhalt von Würmern der gleichen Art wurde gesammelt, um Probenmengen von ca. 0,5 g Frischgewicht zu erhalten. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurde Valeriansäure (10 mmol l [Wassergehalt]⁻¹) als interner Standard eingesetzt (Küsel und Drake, 1995). Verdauungstraktinhalt- und Bodenproben wurden im Verhältnis 1 : 4 (w/v) mit 60 °C heißem ddH₂O gemischt. Alternativ wurde Boden (20 g) im Verhältnis 1 : 1 (w/v) mit 60 °C heißem ddH₂O gemischt. Die Proben wurden für 1 min gevortext und im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei 5 °C über Nacht extrahiert. Die Feststoffe wurden durch Zentrifugation (15.000 x g, 15 min, 4 °C) abgetrennt und für die Analyse von Kohlenstoff- und Stickstoffgehalten (2.6.3) verwendet. Der Überstand wurde filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm) und bis zur Analyse von löslichen organischen Verbindungen (2.6.6) und anorganischen Ionen (2.6.7) bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2 Wassergehalt und Trockengewicht

Wassergehalt und Trockengewicht (TG) von Verdauungstraktinhalt und Boden wurden in Triplikaten durch Wiegen vor und nach mehrtägiger Trocknung bei 60 °C bestimmt (Scheffer und Schachtschabel, 2002).

2.6.3 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt

Boden und Verdauungstraktinhalt wurden in Dreifachwiederholungen für 72 h bei 60 °C getrocknet und in einer Kugelschwingmühle (Typ MM2, Retsch, Haan, Deutschland) pulverisiert. Die Ermittlung des Gesamt-Kohlenstoff- und Gesamt-Stickstoffgehalts („total carbon“, TC und „total nitrogen“, TN) wurde mit einem Elementaranalysator (CHN-O-rapid, Foss-Heraeus, Hanau, Deutschland) durch die Zentrale Analytik der Universität Bayreuth durchgeführt. Bei einem Teil der Probe wurde der organische Kohlenstoffanteil durch Behandlung mit 8 % Salzsäure (HCl) über Nacht und anschließender Erhitzung auf 80 °C für 1 - 2 h entfernt und der anorganische Kohlenstoffgehalt mittels Elementaranalysator bestimmt. Durch Subtraktion des anorganischen Kohlenstoffgehalts vom TC wurde der organische Kohlenstoffgehalt („total organic carbon“, TOC) ermittelt.

2.6.4 pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einer Kombinations-pH-Elektrode (U457-S7/110, Ingold, Steinbach, Deutschland) und einem digitalen pH-Meter (WTW pH 330, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland) gemessen.

2.6.5 Gase

Die Gasprobenentnahme erfolgte mit sterilen Spritzen und Kanülen, welche zuvor zweimal mit sterilem Gas gespült wurden. Der Innendruck im Gefäß wurde unmittelbar vor der Messung mit einem Nadelmanometer (DMG 2120, DMG, Horgen, Schweiz) bestimmt. Für die Gasanalyse in Bayreuth kamen mehrere Hewlett-Packard 5890 Series II Gaschromatographen (Palo Alto, CA, USA) und ein SRI 8610C Gaschromatograph (Torrance, CA, USA) zur Verwendung (Tabelle 3). In Palmerston North wurde die Gasanalyse in Zusammenarbeit mit Jagrati Singh (Landcare Research) mit einem Shimadzu-2010 Gaschromatographen (Kyoto, Japan) durchgeführt (Tabelle 3), der mit einem Autosampler ausgestattet war. Die Gasproben wurden mit Spritzen in gasdichte 12-ml-Fläschchen (Labco Limited Exetainer, Buckinghamshire, UK) überführt, die zuvor mit einer Vakuumpumpe (-80 kPa, 2 min) evakuiert worden waren. Je nach Probenvolumen wurde mit einer Spritze N₂ (100 %) zugegeben, um im Exetainer einen Überdruck zu schaffen. Die Gasproben wurden bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert (Hedley *et al.*, 2006).

Die Berechnung der im Gefäß vorhandenen Menge des Gases erfolgte unter Verwendung von externen Standards sowie Einbeziehung von Raumtemperatur, aktuellem Luftdruck, Innendruck, Flüssigkeits- und Gasvolumen (Gleichung 2 bis Gleichung 6).

Tabelle 3. Parameter der GC-Systeme.

	GC-Anlage						
	Hewlett-Packard 5890 Series II			SRI 8610C			Shimadzu-2010
Detektierbare Gase	N ₂ O	CO ₂	H ₂ , N ₂ , O ₂	CO ₂	N ₂ O	H ₂	N ₂ O
Detektor	Elektroneneinfangdetektor (EED)	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)	Flammenionisierungsdetektor (FID), Methanisierer	Elektroneneinfangdetektor (EED)	Reduktionsgasdetektor (RGD)	Elektroneneinfangdetektor (EED)
Säule	Porapak Q 80/100, 4 m x 1/8" (Supelco Bellefonte, PA, USA)	Chromosorb 102, 2 m x 1/8" (Alltech, Unterhaching, Deutschland)	Molekularsieb, 2 m x 1/8" (Alltech, Unterhaching, Deutschland)	Hayesep-D 2 m x 1/8" (SRI Instruments, Torrance, CA, USA)	Hayesep-D 2 m x 1/8" (SRI Instruments, Torrance, CA, USA)	Molekularsieb 13X, 2 m x 1/8" (Restek, Bellefonte, PA, USA)	Porapak Q 12' (Supelco Bellefonte, PA, USA)
Ofentemperatur	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C
Trärgas	95 % Argon, 5 % Methan	Helium	Argon	Helium	Helium	Helium	90 % Argon, 10 % Methan
Flussrate	20 - 40 ml min ⁻¹	15 ml min ⁻¹	33 ml min ⁻¹	40 ml min ⁻¹	40 ml min ⁻¹	20 ml min ⁻¹	5 ml min ⁻¹
Injektortemperatur	150 °C	150 °C	150 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C
Detektortemperatur	300 °C	175 °C	175 °C	380 °C	300 °C	250 °C (Reaktor)/ 180 °C (Zelle)	315 °C
Injektionsvolumen	100 µl	100 - 200 µl	100 - 500 µl	300 µl	300 µl	300 µl	1000 µl
Retentionszeiten	3,0 - 4,4 min	1,9 min	0,6 min (H ₂) 0,9 min (O ₂) 1,7 min (N ₂)	1,6 min	2,1 min	0,8 min	3,9 min
Software	Keine; quantitative Auswertung mit Hewlett-Packard 3396 Series II Integratoren (Palo Alto, CA, USA)			PeakSimple (SRI Instruments, Torrance, CA, USA)			GC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Die Gesamtstoffmenge eines Gases (n_{ges}) setzt sich aus dem gasförmigen Anteil (n_{gas}) und dem physikalisch gelösten Anteil ($n_{gel,p}$) zusammen. Für das Gas CO_2 wird zusätzlich der chemisch gelöste Anteil ($n_{gel,c}$) einbezogen (Gleichung 2).

Gleichung 2. Gesamtstoffmenge eines Gases.

$$n_{ges} = n_{gas} + n_{gel,p} (+ n_{gel,c})$$

Die Stoffmenge eines Gases in der Gasphase wurde mit Gleichung 3 bestimmt. Das hierfür benötigte Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen ($V_{akt,mol}$) wurde anhand der allgemeinen Zustandsgleichung für ideale Gase (Gleichung 4) ermittelt.

Gleichung 3. Stoffmenge eines Gases in der Gasphase.

$$n_{gas} = V_{Gas} \cdot \frac{C}{V_{akt,mol}} \cdot \frac{p_{akt} + p_{\ddot{u}}}{p_{akt}}$$

n_{gas} , Stoffmenge in der Gasphase (μmol); V_{Gas} , Volumen der Gasphase (ml); C , gemessene Gaskonzentration (ppm); $V_{akt,mol}$, Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen (ml); p_{akt} , aktueller Luftdruck (mbar); $p_{\ddot{u}}$, Überdruck im Gefäß (mbar).

Gleichung 4. Allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase.

$$V_{akt,mol} = \frac{p_1 \cdot V_1 \cdot T_{akt}}{T_1 \cdot p_{akt}}$$

p_1 , Luftdruck unter Standardbedingungen (mbar); V_1 , Molvolumen unter Standardbedingungen (ml); T_1 , Temperatur unter Standardbedingungen (K); T_{akt} , aktuelle Temperatur (K).

Der physikalisch gelöste Anteil des Gases wurde nach Gleichung 5 berechnet. Der Bunsensche Löslichkeitskoeffizient α variiert je nach Gas und aktueller Temperatur (Blachnik, 1998) und ist in Tabelle 4 angegeben. Da CO_2 teilweise chemisch gelöst, d. h. in Form von HCO_3^- , vorliegt, wurde dieser Anteil ebenfalls mit einbezogen (Gleichung 6).

Gleichung 5. Physikalisch gelöster Anteil eines Gases.

$$n_{gel,p} = V_{fl} \cdot \frac{C}{V_{akt,mol}} \cdot \alpha \cdot \frac{p_{akt} + p_{\ddot{u}}}{p_{akt}}$$

V_{fl} , Volumen der Flüssigphase (ml); α , Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient.

Gleichung 6. Chemisch gelöster Anteil eines Gases.

$$n_{gel,c} = n_{gel,p} \cdot 10^{-pK_a + pH}$$

Tabelle 4. Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für verschiedene Gase in Wasser bei verschiedenen Temperaturen (Blachnik, 1998).

	Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α	
	293 K (20 °C)	298 K (25 °C)
CO ₂	0,850	0,740
H ₂	0,018	0,017
N ₂ O	0,600	0,520

2.6.6 Lösliche organische Verbindungen

Lösliche organische Verbindungen wie Alkohole, organische Säuren und Zucker wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (Ehrlich *et al.*, 1981). Flüssigproben aus Inkubationsversuchen (2.5.4) und Kultivierungsansätzen (2.7.2) wurden zentrifugiert (1-15K Sartorius Mikrokühlzentrifuge, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland; 13.000 x *g*, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde durch Mikrofiltration (Porengröße 0,2 μ m) von Partikeln gereinigt, in Bördelflaschen mit Glaseinsatz (VWR International, Darmstadt, Deutschland) gefüllt und verkappt. Extrakte aus Verdauungstraktinhalt und Boden (2.6.1) wurden direkt in Bördelflaschen überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Verbindungen dienten externe Standards, welche bis zur Verwendung ebenfalls bei -20 °C gelagert wurden.

In Bayreuth wurde ein Hewlett Packard 1090 Series II Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (Palo Alto, CA, USA) verwendet (Tabelle 5), der über einen Autosampler verfügte. Eine detaillierte Analyse von Oligo- und Monosacchariden wurde mit einem Jasco Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (Großumstadt, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 5 und Tabelle 6). Ein Teil der Probe wurde vor der Analyse mit 4 M Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 1 : 1 (v/v) versetzt und für 1 h auf 100 °C erhitzt, um die darin enthaltenen Poly- und Oligosaccharide zu hydrolysieren (Schiller *et al.*, 2002). In Palmerston North wurde die HPLC-Analyse von Gemma Henderson (Grasslands Research Centre, AgResearch Ltd.) mit einem Shimadzu-LC10Ai Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (Kyoto, Japan) durchgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5. Parameter der HPLC-Systeme.

	HPLC-Anlage		
	Hewlett Packard 1090 Series II	Jasco	Shimadzu LC10Ai
Detektierbare Verbindungen	Alkohole, organische Säuren, einige Saccharide	Mono- und Oligosaccharide	Alkohole, organische Säuren, einige Saccharide
Detektor(en)	G1362A Refraktionsindexdetektor (RID), G1314B variabler Wellenlängendetektor (VWD; 210 nm) (beide Series 1200; Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland)	ED40 elektrochemischer Detektor (PAD) mit einer Gold-Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)	10A-Refraktionsindexdetektor (RID) (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Säule	Aminex Ion Exclusion HPX-87H (300 x 7,8 mm; BioRad, Richmond, CA, USA)	Carbo Pac PA-100 (250 x 4 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)	Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %) (300 x 7,8 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Ofentemperatur	60 °C	30 °C	45 °C
Mobile Phase	4 mM H ₃ PO ₄	NaOH-Gradient (Zusammensetzung siehe Tabelle 6)	5 mM H ₂ SO ₄
Flussrate	0,8 ml min ⁻¹	1,0 ml min ⁻¹	0,8 ml min ⁻¹
Injektionsvolumen	20 µl	10 µl	20 - 50 µl
Software	ChemStation (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland)	Borwin (JMBS, Grenoble, Frankreich)	LC Solutions (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Tabelle 6. Zusammensetzung des Natronlauge (NaOH)-Gradienten zur Auftrennung von Mono- und Oligosacchariden mittels der HPLC-Anlage von Jasco.

Behandlung	Zeit (min)	0,5 M NaOH (%)	ddH ₂ O (%)
unhydrolysiert	0	2	98
	15	2	98
	35	42	58
	37	70	30
	39	70	30
	40	2	98
hydrolysiert ^a	0	3	97
	7,5	3	97
	18	4	96
	26	70	30
	29	70	30
	30	3	97

^a Hydrolyse der Flüssigprobe mit 4 M TFA im Verhältnis 1 : 1 (v/v).

2.6.7 Anorganische Ionen

Mit Ausnahme von Nitrat (2.6.7.3) wurden anorganische Ionen mittels colorimetrischer Verfahren bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte stets über mitgeführte Standardreihen. In Palmerston North wurde die Bestimmung anorganischer Ionen durch das Umweltchemie-Labor von Landcare Research vorgenommen.

2.6.7.1 Ammonium

In Bayreuth und Palmerston North erfolgte die Bestimmung von Ammonium mittels Fließinjektionsanalyse nach Reaktion mit Hypochlorit und Nitroprussid bei 660 nm mit einem FIA-LAB (MLE, Dresden, Deutschland) bzw. einem QuickChem 8000 Autoanalyzer (Lachat Instruments, Loveland, CO, USA).

2.6.7.2 Eisen(II)

Die Messung von Eisen(II) wurde nach der Phenanthrolin-Methode (Tamura *et al.*, 1974) durchgeführt. Zur Quantifizierung des gesamten Eisen(II) wurde das unlösliche, in Eisen(II)/Eisen(III)-Mischkristallen enthaltene Eisen(II) extrahiert. Hierfür wurden 0,2 ml Probe mit 9,8 ml HCl (0,5 N) versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Zu 4,5 ml dieser Verdünnung wurden 0,5 ml Acetatpuffer (200 g Ammoniumacetat, 250 ml Eisessig, ad 500 ml ddH₂O) und 0,5 ml Phenanthrolinlösung (1 g 1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat ad 200 ml ddH₂O) gegeben. Die Extinktion des sich entwickelten roten Fe-Phenanthrolin-Komplexes wurde bei einer Wellenlänge von 512 nm mit einem UVIKON 930 Photometer (Kontron Instruments, München, Deutschland) bestimmt. Bei geringem Probenvolumen oder einer großen Probenanzahl wurde die Bestimmung in Mikrotiterplatten (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien) durchgeführt. Dazu wurden die Volumina der Proben und Reagenzien anteilig reduziert und die Mikrotiterplatten in einem μ Quant Microplate Spektralphotometer (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) ausgelesen.

2.6.7.3 Nitrat

Zur Quantifizierung der Nitratkonzentrationen nach Velghe und Claeys (1985) wurden in einem 5-ml-Reagenzglas 0,5 ml Probe und 25 μ l Resorzinollösung (5 % w/v) vermischt. An die Zugabe von 0,65 ml konzentrierter Schwefelsäure (36 N) schloss sich die Messung der Extinktion bei 360 nm mit einem Tischphotometer (Pharmacia LKB Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Frankfurt, Deutschland) an.

Alternativ erfolgte die Nitratbestimmung mit Salicylsäure (Cataldo *et al.*, 1975; Gadkari, 1984). In einem 5-ml-Reagenzglas wurden 50 μ l Probe mit 10 μ l Amidoschwefelsäure (10 % w/v) vermischt und nach 15 min 0,2 ml Salicyl-Schwefelsäure (5 % w/v, in H₂SO₄) zugegeben. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 4,5 ml NaOH (2 N) gestoppt und die Extinktion des gelben Farbstoffs bei 410 nm mit einem Tischphotometer gemessen.

Nitrat wurde neben der colorimetrischen Bestimmung auch ionenchromatographisch bestimmt. Der Dionex DX500 Ionenchromatograph (Sunnyvale, CA, USA) war mit einer GP50 Pumpe, einem LC25 Ofen und einem ED40 Leitfähigkeitsdetektor (alle Dionex, Sunnyvale, CA, USA) ausgestattet. Als mobile Phase diente eine Lösung aus 1,8 mM Na₂CO₃ und 1,7 mM NaHCO₃. Zur Auftrennung wurde eine 4 mm AS-SC Säule (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) bei einer Flussrate von 2 ml min⁻¹ und 35 °C Säulentemperatur verwendet. Die Chromatogramme wurden mit der Software Cromeleon (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet.

In Palmerston North wurde Nitrat mittels Fließinjektionsanalyse mit einem QuickChem 8000 Autoanalyser (Lachat Instruments, Loveland, CO, USA) nach der Reduktion zu Nitrit und Reaktion mit Sulfanilamid bei 520 nm quantifiziert.

2.6.7.4 Nitrit

Die Messung der Nitritkonzentration wurde leicht modifiziert nach Harrigan und Mc Cance (1966) durchgeführt. Zu 0,5 ml Probe wurde 0,25 ml Gieß-Reagenz A (0,2 g 1-Naphtylamin-7-Sulfonsäure, 120 ml ddH₂O, 30 ml Eisessig) und 0,25 ml Gieß-Reagenz B (0,5 g Sulfanilsäure, 120 ml ddH₂O, 30 ml Eisessig) gegeben. Die Lösung wurde gemischt und für 15 min bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion des roten Farbstoffs wurde bei 550 nm an einem Tischphotometer gemessen. Bei geringem Probenvolumen oder einer großen Probenanzahl wurde die Bestimmung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden die Volumina der Proben und Reagenzien anteilig reduziert und die Mikrotiterplatten in einem μ Quant Microplate Spektralphotometer (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) ausgelesen.

In Palmerston North erfolgte die Nitritbestimmung mittels Fließinjektionsanalyse nach Reaktion mit Sulfanilamid bei 520 nm mit einem QuickChem 8000 Autoanalyzer (Lachat Instruments, Loveland, CO, USA).

2.6.8 Proteine

2.6.8.1 Präparation eines zellfreien Extrakts

Der Zellaufschluss wurde unter anoxischen Bedingungen vorgenommen (Lundie und Drake, 1984). Zur Herstellung von zellfreien Extrakten aus Verdauungstraktinhalt wurden 19 Regenwürmer (*L. terrestris*; durchschnittliches Frischgewicht $4,8 \pm 1,1$ g) mit sterilem ddH₂O gewaschen, durch kurzes Eintauchen in 70 °C heißes Wasser getötet (Singleton *et al.*, 2003) und in einer O₂-freien Kammer (Gasphase 100 % N₂) seziiert. Der Darmschlauch wurde eröffnet und der Inhalt von Vorder-, Mittel- und Enddarm separat entnommen. Es wurden 0,7 g Darminhalt mit 0,5 g sterilen Zirkonium-Kügelchen (Durchmesser 0,5 mm und 0,1 mm; 1 : 1) und 0,7 ml anoxischem Lysozym-Puffer (Tabelle 7) vermischt, kräftig gevortext und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtrennung der Partikel in einer Beckmann J2-HS Zentrifuge mit JA-20 Rotor (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA; 14.000 U min⁻¹, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und in eine gasdichte Serumflasche (CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) überführt.

Zudem wurde zellfreies Extrakt aus einer Reinkultur von *Sporomusa rhizae* (2.7.3) gewonnen, welches als Positivkontrolle für die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität (2.6.8.3) diente. Bei einer OD₆₆₀ von 0,14 wurden die Zellen mit einer Beckmann J2-HS Zentrifuge mit JA-10 Rotor (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA; 14.000 U min⁻¹, 30 min, Raumtemperatur) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7) aufgenommen und erneut zentrifugiert (14.000 U min⁻¹, 30 min, Raumtemperatur). Nach Abnahme des Überstands wurde auf das

Zellpellet anoxischer Lysozym-Puffer (Tabelle 7) im Verhältnis 1 : 1,5 (w/v) gegeben und kräftig gemischt. Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

Tabelle 7. Zusammensetzung des Lysozym-Puffers.

Bestandteil	Volumen bzw. Menge
Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7)	1 ml
Phenylmethylsulfonylfluorid-Stammlösung (10 mM, in Isopropanol)	10 µl
Lysozym	5 mg
DNase I (10.000 U µl ⁻¹)	33 µl
1,4-Dithioerythritol	1,4 mg

2.6.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden 100 µl des zellfreien Extrakts (2.6.8.1) mit 5 ml Bradford-Reagenz (50 mg Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 25 ml 96 %iger Ethanol, 50 ml 85 %ige Phosphorsäure, ad 500 ml ddH₂O, über Faltenfilter filtriert) gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die Extinktion des bläulichen Farbstoff-Protein-Komplexes wurde bei 595 nm mit einem Tischphotometer (Pharmacia LKB Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Frankfurt, Deutschland) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA).

2.6.8.3 Bestimmung der Hydrogenaseaktivität

Die Hydrogenaseaktivität von zellfreien Extrakten (2.6.8.1) wurde colorimetrisch unter anoxischen Bedingungen und in Gegenwart des Elektronenakzeptors Benzylviologen gemessen (Drake, 1982). In einem Wasserbad wurden Kultivierungsröhrchen mit je 5 ml anoxischem Reaktionsmix (50 mM Tris, 0,5 mM Benzylviologen, pH 7,5, Gasphase N₂) auf 35 °C temperiert. Unmittelbar vor der Messung wurden 5 ml H₂ (100 %) zum Reaktionsmix gegeben. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsmix ohne H₂. Mit einer Spritze wurden 50 - 200 µl des zellfreien Extrakts zum Reaktionsmix gegeben und kräftig geschüttelt. Die Entwicklung des tiefblauen Farbstoffs wurde bei 578 nm anhand eines Tischphotometers (Pharmacia LKB Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Frankfurt, Deutschland) und eines Schreibers (Goerz Servogor 110, Kipp & Zonen, Reichenbach, Deutschland) verfolgt. Als Positivkontrolle diente zellfreies Extrakt von *Sporomusa rhizae*, einem acetogenen Bakterium, das eine hohe Hydrogenaseaktivität aufweist (Gößner *et al.*,

2006). Je nach vorhandenem Probevolumen wurde die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität in zwei bis vier Replikaten durchgeführt. Die spezifische Hydrogenaseaktivität wurde aus dem linearen Bereich der Zeit-Umsatz-Kurve und der Proteinkonzentration (2.6.8.2) berechnet (Gleichung 7), wobei eine Unit (U) als $1 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1}$ definiert wurde.

Gleichung 7. Spezifische Hydrogenaseaktivität.

$$\text{Spezifische Aktivität (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{V_{\text{ges}} \cdot \Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Extrakt}} \cdot C_{\text{Protein}} \cdot 2}$$

V_{ges} , Gesamtvolumen des Reaktionsmixes (ml); ΔE , Extinktionsänderung pro Zeit (min^{-1}); ε , Molarer Extinktionskoeffizient für Benzylviologen ($8,65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [McKellar und Sprott, 1979]); d , Schichtdicke (1,5 cm), V_{Extrakt} , Volumen des Extrakts (ml); C_{Protein} , Proteinkonzentration (mg ml^{-1}).

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Nährmedien und Kultivierungstechniken

Alle Lösungen und Nährmedien wurden mit ddH₂O hergestellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Lösungen und Medien wurden bei 120 °C und 1 bar Überdruck für 25 min autoklaviert (Hochdruck-Kleinsterilisator, Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen, Deutschland). Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm ; Celluloseacetat-Filter, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Deutschland) und nach dem Autoklavieren zugegeben.

Lösungen und Nährmedien zur Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen wurden unter größtmöglichem Sauerstoffausschluss nach der modifizierten Hungate-Technik (Hungate, 1969; Daniel und Drake, 1993) hergestellt. Die Komponenten wurden mit einer Analysenwaage (Analytic AC 120S, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) abgewogen, in einem Erlenmeyerkolben in wenig ddH₂O gelöst und mit kochendem ddH₂O aufgefüllt. Falls nicht anders angegeben wurden die Lösungen und Medien unter ständiger N₂-Begasung auf Raumtemperatur abgekühlt und abgefüllt. Die Gefäße wurden gasdicht mit Butylgummistopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossen. Der pH-Wert wurde nach dem Autoklavieren überprüft.

2.7.1.1 Lösungen

2.7.1.1.1 Mineralsalzlösung

KH_2PO_4	10 g
NaCl	8 g
NH_4Cl	8 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Mineralsalzlösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.7.1.1.2 Spurenelementlösung

(Karsten und Drake, 1995)

Na-Nitilotriacetat	1500 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	500 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
ZnCl_2	100 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	50 mg
H_2SeO_3	50 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
H_3BO_3	10 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
Na_2WO_4	10 mg
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Spurenelementlösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.7.1.1.3 Vitaminlösung

(Karsten und Drake, 1995)

Liponsäure	50 mg
Riboflavin (Vitamin B ₂)	50 mg
Thiamin-HCl (Vitamin B ₁)	50 mg
Ca-D-Pantothenat (Vitamin B ₅)	50 mg
Cyanocobolamin	50 mg
p-Aminobenzoessäure	50 mg
Nicotinsäure (Vitamin B ₃)	50 mg
Biotin (Vitamin H)	20 mg
Folsäure (Vitamin B ₉)	20 mg
Pyridoxal- HCl (Vitamin B ₆)	20 mg
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.7.1.2 Nährmedien

2.7.1.2.1 Nährmedium für Eisen(III)-Reduzierer (ERan)

Mineralsalzlösung (2.7.1.1.1)	50 ml
Spurenelementlösung (2.7.1.1.2)	5 ml
Vitaminlösung (2.7.1.1.3)	5 ml
NaHCO ₃	7,5 g
Hefeextrakt	1 g
Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃	7,452 g
C ₂ H ₃ NaO ₂ · 3 H ₂ O	0,136 g
C ₄ H ₄ O ₄ Na ₂ · 6 H ₂ O	0,27 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

mit CO₂ begasen, autoklavieren, nach dem Abkühlen Zugabe von:

Glucose-Stammlösung (10 mM) für eine Endkonzentration von 0,2 mM.

Der pH-Wert betrug nach dem Autoklavieren 6,7. Die HPLC-Analyse deutete darauf hin, dass das Medium zusätzlich etwa 8,5 mM C₆H₈O₇ enthält.

2.7.1.2.2 *Nährmedium für Sporomusa rhizae (SRan)*

Mineralsalzlösung (2.7.1.1.1)	50 ml
Spurenelementlösung (2.7.1.1.2)	5 ml
Vitaminlösung (2.7.1.1.3)	5 ml
Resazurin-Stammlösung (0,1 %)	1 ml
NaHCO ₃	7,5 g
Hefeextrakt	1 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
mit CO ₂ begasen, nach dem Abkühlen Zugabe von:	
Cystein HCl · H ₂ O	0,25 g
Na ₂ S · 9 H ₂ O	0,25 g
autoklavieren, nach dem Abkühlen Zugabe von:	

N-Acetylglucosamin-Stammlösung (40 mM) für eine Endkonzentration von 10 mM.

2.7.1.2.3 *SOC-Medium*

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl-Stammlösung (1 M)	1 ml
KCl-Stammlösung (1 M)	0,25 ml
ddH ₂ O	ad 97 ml
autoklavieren, nach dem Abkühlen Zugabe von:	
Mg ²⁺ -Stammlösung (2 M)	1 ml
Glucose-Stammlösung (2 M)	1 ml
auf pH 7 einstellen	
ddH ₂ O	ad 100 ml

Die Mg²⁺-Stammlösung (20,33 g MgCl₂, 24,65 g MgSO₄, ad 100 ml) und die Glucose-Stammlösung wurden sterilfiltriert. Das SOC-Medium wurde abschließend sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

2.7.1.2.4 *LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)*

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	ad 990 ml
auf pH 7 einstellen	
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Das Medium wurde abschließend autoklaviert.

2.7.1.2.5 *LB-Platten*

Dem oben beschriebenen LB-Medium wurde 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60 °C in einer sterilen Werkbank in sterile Kunststoff-Petrischalen gegossen. Nach der Verfestigung wurden die LB-Platten bei 4 °C gelagert.

2.7.1.2.6 *LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal*

Zum Klonscreening (2.8.7.4) wurden LB-Platten (2.7.1.2.5) mit Ampicillin, Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG; Promega, Madison, WI, USA) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) verwendet. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 50 °C wurden 1 ml Ampicillin-Stammlösung (100 mg ml⁻¹), 1 ml IPTG-Stammlösung (0,5 M) und 1,6 ml X-Gal-Stammlösung (50 mg ml⁻¹, in N,N'-Dimethylformamid) zugegeben. Das Medium wurde in einer sterilen Werkbank in sterile Kunststoff-Petrischalen gegossen und nach Verfestigung bei 4 °C gelagert.

2.7.2 **Lebend-Keimzahlbestimmungen**

Anhand der Most Probable Number (MPN)-Methode wurde die Anzahl kultivierbarer Eisen(III)-Reduzierer und Glucose-verwertender Anaerobier im Verdauungstraktinhalt und im Boden abgeschätzt (de Man, 1975). Die MPN-Methode beruht auf der Bestimmung der An- oder Abwesenheit von Mikroorganismen in Flüssignährmedien, die zuvor mit verschiedenen Stufen einer Verdünnungsreihe beimpft wurden.

Für die Erstellung der seriellen Verdünnungsreihe wurden die Regenwürmer (3 x *L. terrestris* und 5 x *A. caliginosa*; Abbildung 5) mit sterilem ddH₂O gewaschen und für 20 min mit CO₂ (100 %) betäubt. Unter anoxischen Bedingungen in einer O₂-freien Kammer (Gasphase 100 % N₂) wurden die Würmer von anterior nach posterior gequetscht, um den Darminhalt zu gewinnen. Zur Herstellung der ersten Verdünnungsstufe (10⁻¹) wurden 0,5 g Darminhalt bzw. Boden der Probenahme fläche TW (Tabelle 2) mit 4,5 ml

Flüssignährmedium ERan ohne Glucose (2.7.1.2.1) homogenisiert. Nach der Erstellung von Dezimalverdünnungen bis zu 10^{-9} erfolgte die Beimpfung von je 9 ml Glucose-haltigem Flüssignährmedium (2.7.1.2.1) mit 1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe in drei Parallelen. Die luftdicht verschlossenen Kultivierungsröhrchen wurden aus den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-9} angeimpft und bei 20 °C im Dunkeln aufrecht stehend für vier Monate kultiviert, bis keine neuen wachstumspositiven Röhrchen auftraten. Sämtliche Verdünnungs- und Beimpfungsschritte wurden mit sterilen Spritzen vorgenommen.

Für die Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl von Eisen(III)-Reduzierern wurden die Eisen(II)-Konzentrationen in den MPN-Röhrchen regelmäßig gemessen (2.6.7.2). Die Röhrchen, die zu Inkubationsende eine höhere Eisen(II)-Konzentration als die Summe aus der durchschnittlichen Eisen(II)-Konzentration in unbeimpften Kontrollröhrchen und der doppelten Standardabweichung aufwiesen, wurden als positiv für Eisen(III)-Reduktion gewertet. Weiterhin wurden die löslichen organischen Verbindungen (2.6.6) quantifiziert. Die Röhrchen, die zu Inkubationsende weniger als 20 % der zugegebenen Glucose enthielten, wurden als positiv für Glucoseverbrauch gewertet.

2.7.3 Kultivierung von *Sporomusa rhizae*

Zur Kultivierung von *S. rhizae* wurde Flüssignährmedium SRan (2.7.1.2.2) mit einer Reinkultur aus der Lehrstuhl-Stammsammlung (Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth) angeimpft und liegend bei 30 °C im Dunkeln für fünf bis zehn Tage inkubiert.

2.7.4 Wachstumsmessungen

Das Wachstum der Mikroorganismen wurde in Kultivierungsröhrchen anhand der Messung der optischen Dichte bei 660 nm (OD_{660}) mit einem Photometer (Spectroquant Multy, Merck, Darmstadt, Deutschland) verfolgt. Als Referenz diente ein unbeimpftes Röhrchen.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Die Diversität der Mikroorganismengemeinschaften wurde kultivierungsunabhängig mit Hilfe der Analyse von strukturellen Genen (N_2O -Reduktasegen *nosZ*) und von 16S rRNA untersucht. Die Technik der Stablen-Isotopenbeobachtung (stable isotope probing, SIP) diente der Identifikation von aktiven und Glucose-verwertenden *Bacteria* aus dem Verdauungstrakt des Regenwurms.

Für die Analyse von DNA wurden sterile und Desoxyribonuklease (DNase)-freie Materialien und Chemikalien verwendet. Zur Herstellung von partikelfreiem Wasser (PCR- H_2O) wurde dd H_2O steril in Reaktionsgefäße filtriert und autoklaviert. Für die Analyse von RNA wurde stets mit Ribonuklease (RNase)-freien Materialien und Chemikalien gearbeitet. Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC- H_2O) hergestellt. Zur Herstellung von DEPC- H_2O wurde dd H_2O in eine 1-L-Schottflasche sterilfiltriert, mit DEPC (1 ml ad 1000 ml dd H_2O) versetzt, für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. Alternativ wurde UltraPure DNase/RNase-freies dd H_2O (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet.

2.8.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Die Koextraktion von DNA und RNA erfolgte leicht modifiziert nach einem Protokoll, das die mechanische Lyse der Zellen, die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und die Fällung der Nukleinsäuren einschloss (Griffiths *et al.*, 2000). Es wurden 0,5 g Boden bzw. Verdauungstraktinhalt in 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (VWR International, Darmstadt, Deutschland) eingewogen. Alternativ wurden 0,7 ml homogenisierter Verdauungstraktinhalt (Verdünnung 1 : 10 w/v, 2.5.4.2) verwendet und diesem durch Zentrifugation (1-15K Sartorius Mikrokühlzentrifuge, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland; 13.000 x g, 5 min, 4 °C) ein Großteil der Flüssigphase entzogen. Zu den Proben wurden 1 g sterile und RNase-freie Zirkonium-Kügelchen (Durchmesser 0,5 mm und 0,1 mm; 1 : 1), 0,5 ml Extraktionspuffer (5 % CTAB, 0,35 M NaCl, 120 mM Na-Phosphat, pH 8; erhitzt auf 60 °C) und 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1, pH 8) gegeben. Die Lyse erfolgte in einem FastPrepInstrument (FastPrep FP120, Thermo Savant, Langenselbold, Deutschland) bei 5,5 m s⁻¹ für 2 x 30 s. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und im Anschluss zentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4 °C). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) von Phenolresten befreit. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit zwei bis drei Volumen Präzipitationspuffer (30 % PEG6000 in 0,1 M HEPES, pH 7) versetzt und gevortext. Die Nukleinsäuren wurden bei Raumtemperatur für 2 h präzipitiert und durch Zentrifugation (13.000 x g, 5 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5 ml

eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und zentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl RNase-freiem ddH₂O aufgenommen. Quantität und Qualität der Nukleinsäuren wurden durch spektrophotometrische Messungen (2.8.3) und Agarosegele (2.8.4) überprüft. Die Koextrakte wurden bei -80 °C gelagert.

In Palmerston North gewonnene Koextrakte wurden mit RNase Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben behandelt, lyophilisiert (Dura-Dry Gefrier-trockner, FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA) und für weitere Analysen nach Bayreuth gesendet.

2.8.2 Auftrennung von DNA und RNA

Die chromatographische Auftrennung von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNA/DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben („Protocol for Isolation of Total RNA and Genomic DNA from Bacteria“, für RNA-Mengen < 40 µg; ab Schritt 3).

Alternativ wurden DNA und RNA durch einen enzymatischen Verdau aufgetrennt. Die Koextrakte wurden aufgeteilt (1 : 1) und die eine Hälfte mit RNase, die andere Hälfte mit DNase nach Herstellerangaben behandelt. DNA-Proben wurden bei -20 °C und RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

2.8.3 Reinheitskontrolle und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Qualität und Quantität der Nukleinsäuren wurden durch spektrophotometrische Messungen mit NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und der dazugehörigen Software überprüft. Bestimmt wurden die Absorptionen bei 260 nm, 280 nm und 230 nm. Eine Absorptionseinheit bei A_{260} entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg ml⁻¹ und einer RNA-Konzentration von 33 µg ml⁻¹ (Sambrook und Russell, 2001; Lottspeich und Engels, 2006). Der Koeffizient $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ gibt Aufschluss über eine mögliche Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen oder Phenol und liegt im Idealfall zwischen 1,6 und 2,0 (Sambrook und Russell, 2001). Aus dem Verhältnis $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ lassen sich Rückschlüsse auf eine Verunreinigung mit Huminsäuren ziehen, da diese bei 230 nm eine starke Absorption zeigen (Tsutsuki und Kuwatsuka, 1979).

Alternativ wurden Nukleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen und mitgeführten Standardreihen quantifiziert (Sambrook und Russell, 2001). Die Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten mit Quant-iT-PicoGreen für DNA und Quant-iT-RiboGreen für RNA (beide Invitrogen, Paisley, UK) entsprechend der Herstellerangaben mit einem FLx800 Microplate Fluorimeter (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) und der dazugehörigen Software Gen5.

2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente wurden ihrer Größe nach durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese mit einer Agarose-Konzentration von 1 % (w/v) aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Für die Herstellung der Gele wurde Agarose zusammen mit 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA pH 8 [Sambrook und Russell, 2001]), der auch als Laufpuffer diente, aufgekocht. Zur späteren Visualisierung der Nukleinsäuren wurde in das handwarme, flüssige Gel Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) mit einer Endkonzentration von $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ gegeben. Die Gele wurden in einem Gelgießstand gegossen und nach Verfestigung in eine Elektrophorese-Kammer (Techne, Jahnsdorf, Deutschland) überführt. Es wurden jeweils 5 μl Probe mit 1 μl 6 x Blue Orange Ladepuffer (Promega, Madison, WI, USA) oder 1 μl selbst hergestelltem 6 x Ladepuffer (0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 55 % Glycerin) vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Längenstandard wurden 2 μl des Markers MWM-1 (200 - 10.000 bp) bzw. MWM-2 (50 - 2.000 bp; beide Bilatec, Viernheim, Deutschland) in die äußersten Geltaschen pipettiert. Je nach Größe des Gels erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 60 - 140 V für 20 - 90 min (Power-Pak 3000, BioRad, Richmond, CA, USA). Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht auf einem UV-Flächenstrahler (UVT-20M, Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte photographisch mit der Digital-Kamera Canon PowerShot G5 (Canon, Krefeld, Deutschland) und der dazugehörigen Software Remote Capture. Die Länge der Nukleinsäurefragmente wurde relativ zum Standard abgeschätzt.

2.8.5 rRNA basierte Stabile-Isotopenbeprobung (RNA-SIP)

2.8.5.1 Prinzip

Die Stabile-Isotopenbeprobung („stable isotope probing“, SIP) ist eine Methode zur Identifikation von unkultivierten Mikroorganismen, die ein mit Isotopen (z. B. ^{13}C) markiertes Substrat assimilieren und für die Synthese von Biomolekülen nutzen (Dumont und Murrell, 2005; Friedrich, 2006b). Eine Umweltprobe wird mit einem Überschuss an ^{13}C -markiertem Substrat inkubiert (Abbildung 10). Aktive Substrat-verwertende Mikroorganismen bauen das schwere Isotop ^{13}C in ihre Nukleinsäuren ein, wodurch sich die Dichte der Nukleinsäuren erhöht (Meselson und Stahl, 1958). Die kompletten Nukleinsäuren werden extrahiert und die DNA wird von der RNA abgetrennt. Bei der rRNA basierten Stabilen-Isotopenbeprobung (RNA-SIP) wird die isotopisch ‚schwere‘ ^{13}C -markierte RNA von der isotopisch ‚leichten‘ ^{12}C -RNA durch Dichtegradientenzentrifugation (isopyknische Zentrifugation, Ultrazentrifugation) und anschließende Fraktionierung getrennt. Nach Präzipitation der RNA aus den einzelnen

Fractionen wird die RNA in cDNA transkribiert (RT-PCR). Abschließend werden aktive ^{13}C -Substrat-verwertende Mikroorganismen über molekularbiologische Techniken (Klonierung und Sequenzierung der 16S cDNA, Fingerprint-Analysen) identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-SIP eingesetzt, um aktive Glucose-verwertende Mikroorganismen der Domäne *Bacteria* aus dem Regenwurmdarm zu identifizieren. Die RNA-SIP wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von Whiteley *et al.* (2007) durchgeführt.

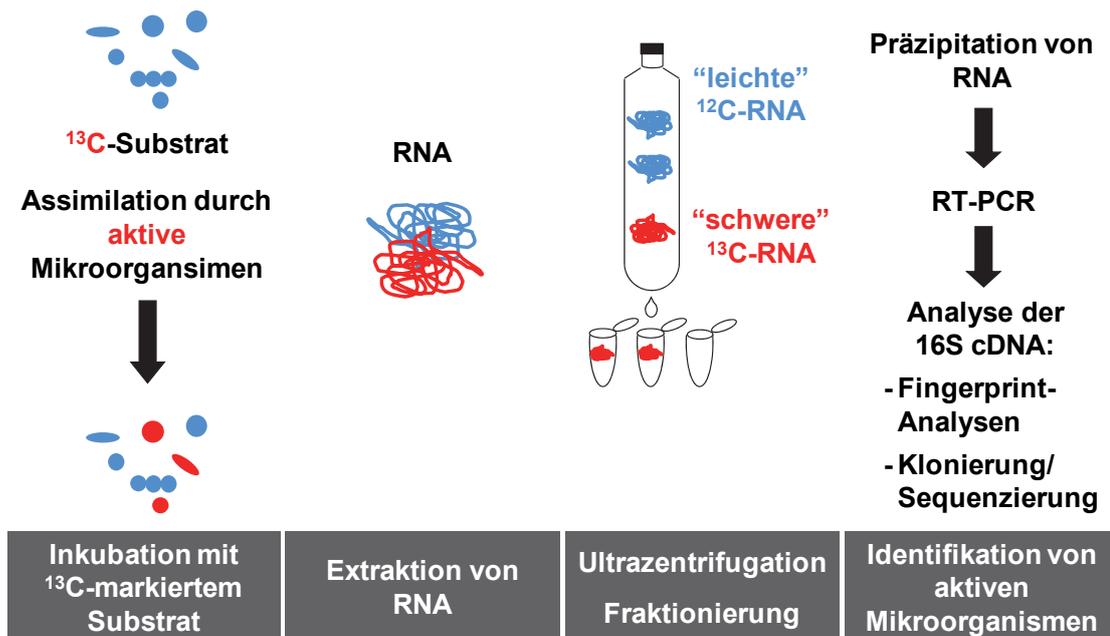


Abbildung 10. Prinzip der rRNA basierten Stablen-Isotopenbeprobung (modifiziert nach Friedrich, 2006a).

2.8.5.2 Dichtegradientenzentrifugation (Ultrazentrifugation)

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde RNA aus homogenisiertem Verdauungstraktinhalt eingesetzt, der mit ^{13}C -markierter Glucose inkubiert wurde (2.5.4.2). Es wurden 500 ng RNA mit 1 ml Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA)-Gradientenlösung (Tabelle 8) gemischt und in ein 5-ml-Zentrifugenröhrchen (OptiSeal Polyallomer Zentrifugationstubes, 13 x 48 mm; Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA) pipettiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden bis zum Halsansatz mit Gradientenlösung aufgefüllt, auf einen maximalen Gewichtsunterschied von 0,05 g austariert und mit einem Plastikstopfen verschlossen. Die Zentrifugenröhrchen wurden in den VTi 65.2 Vertikalrotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) eingesetzt, mit Platzhaltern (OptiSeal Tube Space, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) versehen und mit Schrauben (60 inch-pounds) verriegelt. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in einer LE-70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter,

Fullerton, CA, USA) unter Vakuum bei $130.000 \times g$ ($37.800 \text{ U min}^{-1}$) und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 62 h. Nach der Zentrifugation wurde der Rotor nicht abgebremst, sondern lief bis zu seinem Stillstand aus. Bei jeder Zentrifugation wurde die gleiche Gradientenlösung verwendet und eine Kontrolle ohne RNA mitgeführt.

Tabelle 8. Zusammensetzung der CsTFA-Gradientenlösung.

Bestandteil	Volumen
CsTFA (Dichte $2,0 \pm 0,05 \text{ g ml}^{-1}$, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)	4,61 ml
Formamid	175 μl
Gradientenpuffer (100 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA)	bis Dichte von $1,790 \pm 0,005 \text{ g ml}^{-1}$ erreicht ist (2.8.5.4)

2.8.5.3 Fraktionierung der Gradienten

Für die manuelle Fraktionierung mit einer Peristaltikpumpe (Econo Pump1, BioRad, Hercules, CA, USA) wurden die Zentrifugenröhrchen senkrecht in ein Stativ eingespannt (Abbildung 11).



Abbildung 11. Fraktionierung des Gradienten nach der Ultrazentrifugation.

An den Silikonschlauch (Innendurchmesser 1,6 mm) der Pumpe wurde eine Kanüle (23G x 1") gesteckt, die mit der Öffnung nach oben weisend in den Hals des Zentrifugenröhrchens gestochen wurde. Mit einer zweiten Kanüle wurde eine Öffnung in den

Boden des Zentrifugenröhrchens gebohrt. Bei einer Fließgeschwindigkeit von $0,45 \text{ ml min}^{-1}$ wurde Brilliantblau-gefärbtes DEPC- H_2O auf die RNA-Gradientenlösung gepumpt. Die aus der unteren Öffnung austretende Flüssigkeit wurde in Reaktionsgefäßen gesammelt, welche im 60-s-Takt gewechselt wurden. Pro Zentrifugenröhrchen wurden elf Fraktionen à ca. $450 \mu\text{l}$ gewonnen, wobei die elfte Fraktion bereits leicht bläulich gefärbt war.

2.8.5.4 Dichtebestimmung

Die Schwebdichte der Gradientenlösung (Tabelle 8) und der fraktionierten Kontrollen ohne RNA wurde durch Abwiegen auf einer Feinwaage (Analytic AC 120 S, Sartorius, Garching, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden in einem Wasserbad auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert, kräftig gevortext und das Gewicht vor und nach der Entnahme von $100 \mu\text{l}$ bestimmt. Die Dichtebestimmung wurde zehn Mal pro Probe durchgeführt.

2.8.5.5 Präzipitation der RNA

Aufgrund der geringen RNA-Konzentrationen pro Fraktion wurde die RNA mit dem „Carrier“ Glykogen kopräzipitiert (Degelmann *et al.*, 2009). Es wurden $100 \mu\text{l}$ Fraktion mit $65 \mu\text{l}$ Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2), $6,8 \mu\text{l}$ Glykogen-Lösung (10 mg ml^{-1}) und $510 \mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol (96 %) vermischt und die RNA zusammen mit dem Glykogen über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation ($13.000 \times g$, 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit $500 \mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($13.000 \times g$, 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und Abnahme des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in $20 \mu\text{l}$ RNase-freiem dd H_2O aufgenommen. Die Konzentration der gefällten RNA wurde mit Quant-iT-RiboGreen bestimmt (2.8.3). RNA-Proben wurden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.8.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA (RT-PCR)

RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Paisley, UK) in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurden $4 \mu\text{l}$ VILO Reaktionsmix (5 x), $2 \mu\text{l}$ SuperScript Enzym Mix (10 x), $0,5 \mu\text{l}$ RNase-Inhibitor (RNaseOUT), $3,5 \mu\text{l}$ RNase-freies H_2O und $10 \mu\text{l}$ RNA vermischt und in einem Thermocycler (2.8.7.1) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min und anschließend bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ für 90 min inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde durch Inaktivierung des Enzyms bei $85 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min gestoppt. cDNA-Proben wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei allen RT-PCR-Reaktionen wurden eine Negativkontrolle (Ansatz mit RNase-freiem dd H_2O anstatt des Templates) und eine Positivkontrolle (Bestandteil des SuperScript VILO cDNA Synthesis Kits) mitgeführt.

2.8.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ermöglicht die spezifische Amplifikation von Genfragmenten und gliedert sich in drei Schritte, die in Zyklen wiederholt werden: Denaturierung der Matrizen-DNA, Annealing der Primer und Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Saiki *et al.*, 1988).

2.8.7.1 Allgemein

Für die PCR wurden die Thermocycler Biometra TGradient (Biometra, Göttingen, Deutschland), Primus 96 advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und PeqSTAR (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Amplifikation von 16S rRNA Gen- und *nosZ* Genfragmenten sind in Tabelle 9 aufgeführt und wurden von der Firma Biomers GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen.

Die PCR-Reaktionsansätze waren für jedes Zielgen unterschiedlich zusammengesetzt (Tabelle 10) und hatten je nach Bedarf ein Volumen von 25 µl, 50 µl oder 100 µl. Die Volumenanteile wurden mit der Probenzahl multipliziert und auf Eis zusammenpipettiert. Bei allen PCR-Reaktionen wurden eine Negativkontrolle (Ansatz mit PCR-H₂O, Negativ-Kontrolle der RT-PCR oder RNA anstatt der Matrizen-DNA) und - falls vorhanden - eine Positivkontrolle mitgeführt. Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Der Erfolg der PCR wurde stets mit einem Agarosegel (2.8.4) überprüft.

Tabelle 9. Position, Sequenz und Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer.

Primername ^a	Position	Sequenz (5' → 3') ^b	Zielgen	T_m (°C) ^c	Referenz
nosZ1181F	1169 - 1188 ^d	CGC TGT TCI TCG ACA GYC AG	<i>nosZ</i> , universell	54 - 58	Rich <i>et al.</i> , 2003
nosZ1880R	1869 - 1850 ^d	ATG TGC AKI GCR TGG CAG AA	<i>nosZ</i> , universell	50 - 56	Rich <i>et al.</i> , 2003
27f	8 - 25 ^e	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	46 - 48	Lane, 1991
27f-DY681 ^f	8 - 25 ^e	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	46 - 48	Lane, 1991
907r	926 - 907 ^e	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	16S rRNA, universell	46 - 48	Lane, 1991
1492r	1510 - 1492 ^e	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	16S rRNA, universell	47	Lane, 1991
M13uniF	n. a. ^g	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	pGEM-T Multiple Cloning Site	48	Messing, 1983
M13revR	n. a. ^g	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	pGEM-T Multiple Cloning Site	48	Messing, 1983

^a Vorwärtsprimer sind mit F bzw. f („forward“) gekennzeichnet, Rückwärtsprimer mit R bzw. r („reverse“).

^b M = A/C, R = A/G, H = A/T/C, W = A/T, K = G/T, D = G/A/T, Y = C/T, N = A/T/G/C, I = Inosin, S = G/C, B = G/C/T (nach IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry).

^c Schmelztemperatur T_m berechnet nach Marmur und Doty (1962).

^d Positionen bezogen auf das *nosZ* Gen (1905 bp) von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (X65277).

^e Positionen bezogen auf die 16S rRNA von *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978).

^f 5'-Modifikation mit dem Infrarotfarbstoff DY-681 (fluoreszenzmarkierter Primer).

^g n. a., nicht anwendbar.

Tabelle 10. Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze für ein Endvolumen von 50 µl.

	PCR		
	<i>nosZ</i> Gen	16S rRNA Gen	M13
PCR-Puffer (10 x; Bilatec ^a) ^b	-	-	5 µl
Mg ²⁺ (25 mM; 5Prime ^c bzw. Bilatec)	2 µl	2 µl	5 µl
BSA (3 mg ml ⁻¹)	2 µl	-	-
dNTP-Mix (2 mM; Eppendorf)	-	-	5 µl
5Prime-Mastermix (2,5 x; 5Prime) ^d	20 µl	20 µl	-
Vorwärtsprimer (10 µM) ^e	3 µl	3 µl	1 µl
Rückwärtsprimer (10 µM) ^e	3 µl	3 µl	1 µl
Taq-Polymerase (5 U µl ⁻¹ ; Bilatec)	-	-	0,2 µl
Matrizen-DNA	1 - 6 µl	0,5 - 3,5 µl	Zellmasse
PCR-H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

^a Bilatec (Viernheim, Deutschland).

^b Bestandteile des PCR-Puffers (10 x): 0,8 M Tris-HCl (pH 9,4 - 9,5), 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,2 % (w/v) Tween-20.

^c 5Prime (Hamburg, Deutschland).

^d Bestandteile des 5Prime-Mastermixes (2,5 x): Taq DNA Polymerase (0,06 U µl⁻¹), 2,5 x Reaktionspuffer (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl [pH 8,4], 4 mM Mg²⁺, 0,25 % Nonidet-P40), je 500 µM von jedem dNTP, Stabilisatoren.

^e Beschreibung der Primer in Tabelle 9.

Tabelle 11. PCR-Programme.

#	Schritt	Primerkombination ^a			
		nosZ1181F/ nosZ1880R	27f/1492r	27f ^b /907r	M13uniF/ M13revR
		T (°C)/Zeit (min)			
1	Anfangsdenaturierung	94/10	95/10	95/5	94/10
2	Denaturierung	94/0,5	95/1	95/1	-
3	Annealing	58/1	40/1	40/1	-
4	Elongation	72/1	72/1	72/1,5	-
5	Zyklus: Schritt 2-4	10 x ↓ -0,5 °C ^c	5 x ↑ +0,5 °C ^d	4 x	-
6	Denaturierung	94/0,5	95/0,7	95/0,5	94/1
7	Annealing	52/1	43/0,7	50/0,5	50/1
8	Elongation	72/1	72/1	72/1,5	72/1
9	Zyklus: Schritt 6-8	30 x	35 x	30 x	35 x
10	End-Elongation	72/10	72/5	72/5	72/5
11	Ende	8/∞	8/∞	10/∞	10/∞

^a Beschreibung der Primer in Tabelle 9.

^b alternativ mit 27f-DY681.

^c ↓, „Touch Down“: Absenkung der Annealing-Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus.

^d ↑, Erhöhung der Annealing-Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus.

2.8.7.2 Strukturelles Gen *nosZ*

Mit der Primerkombination nosZ1181F/nosZ1880R (Tabelle 9) wurde ein etwa 700 bp-langes *nosZ* Genfragment amplifiziert. Als Matrize diente hochmolekulare DNA (ca. 20.000 bp) aus Boden sowie aus Kropf/Magen und Enddarm des Regenwurms, da diese Bereiche des Verdauungstrakts hohe Denitrifikationsaktivitäten aufweisen (3.2.2 und 3.2.5.1). BSA wurde zugegeben (Tabelle 10), um die Störung der PCR durch Huminsäuren zu reduzieren. Zur Erhöhung der Amplifikationsspezifität wurde das „Touch Down“-Verfahren eingesetzt (Tabelle 11). Dabei beginnt das Annealing etwa 10 °C über der errechneten Schmelztemperatur T_m der Primer und die Annealing-Temperatur wird bis zum Erreichen der für die PCR optimalen Annealing-Temperatur in jedem Zyklus schrittweise abgesenkt.

Dadurch wird eine unspezifische Bindung der Primer an Nicht-Ziel-Sequenzen zu Beginn der PCR vermieden. Die PCR-Produkte wurden für die Erstellung von Genbibliotheken (2.8.10) genutzt. Hierfür wurden die PCR-Produkte für Kropf/Magen und Enddarm zu gleichen Teilen vereint.

2.8.7.3 16S rRNA Gen

Für die Amplifizierung von bakteriellen 16S rRNA Genfragmenten aus cDNA des Regenwurmverdauungstraktinhalts wurden zwei verschiedene Primerkombinationen verwendet. Mit der Primerkombination 27f/1492r (Tabelle 9) wurde annähernd das komplette 16S rRNA Gen (ca. 1.460 bp) amplifiziert, während mit den Primern 27f und 907r (Tabelle 9) ein etwa 880 bp-langes Fragment amplifiziert wurde. Da nur die Primerkombination 27f/907r starke, singuläre Banden im Agarosegel lieferte, wurde diese Kombination für die Fingerprint-Analyse (2.8.9) und die Erstellung der Genbibliotheken (2.8.10) eingesetzt. Als Folge eines Amplifikationsfehlers während der PCR können chimärische Sequenzen auftreten, die aus zwei oder mehreren phylogenetisch unterschiedlichen Genfragmenten bestehen (Liesack *et al.*, 1991; Koczyński *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu chimärischen Sequenzen von strukturellen Genen, die häufig an einer Leserasterverschiebung zu erkennen sind und dann eliminiert werden, bleiben chimärische 16S rRNA Gensequenzen unerkannt und suggerieren die Detektion von nicht existierenden Mikroorganismen (Hugenholtz und Huber, 2003). 16S rRNA Gensequenzen wurden daher auf Chimären untersucht (2.8.12) und bei einem Positivbefund von weiteren Analysen ausgeschlossen.

2.8.7.4 Überprüfung des Klon-Inserts (M13-PCR)

Die Klone wurden mit Hilfe einer M13-PCR auf Insert-haltige Plasmide überprüft. Die Amplifikation des Inserts erfolgte mit den Primern M13uniF und M13revR (Tabelle 9 und Tabelle 11), welche die Insertionsstelle („multiple cloning site“, MCS) des Plasmids flankieren. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde von der Agarplatte etwas Zellmasse abgenommen und als Matrize für die PCR eingesetzt (Tabelle 10). Die Insert-positiven Klone wurden anhand ihrer Fragmentlänge identifiziert, die der Länge des amplifizierten Genfragments plus ca. 150 bp entsprach.

2.8.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

2.8.8.1 Gelaufreinigung

Traten bei den PCR-Produkten Mehrfachbanden auf, wurde der gesamte Reaktionsansatz über ein Agarosegel (2.8.4) mit modifiziertem TAE-Puffer (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) aufgereinigt. Unter UV-Licht wurde die gewünschte DNA-

Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Montage Gel Extraction Kits (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Konzentration der DNA wurde durch spektrophotometrische Messungen (2.8.3) bestimmt.

2.8.8.2 Direkte Aufreinigung

PCR-Produkte, die keine Mehrfachbanden aufwiesen, wurden mit dem MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Bei einer großen Probenanzahl wurde ein Platten-Filtrationssystem (Millipore Multiscreen, 96-well Filtration System, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) verwendet. Die Konzentration der DNA wurde durch spektrophotometrische Messungen (2.8.3) bestimmt.

2.8.9 Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (tRFLP)-Analyse

Bei einer terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (tRFLP)-Analyse werden PCR-Produkte, die an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, einem Restriktionsverdau mit einer Restriktionsendonuklease (Typ II) unterzogen. Die terminalen, markierten Fragmente (tRFs) werden anschließend auf einem Polyacrylamidgel größenabhängig aufgetrennt (Liu *et al.*, 1997). Die unterschiedlichen tRFs repräsentieren hierbei verschiedene Sequenzen und bilden somit ein Profil der mikrobiellen Gemeinschaft ab (Fingerprint). In Verbindung mit der Stablen-Isotopenbeprobung (2.8.5) wurde die tRFLP-Analyse angewendet, um die Anreicherung der RNA mit dem schweren Isotop ^{13}C zu überprüfen.

2.8.9.1 Markierung mit fluoreszenzmarkiertem Primer

Bei einer PCR zur Amplifizierung des 16S rRNA Genfragments (ca. 880 bp) wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-681 markierter Vorwärtsprimer verwendet (Tabelle 9). Die PCR wurde wie oben beschrieben (2.8.7.3) durchgeführt. Als Matrize diente cDNA der Gradientenfractionen 1 bis 11. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel (2.8.8.1) aufgereinigt.

2.8.9.2 Mung Bean Endonuklease-Verdau

Überstehende einzelsträngige Enden an den PCR-Produkten können tRFs mit falscher Fragmentlänge (Pseudo-tRFs) verursachen (Egert und Friedrich, 2003). Die PCR-Produkte wurden daher mit einer Mung Bean Endonuklease (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) behandelt, die einzelsträngige Enden abverdaut. Auf je 100 μl PCR-Produkt wurden

11 μl Reaktionspuffer NEB2 (10 x) und 0,4 μl Mung Bean Endonuklease (10 U μl^{-1}) gegeben. Die Proben wurden bei 30 °C für 30 min verdaut und anschließend über ein Platten-Filtrationssystem (2.8.8.2) aufgereinigt.

2.8.9.3 Restriktionsverdau

Das bakterielle 16S rRNA Genfragment wurde mit der Restriktionsendonuklease MspI (5' → 3' Erkennungssequenz: C[^]CGG; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verdaut (Degelmann *et al.*, 2009). Zu 7 μl aufgereinigtem PCR-Produkt wurden je 1 μl BSA (10 x), Reaktionspuffer NEB2 (10 x) und Restriktionsenzym (2 U μl^{-1}) gegeben. Der Restriktionsverdau wurde bei 37 °C für 4 h durchgeführt und anschließend durch Inaktivierung des Enzyms bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die Konzentration der verdauten DNA wurde mit Quant-iT-PicoGreen (2.8.3) bestimmt und mit PCR-H₂O auf 0,5 ng μl^{-1} verdünnt.

2.8.9.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die verdünnten Proben und der Längenstandard (75 - 1.000 bp, Microzone 15a, Microzone Ltd, Haywards Heath, UK) wurden im Verhältnis 1 : 1 mit der Stop-Solution (Licor Biosciences, Lincoln, USA) gemischt, bei 95 °C für 3 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Glasplatten der Gelgießapparatur wurden aufeinanderfolgend mit ddH₂O, Ethanol (70 %) und Isopropanol (80 %) gründlich gereinigt. Im Bereich des Gelkamms wurden die Glasplatten mit ca. 200 μl Bino-Silane (plusOne Bino-Silane und 10 % Eisessig, 1 : 1) betupft. Die Platten wurden getrennt durch Spacer in die Gelgießapparatur eingespannt und schräg in den Gelgießstand eingehängt. In einem Becherglas wurden unter leichtem Rühren 15 g Harnstoff (Roche Pharma, Reinach, Schweiz) in 3,75 ml 40 % Acrylamid/Bis Solution (37,5 : 1), 6 ml 5 x TBE Puffer (450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA pH 8 [Sambrook und Russell, 2001]) und 9,25 ml ddH₂O gelöst. Nach Filtration der Lösung (Porendurchmesser 0,2 μm) wurde die radikalische Polymerisation durch Zugabe von 175 μl Ammoniumpersulfat (APS; 438 mM) und 17 μl N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Das Polyacrylamidgel wurde mit einer Spritze luftblasenfrei zwischen die Glasplatten aufgetragen und mit dem Kamm versehen. Die Polymerisation erfolgte horizontal bei 25 °C für ca. 50 min. Nach Reinigung der Glasplattenaußenseiten mit Ethanol (70 %) wurde das Gel in den Sequenzierautomaten NEN4300 (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) eingehängt. In das obere und untere Pufferreservoir wurde 1 x TBE Puffer (5 x TBE Puffer mit ddH₂O verdünnt) gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und Harnstoff- und Gelreste wurden mit einer Spritze aus den Geltaschen gespült. Nach einem Vorlauf bei 1.200 V und 45 °C für 25 min wurden die Proben aufgetragen. Es wurden 0,5 μl Längenstandard und 0,8 μl Probe in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 1.200 V und 45 °C für 4 h durchgeführt. Die gescannten Gelbilder wurden im TIFF-Format exportiert.

2.8.10 Klonierung

Bei der Klonierung wird Fremd-DNA in einen Vektor eingeführt (Ligation) und anschließend in Wirtszellen eingebracht (Transformation) (Sambrook und Russell, 2001). Mit der Klonierung der *nosZ* Genfragmente (2.8.7.2) wurde die Firma Agowa Genomics (Berlin, Deutschland) beauftragt. Die Klonierung der 16S rRNA Genfragmente (2.8.7.3) wurde mit dem pGEM-T Vector System II (Promega, Madison, WI, USA) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.8.10.1 Ligation

Bei der Ligation wurde das aufgereinigte PCR-Produkt (2.8.8.1) mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase in die MCS des Vektors (pGEM-T) eingebaut. Der Vektor ist ein Plasmid von etwa 3.000 bp Länge und verfügt neben einer Ampicillinresistenz über das Gen *lacZ*, welches das Enzym β -Galactosidase codiert und unmittelbar in der MCS liegt. Wird die Fremd-DNA erfolgreich in den Vektor ligiert, ist die Expression der β -Galactosidase im Wirtstamm nach der Transformation nicht mehr möglich. Des Weiteren befinden sich an der MCS 3'-Thymin-Überhänge, welche zur Steigerung der Ligationseffizienz beitragen, da die verwendete DNA-Polymerase matrizenunabhängig ein zusätzliches Adenin an das 3'-Ende des Amplifikats anfügt. Der Ligationsansatz wurde wie in Tabelle 12 beschrieben zusammenpipettiert, gemischt und über Nacht im Wasserbad (Ausgangstemperatur 25 °C) bei 4 °C inkubiert. Dadurch kühlte der Ansatz langsam ab, wobei die dazwischen liegende, optimale Ligationstemperatur durchschritten wurde.

Tabelle 12. Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

Bestandteil	Volumen (μ l)
2 x Rapid Ligation Buffer (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM Dithiothreitol, 2 mM ATP, 10 % [v/v] Polyethylenglykol)	5
pGEM-T Vektor (50 ng μ l ⁻¹)	1
PCR-Produkt (Insert)	0,5 - 3
T4 DNA Ligase (3 Weiss-Einheiten μ l ⁻¹)	1
PCR-H ₂ O	ad 10

Die Menge des eingesetzten PCR-Produkts richtete sich nach dessen Konzentration. Das Molverhältnis Insert : Vektor sollte zwischen 1 : 8 und 8 : 1 liegen. Die optimale Menge ist abhängig von der Länge des Inserts und kann mit Gleichung 8 berechnet werden. Für das 16S rRNA Genfragment mit einer Länge von 880 bp erzielte ein Insert : Vektor-Verhältnis von 3 : 1 die höchste Ligationseffizienz.

Gleichung 8. Für die Ligation benötigte Menge an PCR-Produkt.

$$\text{Insertmenge (ng)} = \frac{\text{Vektor (ng)} \cdot \text{Größe des Inserts (kb)}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} \cdot (\text{Molverhältnis Insert : Vektor})$$

2.8.10.2 Transformation

Im Anschluss an die Ligation wird der gesamte Vektor in kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stamms JM 109 (High Efficiency > 10⁸ cfu µg⁻¹) eingeschleust. Die Zellen sind derart vorbehandelt, dass sie leicht Plasmide aufnehmen. Zudem besitzen sie weder eine Ampicillinresistenz noch ein *lacZ*-Gen, was für die anschließende Auswahl von Klonen entscheidend ist. Die kompetenten Zellen wurden entweder von Promega (Madison, WI, USA) erworben oder von Ralf Mertel (Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth) hergestellt. Hierfür wurde etwas Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse abgenommen und auf einer LB-Platte (2.7.1.2.5) ausgestrichen. Nachdem Kolonien gewachsen waren, wurde eine davon gepickt und in 5 ml LB-Medium (2.7.1.2.4) eine Übernachtskultur (ÜNK) angelegt. Mit der ÜNK wurden am nächsten Tag 8 x 50 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen im Verhältnis 1 : 50 beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,5 unter leichtem Schütteln bei 37 °C für etwa 5 h inkubiert. Die Kulturen wurden in sterile 50-ml-Nunc-Röhrchen überführt und in einer Beckmann J2-HS Zentrifuge mit JA-20 Rotor (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA; 4.000 U min⁻¹, 5 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in je 15 ml eiskaltem Transformationspuffer 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ · 4 H₂O, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert) aufgenommen und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4.000 U min⁻¹, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in je 2 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 8,0, sterilfiltriert) resuspendiert. Die Zellen wurden in 210 µl-Portionen in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. In einem auf Eis vorgekühlten Reaktionsgefäß wurden 2 µl Ligationsansatz mit 50 µl kompetenten Zellen vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In einem auf 42 °C temperierten Wasserbad wurden die Zellen für 45 - 50 s einem Hitzeschock ausgesetzt und unmittelbar danach für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium (2.7.1.2.3) wurde der Transformationsansatz für 1,5 h bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Je 330 µl wurden auf eine LB-Platte mit Ampicillin/IPTG/X-Gal (2.7.1.2.4) pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bei 4 °C gelagert.

2.8.10.3 Klonscreening

Auf den LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal (2.7.1.2.6) wachsen nur Zellen, die durch Aufnahme eines Plasmids die Ampicillinresistenz erlangt haben. Ob die aufgenommenen Plasmide auch über ein Insert verfügen, wurde mithilfe des „Blau/Weiß-Screenings“ überprüft (Sambrook und Russell, 2001). Im Fall einer Insertion eines DNA-Fragments in das *lacZ*-Gen sind die Zellen nicht mehr in der Lage, das Enzym β -Galactosidase zu exprimieren, obwohl das *lac*-Operon durch IPTG induziert wurde. Die gewünschten Klone erscheinen weiß, da das Substrat-Analogon X-Gal (weiß) nicht mehr in den Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo (blau) umgewandelt werden kann. Pro Transformationsansatz wurden willkürlich weiße Klone mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf eine frische LB-Platte mit Ampicillin/IPTG/X-Gal transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um Klone zu identifizieren, die ein Insert mit der gewünschten Größe aufwiesen, wurde eine PCR durchgeführt, welche die Amplifikation des Inserts zum Ziel hatte (2.8.7.4).

2.8.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung der *nosZ* Genfragmente erfolgte bei Agowa Genomics (Berlin, Deutschland). Mit der Sequenzierung des 16S rRNA Gen-Inserts wurde MacroGen (Kumchun-ku Seoul, Korea) beauftragt. Als Sequenzierprimer wurde M13uniF (Tabelle 9) gewählt.

2.8.12 Sequenzanalyse

Die Gensequenzen wurden mit MEGA (Versionen 4.0 und 4.1 Beta; <http://www.megasoftware.net>; Tamura *et al.*, 2007) von den Vektorresten befreit und in der korrekten Orientierung angeordnet. Mit dem Online-Tool BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2000) wurden alle Sequenzen auf Ähnlichkeiten mit vorhandenen Datenbankeinträgen des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft und die nächstverwandte Sequenz sowie die Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies ermittelt. Sequenzähnlichkeiten innerhalb einer Gruppe von Sequenzen (z. B. innerhalb einer Genbibliothek) wurden über Distanzmatrizen berechnet.

Chimärische 16S rRNA Gensequenzen wurden mit Hilfe des Online-Tools Ribosomal Database Project (RDP) Chimera Check 2.7 (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi>; Cole *et al.*, 2003) und BLASTn identifiziert und korrigiert, indem die Schnittstelle zwischen den phylogenetisch unterschiedlichen Genfragmenten ermittelt und das kürzere Genfragment jenseits der Schnittstelle gelöscht wurde. War die korrigierte Gensequenz < 460 bp, wurde sie komplett eliminiert. Die Klassifizierung der 16S rRNA Gensequenzen auf Familien-Ebene

erfolgte mit dem Online-Tool RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>; Wang *et al.*, 2007). 16S rRNA Gensequenzen, deren Klassifizierung mittels RDP Classifier zu weniger als 80 % gesichert war, wurden über Distanzmatrizen, BLASTn und Stammbaumberechnungen (2.8.13) klassifiziert. War eine 16S rRNA Gensequenz zu < 87,5 % ähnlich zu Sequenzen von kultivierten Spezies, wurde diese in eine neue Familienentsprechende Gruppe eingeordnet (Yarza *et al.*, 2008). Valide Namen von Spezies, Gattungen und höheren Taxa wurden mit Hilfe der Datenbank LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; <http://www.bacterio.net>; Euzéby, 2010) verifiziert.

In MEGA (Version 4.0) wurden *nosZ* Sequenzen in ihre Aminosäuresequenz übersetzt, über den ClustalW-Algorithmus aligniert und das Nukleinsäurealignment basierend auf dem Aminosäurealignment manuell korrigiert.

Das Alignment der 16S rRNA Gensequenzen wurde mit dem Webaligner SINA (SILVA Incremental Aligner; <http://www.silva.de>; Pruesse *et al.*, 2007) durchgeführt. Das 16S rRNA Genalignment wurde zusammen mit der SILVA 16S rRNA Gen Datenbank (Version SSURef_100_SILVA_02_08_09_opt; <http://www.silva.de>; Pruesse *et al.*, 2007) in ARB (Version 2005; <http://www.arb-home.de>; Ludwig *et al.*, 2004) importiert und dort manuell nacheditiert.

2.8.13 Stammbaumberechnungen

Die Stammbaumberechnungen wurden in MEGA (Versionen 4.0 und 4.1 Beta) und ARB (Version 2005) durchgeführt. Die Lage und Anzahl der berücksichtigten Positionen richtete sich nach der Länge der Fragmente, die in die Berechnungen einbezogen wurden.

nosZ Stammbäume wurden auf Basis des Aminosäurealignments mit der „Neighbor-Joining“-Methode („Distanzmatrix“; Saitou und Nei, 1987) und einem Bootstrap-Test (Felsenstein, 1985) mit 10.000 Replikaten durchgeführt. Verzweigungen, die in weniger als 50 % der Einzelbäume auftraten, wurden als ungesicherte Verzweigungen definiert und als Multifurkationen gezeichnet (Ludwig *et al.*, 1998).

Die Berechnung der auf 16S rRNA Gensequenzen basierenden Stammbäume erfolgte mit den Algorithmen „Maximum Likelihood“ (AxML) und „Neighbor-Joining“, wobei der „Neighbor-Joining“-Baum einem Bootstrap-Test mit 10.000 Replikaten unterzogen wurde und als Grundgerüst diente.

Die Stammbäume wurden mit dem Grafikprogramm iGrafx Designer (Micrografx, Tualatin, OR, USA) bearbeitet. Details zu den Baumberechnungen sind in der Legende des jeweiligen Stammbaums aufgeführt.

2.8.14 Auswertung der Genbibliotheken

2.8.14.1 Extrapolation

Die Anzahl der in einer Genbibliothek zu erwartenden Genotypen wurde mit statistischen Methoden abgeschätzt. Die Gensequenzen wurden zu künstlichen taxonomischen Einheiten („operational taxonomic units“, OTUs) zusammengefasst.

Translatierte *nosZ* Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von $\geq 86\%$ wurden mit Distanzmatrizen und der Software DOTUR (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>; Schloss und Handelsman, 2005) in Spezies-entsprechende OTUs eingeteilt. Eine *nosZ* Aminosäureähnlichkeit von 86% entspricht mit 90% iger Wahrscheinlichkeit einer 16S rRNA Genähnlichkeit von $\geq 97\%$ (Palmer *et al.*, 2009), die als konservativer Schwellenwert zur Spezies-Differenzierung herangezogen werden kann (Stackebrandt und Goebel, 1994; Stackebrandt und Evers, 2006).

16S rRNA Gensequenzen mit einer Nukleotidsequenzähnlichkeit von $\geq 87,5\%$ wurden unter Verwendung des RDP Classifiers (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>; Wang *et al.*, 2007) und mit Hilfe von Distanzmatrizen sowie Stammbaumberechnungen (2.8.13) zu Familien-entsprechenden OTUs zusammengefasst (Yarza *et al.*, 2008). Die Coverage ist ein Maß für den Anteil der detektierten OTUs an der Gesamtzahl der OTUs in einer Genbibliothek (Good, 1958) und wurde mit Gleichung 9 bestimmt.

Gleichung 9. Coverage.

$$C = \left[1 - \left(\frac{N_{OTUs,min}}{N_{Seq,total}} \right) \right] \cdot 100$$

C, Coverage (%); $N_{OTUs,min}$, Anzahl der OTUs, die nur einmal auftraten; $N_{Seq,total}$, Anzahl aller Sequenzen einer Genbibliothek.

2.8.14.2 Rarefaction

Rarefaction-Methoden ermöglichen den Vergleich von Genbibliotheken mit unterschiedlicher Sequenzanzahl hinsichtlich der Diversität und des Erfassungsgrades. Die Anzahl der erwarteten OTUs wird als Funktion der analysierten Sequenzen in Form einer Rarefaction-Kurve dargestellt. Ein flacher Verlauf der Rarefaction-Kurve zeigt, dass der Großteil der Diversität innerhalb einer Genbibliothek erfasst wurde, während ein steiler Verlauf andeutet, dass bei größerem Erfassungsaufwand eine höhere Diversität zu erwarten ist. Die Berechnung der erwarteten Anzahl der OTUs und der 95% Konfidenzintervalle erfolgte mit der Software aRarefactWin (<http://www.uga.edu/~strata/software>; Holland, 2003)

nach dem Konzept der Hurlbert-Rarefaction (Gleichung 10; Hurlbert, 1971; Heck *et al.*, 1975).

Gleichung 10. Hurlbert-Formel.

$$S_n = \sum_{i=1}^s \left[1 - \frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right]$$

S_n , zu erwartende Artenzahl in einer Probe mit n Individuen; S , Gesamtartenzahl; N , Gesamtindividuenzahl; N_i , Individuenzahl der Art i ; n , standardisierte Probengröße ($n \leq N$).

2.8.15 Sequenzhinterlegung

Alle Gensequenzen aus dieser Arbeit wurden in der öffentlich zugänglichen Datenbank des European Bioinformatics Institute (EMBL Nucleotide Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/embl>) unter einer individuellen Zugangsnummer („Accession Number“) hinterlegt (Tabelle 13).

Tabelle 13. Zugangsnummern der hinterlegten Sequenzen.

Gen	Anzahl der Sequenzen	Zugangsnummern
<i>nosZ</i> Gen	216	FM993316-FM993330, FM993332-FM993353, FM993355-FM993383, FM993385, FM993387-FM993403, FM993405-FM993411, FM993413-FM993420, FN295833-FN295863, FN295865-FN295945, FN295947-FN295951
16S rRNA Gen	707	FN659069-FN659775

2.9 Statistische Verfahren

2.9.1 Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und Fehlerfortpflanzung

Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (S) und Standardfehler ($S_{\bar{x}}$) einer Reihe von Werten x_i wurden nach untenstehenden Formeln (Gleichung 11 bis Gleichung 13) berechnet, wobei n die Anzahl der Werte darstellt und der Laufindex i von 1 bis n läuft (Sachs, 1999). Falls nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse in der Form $\bar{x} \pm S$ dargestellt.

Gleichung 11. Mittelwert.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Gleichung 12. Standardabweichung.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]}$$

Gleichung 13. Standardfehler.

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Bei funktionaler Verknüpfung mehrerer Mittelwerte pflanzen sich die Fehler fort (Fenner, 1931; Sachs, 1999). Bei Addition und Subtraktion von Mittelwerten $\bar{y} = \bar{x} \pm \bar{z}$ wird der Fehler $S_{\bar{y}}$ mit Gleichung 14 berechnet. Bei Multiplikation $\bar{y} = \bar{x} \cdot \bar{z}$ und Division $\bar{y} = \frac{\bar{x}}{\bar{z}}$ gilt Gleichung 15.

Gleichung 14. Fehlerfortpflanzung bei Addition und Subtraktion von Mittelwerten.

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{S_{\bar{x}}^2 + S_{\bar{z}}^2}$$

Gleichung 15. Fehlerfortpflanzung bei Multiplikation und Division von Mittelwerten.

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\left(\frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\bar{z}}}{\bar{z}}\right)^2}$$

2.9.2 Regression

Zur Berechnung von Regressionsgeraden und Bildungs- bzw. Verbrauchsdaten sowie des zugehörigen Bestimmtheitsmaßes (r^2) wurden die Programme „Excel 2000“ und „Excel 2007“ (beide Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet.

2.10 Verwendete Chemikalien und Gase

Doppelt entsalztes Wasser (ddH₂O) wurde mit einer Seralpur Pro 90 CN - Anlage (Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach, Deutschland) gewonnen und wies stets eine Leitfähigkeit kleiner als 0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$ auf. Die eingesetzten Chemikalien stammen, falls nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), BioRad (Richmond, CA, USA), Boehringer (Mannheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Gase wurden von der Firma Linde AG (Höllenriegelskreuth, Deutschland) bezogen. Die Reinheit der Gase ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14. Verwendete Gase und ihre Reinheit.

	Gas							
	Ar	Druckluft	He	CO ₂	CH ₄	N ₂ O	N ₂	H ₂
Reinheit	4,8	DIN 3188	4,6	technisch	3,5	4,5	5,0	5,0

3 ERGEBNISSE

3.1 Denitrifikation und assoziierte Mikroorganismen im Verdauungstrakt von neuseeländischen Regenwürmern (*Lumbricidae* und *Megascolecidae*)

Bisher ist nicht bekannt, ob die Emission von N_2O und N_2 ein universelles Merkmal von Regenwürmern ist und ob dieses unabhängig von der taxonomischen Einordnung und geografischen Verbreitung der Würmer auftritt. In Palmerston North, Neuseeland, wurde daher die Fähigkeit zur N_2O -Emission bei vier Regenwurmartensarten untersucht. *Lumbricus rubellus* und *Aporrectodea rosea* (eingeführte Arten, Familie *Lumbricidae*; Abbildung 5) wurden aus Wiesenboden (Probenahme­fläche PS; Tabelle 2) gesammelt; *Octolasion cyaneum* (eingeführte Art, Familie *Lumbricidae*; Abbildung 5) und *Octochaetus multiporus* (einheimische neuseeländische Art, Familie *Megascolecidae*; Abbildung 5) stammten aus Waldboden (Probenahme­fläche FS; Tabelle 2). Weiterhin wurde die Gemeinschaft denitrifizierender Bakterien im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* sowie in den umgebenden Böden untersucht.

3.1.1 *In vivo*-Emission von N_2O durch neuseeländische Regenwürmer

3.1.1.1 *In vivo*-Emission von N_2O unter *in situ*-Bedingungen

Neuseeländische Regenwürmer aus Wiesen- und Waldboden wurden auf ihre Fähigkeit hin, N_2O zu emittieren, untersucht (Tabelle 15). Während einer sechs­stündigen Inkubation emittierten alle untersuchten Individuen der eingeführten Arten *L. rubellus* und *A. rosea* unter *in situ*-Bedingungen N_2O . Nur eines von vier Individuen der eingeführten Art *O. cyaneum* emittierte N_2O , während nach 6 h für keines der Individuen der einheimischen Art *O. multiporus* eine *in vivo*-Emission von N_2O feststellbar war. Regenwürmer der Art *O. cyaneum* wurden sehr selten gefunden und daher nicht weitergehend untersucht.

Tabelle 15. *In vivo*-Emission von N₂O durch neuseeländische Regenwürmer während einer sechsstündigen Inkubation unter *in situ*-Bedingungen. ^a

Spezies	Habitat (Probenahme- fläche ^b)	N ₂ O nach 6 h (nmol g _{FG} ⁻¹)	Anteil N ₂ O-emittierender Replikate (%)
<i>A. rosea</i> (n ^c = 4)	Wiesenboden (PS)	0,22 ± 0,16	100
<i>L. rubellus</i> (n = 4)	Wiesenboden (PS)	0,29 ± 0,31	100
<i>O. cyaneum</i> (n = 4)	Waldboden (FS)	0,92 ± 1,88	25
<i>O. multiporus</i> (n = 12)	Waldboden (FS)	0 ± 0	0

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von vier bis zwölf Replikaten (± Standardabweichung) in nmol N₂O pro Gramm Frischgewicht Wurmbiomasse (g_{FG}).

^b Die Probenahmeflächen sind in Tabelle 2 beschrieben.

^c n, Anzahl der Replikate.

3.1.1.2 *In vivo*-Emissionspotential

Zur Abschätzung des N₂O-Emissionspotentials wurden neuseeländische Regenwürmer in verschiedenen Inkubationsversuchen in Anwesenheit von Nitrat, Nitrit und/oder Acetylen inkubiert. Nach Beträufelung mit Nitrit, einem Vorläufer von N₂O in der Denitrifikation (1.3.2.1; Zumft, 1997), emittierten *A. rosea*, *L. rubellus* und *O. multiporus* von Beginn an N₂O (Abbildung 12). Im Vergleich zu den N₂O-Emissionen unter *in situ*-Bedingungen (Tabelle 15) waren die N₂O-Emissionen nach Stimulation mit Nitrit deutlich erhöht. Während die N₂O-Emissionen von *A. rosea* und *L. rubellus* bis zum Ende der Inkubation linear anstiegen, stellte sich für die N₂O-Emission von *O. multiporus* nach 4 h allmählich eine Sättigung ein. Während der sechsstündigen Inkubation emittierten mit Nitrit beträufelte *A. rosea* durchschnittlich 110 nmol, *L. rubellus* 54 nmol und *O. multiporus* 6 nmol N₂O pro Gramm Frischgewicht Wurmbiomasse (g_{FG}) (Abbildung 12). Das mittlere Frischgewicht für *O. multiporus* war etwa 10 x höher als das der anderen Wurmarten. Bezieht man die Menge des emittierten N₂O nicht auf das Gramm Frischgewicht Wurmbiomasse, sondern auf das Frischgewicht des kompletten Wurms, so liegen die N₂O-Emissionen in Anwesenheit von Nitrit für alle drei untersuchten Arten im selben Größenbereich.

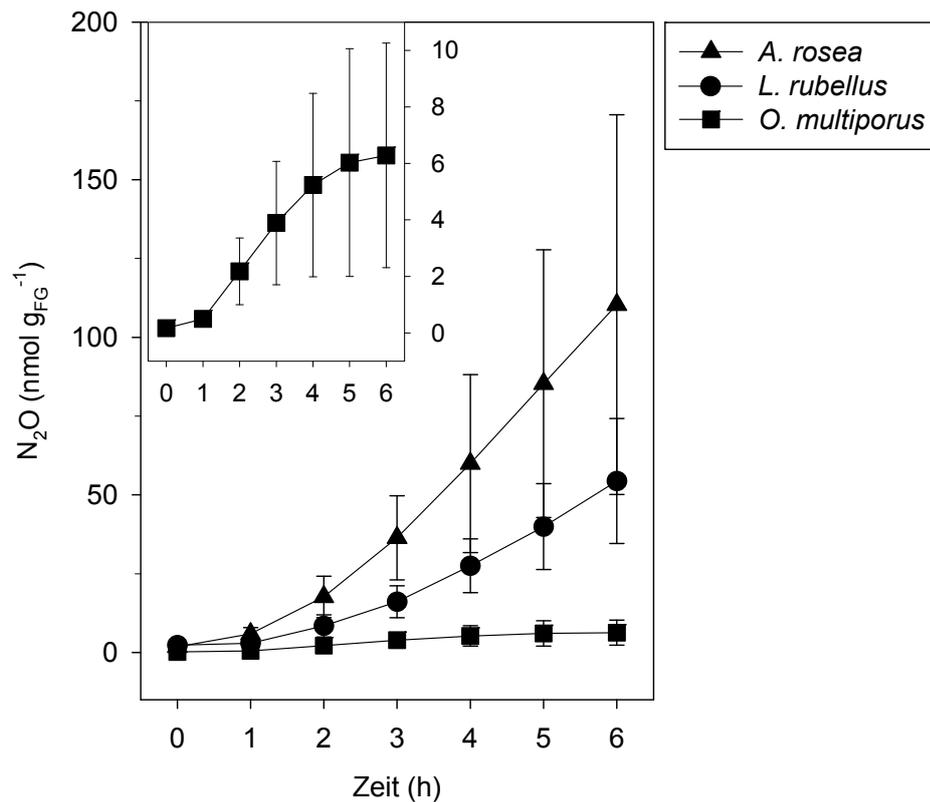


Abbildung 12. In vivo-Emission von N₂O durch *A. rosea*, *L. rubellus* und *O. multiporus* in Anwesenheit von Nitrit. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (\pm Standardabweichung). In der Abbildung befindet sich eine Vergrößerung für die N₂O-Emission von *O. multiporus*. Die Würmer wurden unter oxischen Bedingungen inkubiert und mit 0,4 ml steriler NaNO₂-Lösung (2 mM) beträufelt.

Für weitere Inkubationsversuche wurden *L. rubellus* und *O. multiporus* als Modellorganismen für eingeführte bzw. einheimische Regenwürmer ausgewählt. Nach Beträufelung mit Nitrat, einem weiteren Vorläufer von N₂O in der Denitrifikation (1.3.2.1; Zumft, 1997), emittierten *L. rubellus* und *O. multiporus* ebenfalls von Beginn an N₂O (Abbildung 13). Die durchschnittliche N₂O-Emissionsrate war für *L. rubellus* höher als für *O. multiporus* (0,26 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹ und 0,02 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹). Durch die Hemmung der N₂O-Reduktase mit Acetylen wurde der Anteil an gebildetem N₂, der in Anwesenheit von Acetylen ebenso als N₂O frei wird, abgeschätzt. Acetylen hatte nahezu keinen Effekt auf die N₂O-Emission durch *L. rubellus*, führte aber zu einem signifikanten Anstieg der N₂O-Emission durch *O. multiporus*. In Anwesenheit von Acetylen betrug die N₂O-Emissionsrate für *L. rubellus* 0,35 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹ und für *O. multiporus* 0,18 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹. Die Emission von N₂O wurde durch Nitrit wesentlich stärker stimuliert als durch Nitrat.

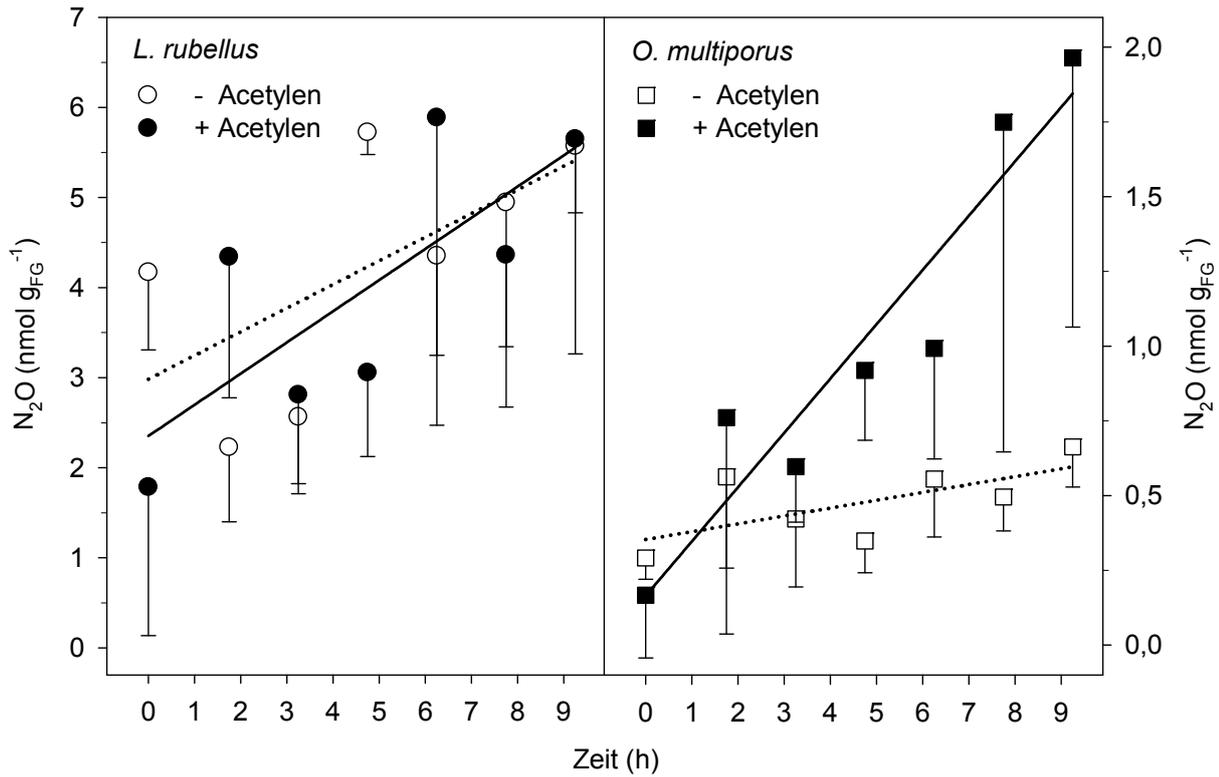


Abbildung 13. *In vivo*-Emission von N_2O durch *L. rubellus* und *O. multiporus* in Anwesenheit von Nitrat. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (- Standardabweichung). Die Linien zeigen die lineare Regression ($r^2 = 0,40 - 0,89$). Die Würmer wurden unter oxischen Bedingungen inkubiert und mit 0,4 ml steriler $NaNO_3$ -Lösung (2 mM) beträufelt; die Hälfte der Würmer wurde in Anwesenheit von 15 % (v/v) Acetylen in der Gasphase inkubiert.

3.1.2 N₂O-Bildung durch Verdauungstrakte von *L. rubellus* und *O. multiporus*

Um die N₂O-Bildung von Verdauungstrakten zu untersuchen, wurden separate Verdauungstrakte von *L. rubellus* und *O. multiporus* unter anoxischen Bedingungen und in Gegenwart von Acetylen inkubiert. Für Verdauungstrakte, die mit Wasser beträufelt wurden, wurde während der neunstündigen Inkubation nahezu keine N₂O-Bildung festgestellt (Abbildung 14). In Gegenwart von Nitrit wiesen Verdauungstrakte beider Wurmarten von Beginn an eine starke N₂O-Bildung auf. Innerhalb von 9 h produzierten mit Nitrit beträufelte Verdauungstrakte von *L. rubellus* durchschnittlich 50 nmol und Verdauungstrakte von *O. multiporus* 42 nmol N₂O g_{FG}⁻¹. Die durchschnittlichen N₂O-Bildungskapazitäten von Verdauungstrakten beider Arten waren folglich sehr ähnlich, wobei die Werte für *O. multiporus* stärker variierten als die für *L. rubellus*.

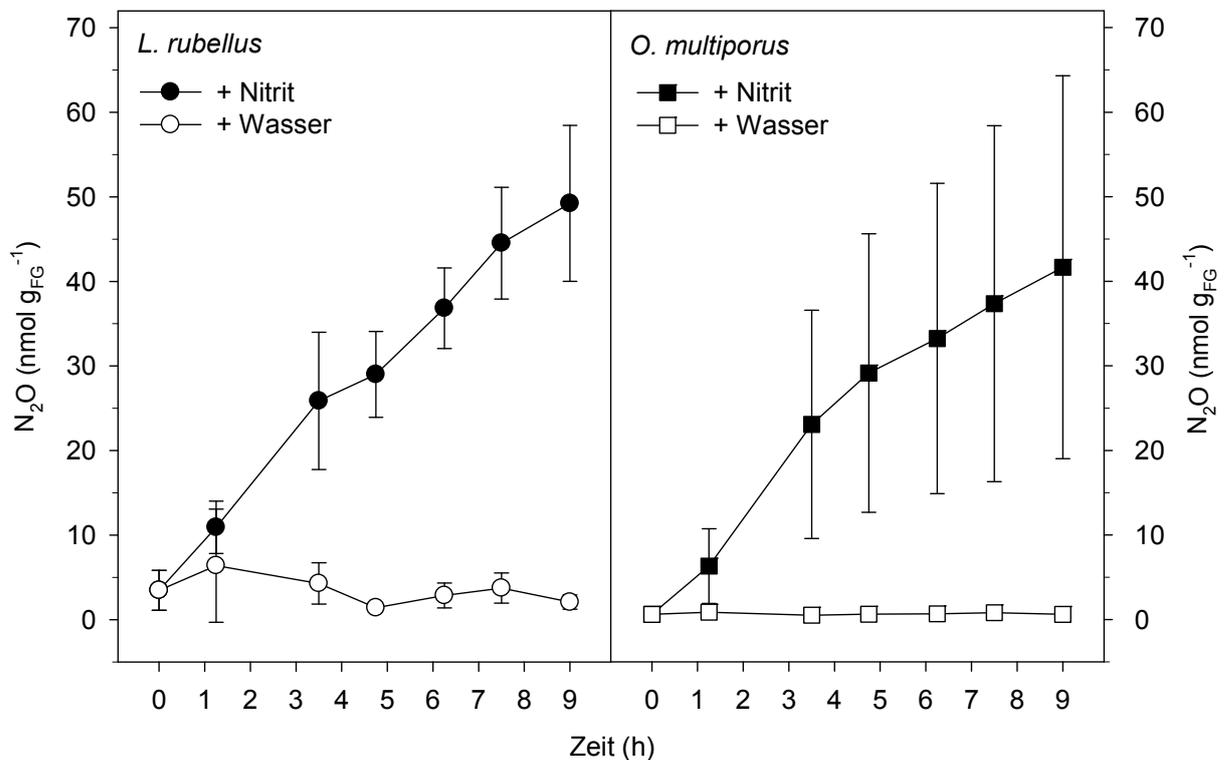


Abbildung 14. Einfluss von Nitrit auf die N₂O-Bildung durch Verdauungstrakte von *L. rubellus* und *O. multiporus* in Anwesenheit von Acetylen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (\pm Standardabweichung); jedes Replikat besteht aus zwei Verdauungstrakten von *L. rubellus* bzw. einem Verdauungstrakt von *O. multiporus*. Die Verdauungstrakte wurden unter anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von 15 % (v/v) Acetylen in der Gasphase inkubiert und mit 0,4 ml steriler NaNO₂-Lösung (2 mM) oder 0,4 ml sterilem ddH₂O beträufelt.

3.1.3 Diversität von Denitrifikanten im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* im Vergleich zu den umgebenden Böden auf Basis des strukturellen Genmarkers *nosZ*

Das *nosZ* Gen kodiert die N₂O-Reduktase, welche die Umsetzung von N₂O zu N₂ katalysiert (1.3.2.1; Zumft, 1997), und wurde verwendet, um die Diversität der denitrifizierenden Mikroorganismen im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* sowie in den umgebenden Böden zu untersuchen.

3.1.3.1 Erstellung der *nosZ* Genbibliotheken

Für die Amplifikation der *nosZ* Genfragmente diente hochmolekulare DNA (ca. 20.000 bp) aus Boden sowie aus Kropf/Magen und Enddarm der Regenwürmer als Matrize. Kropf/Magen und Enddarm wurden gewählt, weil diese Bereiche besonders hohe Denitrifikationsaktivitäten aufweisen (3.2.2 und 3.2.5.1). Die Amplifikation der *nosZ* Genfragmente (ca. 700 bp) war für alle Proben erfolgreich (Abbildung 15).

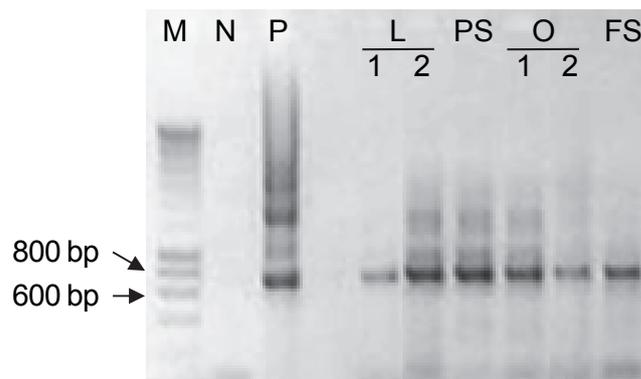


Abbildung 15. Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR potentieller *nosZ* Genfragmente mit dem Primerpaar *nosZ1181F/nosZ1880R* (ca. 700 bp). M, DNA-Marker MWM-1; N, Negativkontrolle, P, Positivkontrolle (Reinkultur). L, *L. rubellus*; O, *O. multiporus*; PS, Wiesenboden; FS, Waldboden; 1, Kropf/Magen; 2, Enddarm. Die Pfeile weisen auf die Fragmentgröße wichtiger Markerbanden hin.

Insgesamt wurden 216 Klon-Inserts erfolgreich sequenziert, wobei 99 Inserts aus Verdauungstraktinhalt und 117 Inserts aus Boden stammten. Die *nosZ* Genbibliotheken für Verdauungstraktinhalt bestanden aus 49 Sequenzen für *L. rubellus* und 50 Sequenzen für *O. multiporus*. Die *nosZ* Genbibliotheken für Boden enthielten 88 Sequenzen aus Wiesenboden (Habitat von *L. rubellus*) und 29 Sequenzen aus Waldboden (Habitat von *O. multiporus*). Die Coverage lag bei beiden Verdauungstrakt-Genbibliotheken bei 98 %. Für Wiesenbodensequenzen betrug die Coverage 99 % und für Waldbodensequenzen 97 %. Diese Werte deuten an, dass mit der Anzahl der analysierten Sequenzen pro Genbibliothek

der Großteil der Diversität auf Spezies-Ebene erfasst wurde. Die durchschnittliche Nukleotidsequenzähnlichkeit aller *L. rubellus*-Sequenzen war $93,7 \pm 6,6$ % während *O. multiporus*-Sequenzen eine durchschnittliche Nukleotidsequenzähnlichkeit von $92,4 \pm 6,1$ % aufwiesen. Wiesenboden-Sequenzen zeigten eine durchschnittliche Nukleotidsequenzähnlichkeit von $92,3 \pm 0,1$ %, während Waldbodensequenzen zu $88,1 \pm 0,1$ % zueinander ähnlich waren. Zwischen *L. rubellus*- und Wiesenbodensequenzen betrug die durchschnittliche Nukleotidsequenzähnlichkeit $92,7 \pm 0,1$ % und zwischen *O. multiporus*- und Waldbodensequenzen $89,7 \pm 0,1$ %. *NosZ* Sequenzen aus den Verdauungstrakten von *L. rubellus* und *O. multiporus* waren folglich sehr ähnlich zu *nosZ* Sequenzen aus den umgebenden Böden.

3.1.3.2 Rarefaction-Analyse von *nosZ* Gensequenzen

Für jede Genbibliothek wurde die Anzahl der erwarteten OTUs als Funktion der analysierten und *in silico* translatierten *nosZ* Gensequenzen in Form einer Rarefaction-Kurve dargestellt und verglichen (Abbildung 16). Neben der Coverage (3.1.3.1) zeigt auch der abflachende Verlauf aller Rarefaction-Kurven, dass der Großteil der OTUs auf Spezies-Ebene innerhalb jeder Genbibliothek gut erfasst wurde. Der Vergleich der Genbibliotheken für Verdauungstraktinhalte ergab, dass die *nosZ* Diversität im Verdauungstraktinhalt von *O. multiporus* signifikant höher war als im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* (Abbildung 16). Analog dazu wurde in der Genbibliothek vom Waldboden, dem Habitat von *O. multiporus*, eine höhere Denitrifikanten-Diversität detektiert als in der Genbibliothek vom Wiesenboden, dem Habitat von *L. rubellus*. Im Vergleich zur Waldboden-Genbibliothek war die detektierbare Denitrifikanten-Diversität in der Genbibliothek des *O. multiporus*-Verdauungstraktinhalts leicht erhöht. Die Genbibliotheken des *L. rubellus*-Verdauungstraktinhalts und des Wiesenbodens wiesen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Denitrifikanten-Diversität auf.

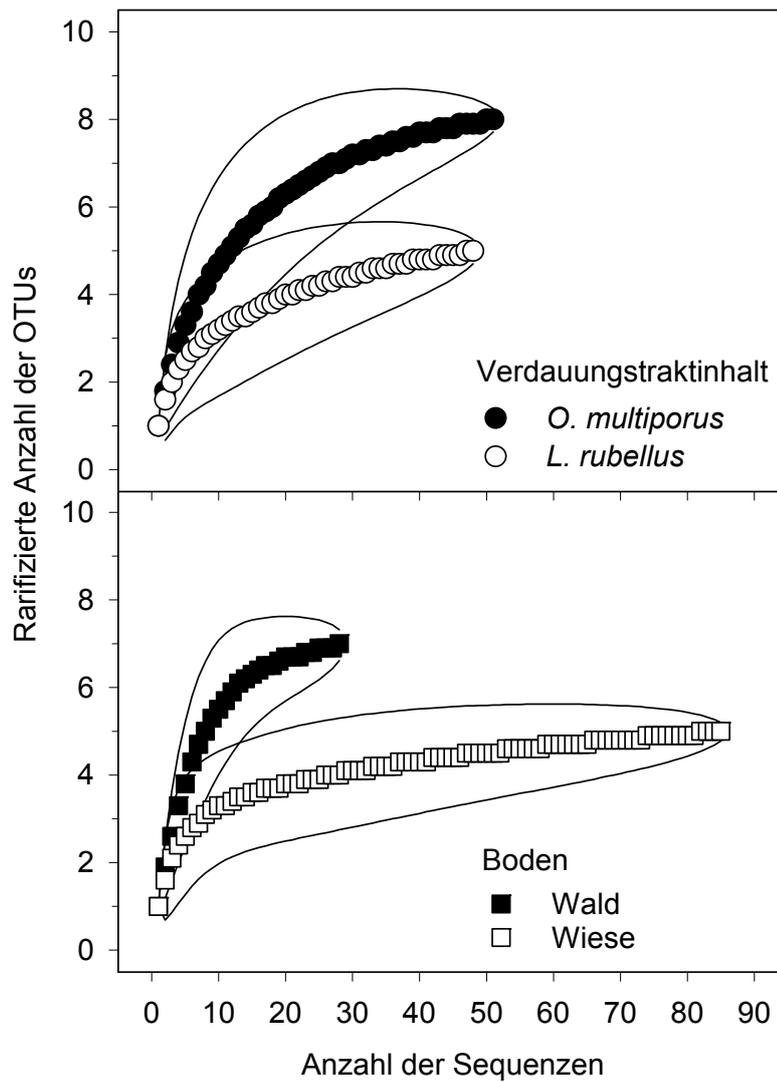


Abbildung 16. Rarefaction-Analyse der *nosZ* Aminosäure-Teilsequenzen (196 Aminosäuren) aus Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* sowie aus den umgebenden Böden auf Spezies-Ebene. Die Linien beschreiben die 95 % Konfidenzintervalle. Eine Spezies-entsprechende OTU besteht aus *nosZ* Sequenzen mit einer Aminosäureähnlichkeit von ≥ 86 % (Palmer *et al.*, 2009).

3.1.3.3 Phylogenetische Analyse von *nosZ* Gensequenzen

Die in dieser Arbeit analysierten 216 *nosZ* Gensequenzen sind Teilsequenzen (ca. 700 bp) der vollständigen *nosZ* Gene (ca. 2.000 bp) und wurden in translaterter Form zur Berechnung eines phylogenetischen *nosZ* Stammbaums herangezogen (Abbildung 17). Die Sequenzen, die über DOTUR einer Spezies-entsprechenden OTU zugeteilt wurden, bildeten auch im *nosZ* Stammbaum ein Cluster (Abbildung 17 und Daten nicht gezeigt). Die Sequenzen wurden in 11 OTUs eingeordnet, wovon 6 OTUs (OTUs 1, 2, 3, 7, 8 und 10) aus Boden- und Verdauungstraktsequenzen bestanden und den Großteil (95 %) aller detektierten Sequenzen beinhalteten. Den OTUs 5, 6 und 11 wurden Verdauungstraktsequenzen, aber keine Bodensequenzen zugeordnet, während sich die OTUs 4 und 9 nur aus Bodensequenzen zusammensetzten. In beiden Fällen bildeten die Sequenzen dieser OTUs nur einen Anteil < 3 % an allen Sequenzen. Sequenzen der OTUs 2 und 8 stammten aus Verdauungstraktinhalt von *O. multiporus* oder aus dessen Habitat (Waldboden), aber kamen weder im Verdauungstrakt von *L. rubellus*, noch in dessen Habitat, dem Wiesenboden, vor.

NosZ Sequenzen aus dem Verdauungstrakt von *L. rubellus* und *O. multiporus* und den umgebenden Böden waren phylogenetisch verwandt zu unkultivierten Bakterien aus Acker- und Waldböden sowie zu Gattungen, die in Böden weit verbreitet sind (Abbildung 17 und Daten nicht gezeigt). Die mit BLAST ermittelten Ergebnisse für die nächstverwandten Sequenzen stimmten sehr gut mit der Baumtopologie überein. *NosZ* Sequenzen der OTUs 1 - 7 waren am nächsten zu *nosZ* Sequenzen von *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris* und *Sinorhizobium meliloti* verwandt. Nächster Verwandter der OTUs 9 und 10 war *Azospirillum lipoferum*. OTU 8 war am nächsten zu *Rhodospirillum centeneum* verwandt und *Pseudomonas brassicacearum* war nächster Verwandter von OTU 11.

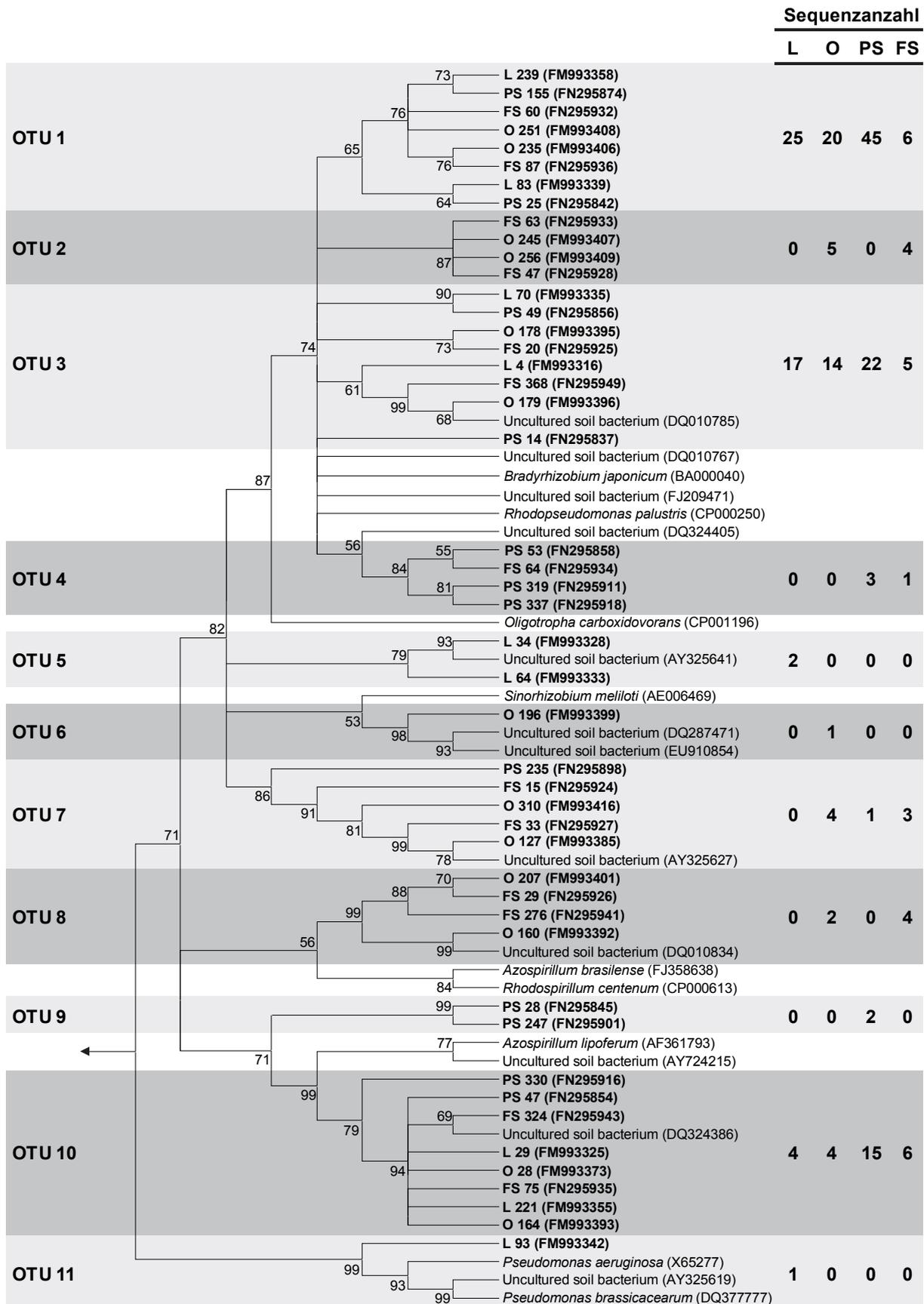


Abbildung 17. Phylogenetischer Stammbaum repräsentativer *nosZ* Aminosäure-Teilsequenzen (196 Aminosäuren). Die Berechnung erfolgte mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus auf Aminosäureebene nach dem „p-Distance“-Modell. Dargestellt ist ein Bootstrap Konsensus-Baum. An den Verzweigungen sind die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) angezeigt. Verzweigungen, die in weniger als 50 % der Einzelbäume auftraten, sind als Multifurkationen gezeichnet. Die Aminosäuresequenz von *Haloarcula marismortui* (NC_006396) wurde als Referenzsequenz („Outgroup“) verwendet. Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett gedruckt. Eine Spezies-entsprechende OTU besteht aus *nosZ* Sequenzen mit einer Aminosäureähnlichkeit von $\geq 86\%$ (Palmer *et al.*, 2009). Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken („Accession Numbers“) sind in Klammern angegeben. Die *nosZ* Sequenzen wurden aus DNA gewonnen. Sequenzherkunft: L, *L. rubellus*; O, *O. multiporus*; PS, Wiesenboden; FS, Waldboden.

3.1.4 Organische Verbindungen im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* im Vergleich zu den umgebenden Böden

Im Verdauungstraktinhalt der Würmer *L. rubellus* und *O. multiporus* wurden hohe Konzentrationen an leicht verwertbaren organischen Verbindungen wie Zucker und organische Säuren detektiert (Tabelle 16). Die Böden enthielten lediglich Propionat mit einer maximalen Konzentration von $0,7 \text{ mmol l (Wassergehalt)}^{-1}$. Die Konzentrationen von Maltose, Glucose und Succinat waren im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* höher als im Verdauungstraktinhalt von *O. multiporus*, während Formiat und Propionat im Verdauungstraktinhalt von *O. multiporus* höher konzentriert waren.

Tabelle 16. Lösliche organische Verbindungen im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* sowie in den umgebenden Böden. ^a

	Organische Verbindung (mmol l [Wassergehalt] ⁻¹)			
	Verdauungstraktinhalt		Boden ^b	
	<i>L. rubellus</i>	<i>O. multiporus</i>	Wiese (PS)	Wald (FS)
Maltose	1,3 ± 0,3	0,5 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0
Glucose	17,7 ± 4,6	6,0 ± 1,1	0 ± 0	0 ± 0
Succinat	5,9 ± 1,1	2,5 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0
Lactat	0,4 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Formiat	1,9 ± 0,7	5,7 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 0
Acetat	2,2 ± 0,5	1,8 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0
Propionat	8,6 ± 2,4	15,2 ± 1,7	0,7 ± 1,3	0,3 ± 0,5

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Triplikaten (± Standardabweichung); jedes Replikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von neun Individuen der Art *L. rubellus* bzw. vier Individuen der Art *O. multiporus*.

^b Die Probenahmeflächen sind in Tabelle 2 beschrieben.

3.2 Anaerobe Aktivitäten und assoziierte Mikroorganismen im Verdauungstrakt von europäischen Regenwürmern (*Lumbricidae*)

3.2.1 *In vivo*-Emission von NO, N₂O und H₂ durch europäische Regenwürmer

Europäische Regenwürmer der Arten *Aporrectodea caliginosa* und *Lumbricus terrestris* wurden stichprobenartig auf die *in vivo*-Emission von NO, N₂O und H₂ hin untersucht. Bei keinem der analysierten Regenwürmer wurde die Emission von NO festgestellt (Stefanie Goldberg, persönliche Kommunikation), jedoch emittierten alle untersuchten Regenwürmer von Beginn an N₂O (Daten nicht gezeigt). Die Emissionsraten für N₂O waren sehr variabel (0,1 bis 7,5 nmol N₂O g_{FG}⁻¹ h⁻¹) und betragen im Mittel 1,1 ± 1,9 nmol N₂O g_{FG}⁻¹ h⁻¹ (*n* = 14; Berechnung basiert auf dem Inkubationszeitraum mit einer linearen Zunahme der N₂O-Konzentration, *r*² = 0,75 - 1,00). Die *in vivo*-Emission von H₂ wurde frühestens nach zweistündiger Inkubation der Würmer nachgewiesen, wahrscheinlich weil die H₂-

Konzentrationen zuvor unter dem Detektionslimit von 10 ppm (ca. 1 nmol H₂ g_{FG}⁻¹) lagen. Nach fünfstündiger Inkubation wurden durchschnittlich 10,8 ± 13,2 nmol H₂ g_{FG}⁻¹ emittiert. Die mittlere Emissionsrate für H₂ betrug 6,2 ± 5,1 nmol H₂ g_{FG}⁻¹ h⁻¹ (n = 4; Berechnung basiert auf dem Inkubationszeitraum mit einer linearen Zunahme der H₂-Konzentration, r² = 0,69 - 0,99). Die *in vivo*-Emission von N₂O wurde bereits in vorangegangenen Studien belegt (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2003b) und ist ein Hinweis auf aktive N₂O-Bildung, während die *in vivo*-Emission von H₂ auf aktive H₂-Bildung im Regenwurm hinweist.

3.2.2 N₂O- und H₂-Bildung durch Körperabschnitte von *L. terrestris*

Um die N₂O- und H₂-bildenden Regionen entlang des Regenwurms zu lokalisieren, wurden Körperabschnitte von *L. terrestris* (Abbildung 5) separat inkubiert. Alle Regenwurmabschnitte bildeten unter anoxischen Bedingungen von Beginn an N₂O (Abbildung 18 und Daten nicht gezeigt). Höchste N₂O-Bildungsraten wurden für Wurmabschnitte der Kropf-/Magenregion (1,4 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹) und der Enddarmregion (0,3 nmol g_{FG}⁻¹ h⁻¹) nachgewiesen. In Gegenwart von Acetylen erhöhten sich die N₂O-Bildungsraten der Regenwurmabschnitte um das 2- bis 5-Fache, wobei der Effekt von Acetylen von anterior nach posterior zunahm.

Die H₂-Bildung durch Regenwurmabschnitte wurde frühestens nach vierstündiger Inkubation sichtbar und stieg annähernd exponentiell an, weshalb auf die Berechnung von H₂-Bildungsraten verzichtet wurde. Nach fünfstündiger Inkubation bildeten die Wurmabschnitte durchschnittlich 28,7 nmol H₂ g_{FG}⁻¹ (Tabelle 17). Die größten H₂-Mengen wurden von Mitteldarmabschnitten gebildet.

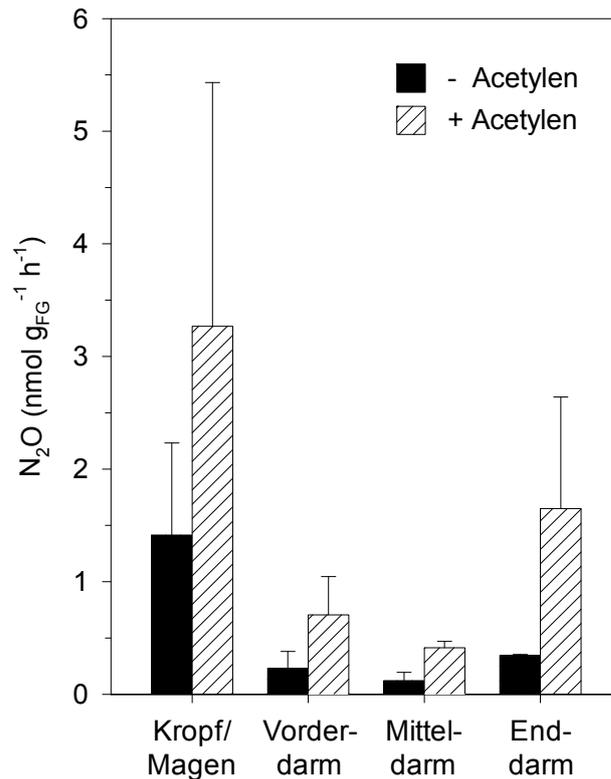


Abbildung 18. N₂O-Bildung durch Regenwurmabschnitte von *L. terrestris*. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (+ Standardabweichung); jedes Replikat besteht aus zwei bis drei Wurmabschnitten. Die Wurmabschnitte wurden unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Die Hälfte der Wurmabschnitte wurde mit 15 % (v/v) Acetylen in der Gasphase inkubiert. Die Berechnung der Bildungsraten basiert auf dem Inkubationszeitraum mit einer linearen Zunahme der N₂O-Konzentration (0 - 3 h; $r^2 = 0,76 - 1,00$).

Tabelle 17. H₂-Bildung durch Regenwurmabschnitte und Hydrogenaseaktivität im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris*.

	Kropf/Magen	Vorderdarm	Mitteldarm	Enddarm
H ₂ nach 5 h (nmol g _{FG} ⁻¹) ^a	30,0 ± 19,9	29,6 ± 4,7	41,8 ± 49,3	13,3 ± 15,7
Hydrogenaseaktivität (mU mg ⁻¹) ^b	n. b. ^c	0 ± 0	5,5 ± 3,8	0 ± 0

^a Die Wurmabschnitte wurden unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Triplikaten (± Standardabweichung); jedes Replikat besteht aus zwei bis drei Wurmabschnitten.

^b Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei bis vier Replikatmessungen (± Standardabweichung). Jede Probe besteht aus Verdauungstraktinhalt von 19 Würmern. 1 U entspricht 1 µmol H₂ min⁻¹.

^c n. b., nicht bestimmt, da das Material für die Analyse nicht ausreichend war.

3.2.3 H₂-Bildung durch Verdauungstrakte von *L. terrestris*

Die H₂-Bildung von Verdauungstrakten aus *L. terrestris* wurde wie die H₂-Emission durch lebende Würmer frühestens nach zweistündiger Inkubation beobachtet (3.2.1). Aufgrund des annähernd exponentiellen Anstiegs der H₂-Bildung war eine Berechnung der H₂-Bildungsrate nicht möglich. Nach fünfständiger Inkubation wurden durchschnittlich $1,3 \pm 0,6 \mu\text{mol H}_2 \text{ g}_{\text{FG}}^{-1}$ gebildet. Verdauungstrakte bildeten demzufolge 45 x mehr H₂ als Wurmabschnitte und 116 x mehr H₂ als von lebenden Würmern emittiert wurde.

3.2.4 Hydrogenaseaktivität im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris*

Die Hydrogenaseaktivität wurde in zellfreien Extrakten aus Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* und aus einer Reinkultur von *Sporomusa rhizae*, welche als Positivkontrolle diente, bestimmt. In Abwesenheit von H₂ verlief die Reaktion stets negativ, was die Spezifität des Versuchsansatzes demonstriert. Für *S. rhizae* wurde eine wie erwartet hohe spezifische Hydrogenaseaktivität von $3,2 \text{ U mg}^{-1}$ (1 Unit entspricht $1 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1}$; $n = 2$) verzeichnet. Im Mitteldarm wurde eine spezifische Hydrogenaseaktivität von $5,5 \pm 3,8 \text{ mU mg}^{-1}$ ($n = 4$) nachgewiesen, während im Vorder- und Enddarm keine Hydrogenaseaktivität detektierbar war (Tabelle 17). Für Kropf/Magen war die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität nicht möglich, weil das Material für die Analyse nicht ausreichend war.

3.2.5 *In situ*-Bedingungen entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im umgebenden Boden

Die oben beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass verschiedene anaerobe mikrobielle Prozesse entlang des Verdauungstrakts aktiv sind. Um diese mikrobiellen Aktivitäten in Bezug zu den *in situ*-Bedingungen zu setzen, wurden die physikalisch-chemischen Parameter entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* bestimmt.

3.2.5.1 *In situ*-Redoxpotential (E_{h}) und *in situ*-Konzentrationen von O₂, NO_x⁻, NO, N₂O und H₂ in *L. terrestris*

Für die Erstellung radialer Mikrosensorprofile durch käuflich erworbene *L. terrestris* wurden die Messungen wenige Millimeter über dem Wurm oder auf der Kutikula des Wurms (Wurmoberfläche) begonnen und im Verdauungstrakt (Wurmzentrum) beendet (Abbildung 19). In der Vorderdarmregion des Regenwurms betragen die *in situ*-Konzentrationen von Nitrat/Nitrit (NO_x⁻) auf der Wurmoberfläche $330 \mu\text{mol l (Wassergehalt)}^{-1}$ und nahmen zum Verdauungstrakt hin bis auf $0,2 \mu\text{mol l (Wassergehalt)}^{-1}$ ab. Der NO_x⁻-Biosensor misst im Allgemeinen N₂O, welches entweder *in situ* vorkommt oder über die Reduktion von N₂O-Vorläufern (Nitrat, Nitrit und NO) durch die denitrifizierenden Bakterien in der

Reaktionskammer des Biosensors gebildet wurde (2.4.1). Maximale Konzentrationen von NO und N₂O in der Vorderdarmregion waren jedoch < 0,4 μmol l (Wassergehalt)⁻¹ (Abbildung 19 und Abbildung 22) und daher für die Signaländerungen des NO_x⁻-Biosensors nur geringfügig relevant. Die *in situ*-Konzentrationen von NO waren an der Wurmoberfläche am höchsten und nahmen zum Verdauungstrakt hin ab, während die N₂O-Konzentrationen im Zentrum des Verdauungstrakts am höchsten waren. Diese Beobachtungen sind konsistent mit N₂O-Mikrosensormessungen in Freilandwürmern (Horn *et al.*, 2003b) und deuten an, dass im Verdauungstrakt Nitrat, Nitrit und NO verbraucht und zu N₂O umgesetzt werden.

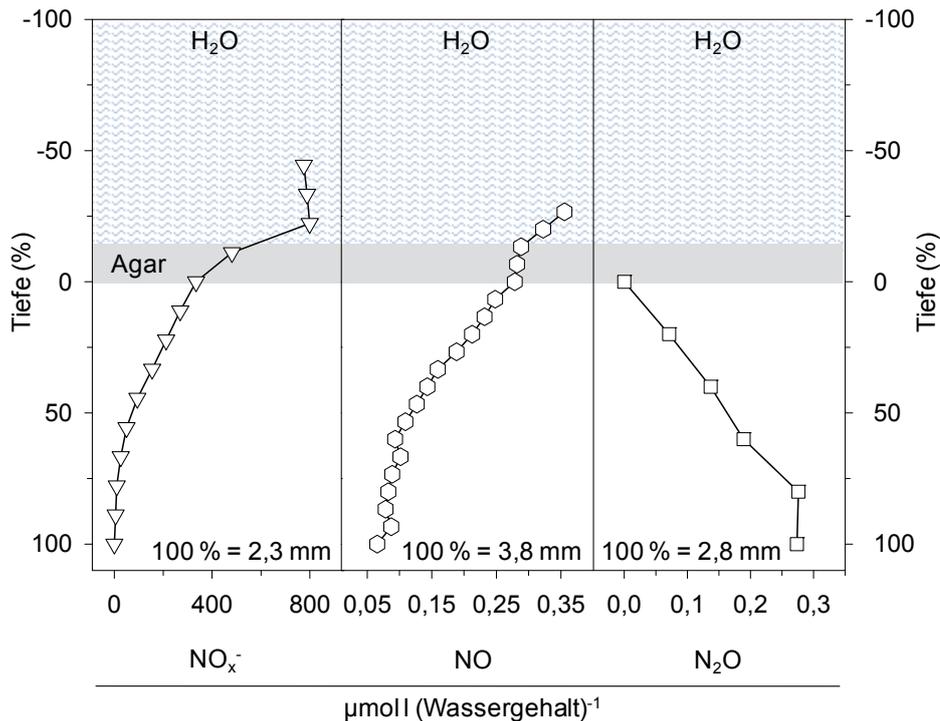


Abbildung 19. Radiale Mikrosensorprofile für NO_x⁻, NO und N₂O durch die Vorderdarmregion von *L. terrestris*. Die Regenwürmer wurden mit Agar (1,5 %) und ddH₂O überschichtet. Der Wurmradius entspricht 100 %. Die dargestellten Profile sind repräsentativ für Replikatanalysen.

In einem radialen Transekt durch die Kropf-/Magenregion nahm das Redoxpotential (E_h) von der Wurmoberfläche zum Wurmzentrum hin ab (Abbildung 20). Unmittelbar nach dem Durchstoßen der Kutikula war kein freies O₂ mehr detektierbar. Wie in der Vorderdarmregion stiegen auch in der Kropf-/Magenregion die N₂O-Konzentrationen von der Kutikula zum Verdauungstrakt hin an. In der überschichteten Saline nahmen die H₂-Konzentrationen mit Annäherung an den Wurm zu. Diese Beobachtung deutet an, dass H₂ vom Wurm an die Umgebung abgegeben wird und unterstützt die Ergebnisse zur *in vivo*-Emission von H₂ (3.2.1). *In situ*-Konzentrationen von H₂ waren im Wurmzentrum am höchsten und deuten an, dass die Bildung von H₂ im Verdauungstrakt stattfindet.

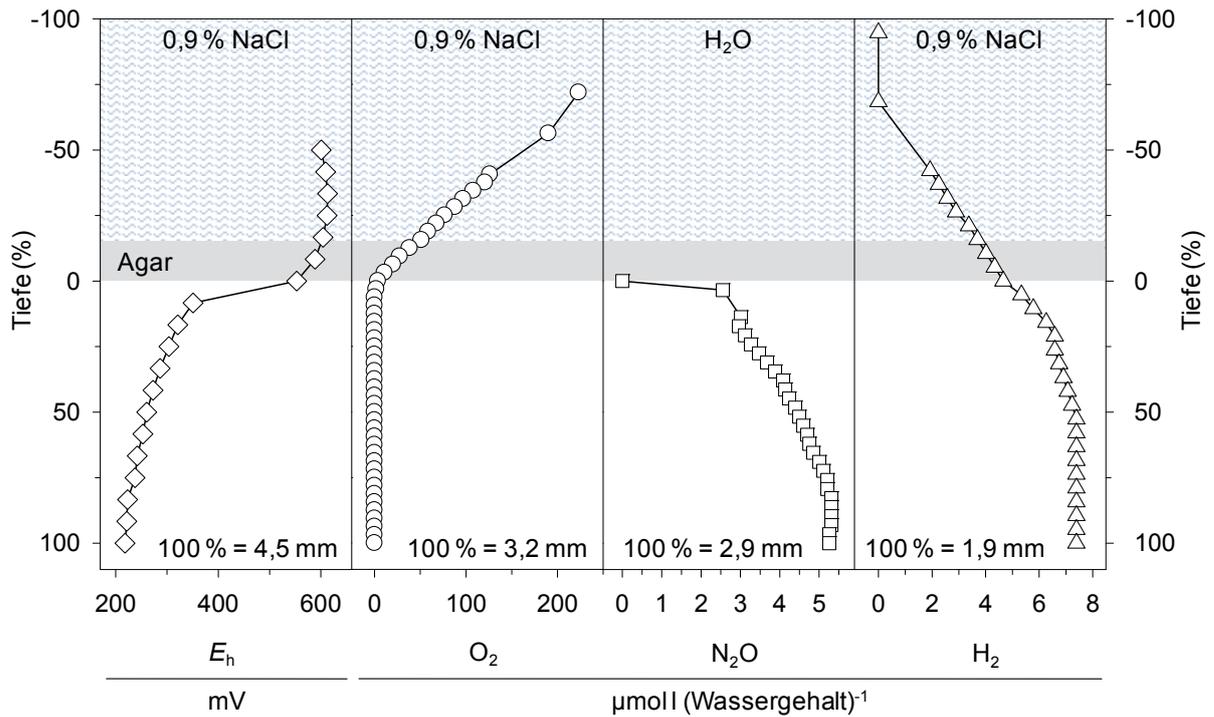


Abbildung 20. Radiale Mikrosensorprofile für das Redoxpotential (E_h) sowie für O_2 , N_2O und H_2 durch die Kropf-/Magenregion von *L. terrestris*. Die Regenwürmer wurden mit Agar (1,5 %) und ddH₂O oder Agar und Saline (0,9 % NaCl) überschichtet. Der Wurmradius entspricht 100 %. Die dargestellten Profile sind repräsentativ für Replikatanalysen.

Das Redoxpotential wurde für alle vier Wurmregionen jeweils auf der Wurmoberfläche und im Wurmzentrum bestimmt (Abbildung 21). Das mittlere Redoxpotential an der Kutikula betrug +440 mV und war damit mehr als 3 x höher als das mittlere Redoxpotential im Verdauungstrakt. Im Verdauungstrakt waren die detektierten Redoxpotentiale weitaus variabler als auf der Kutikula und betragen zwischen -203 mV und +388 mV. Niedrigste mittlere Redoxpotentiale wurden im Vorder- und Mitteldarm detektiert.

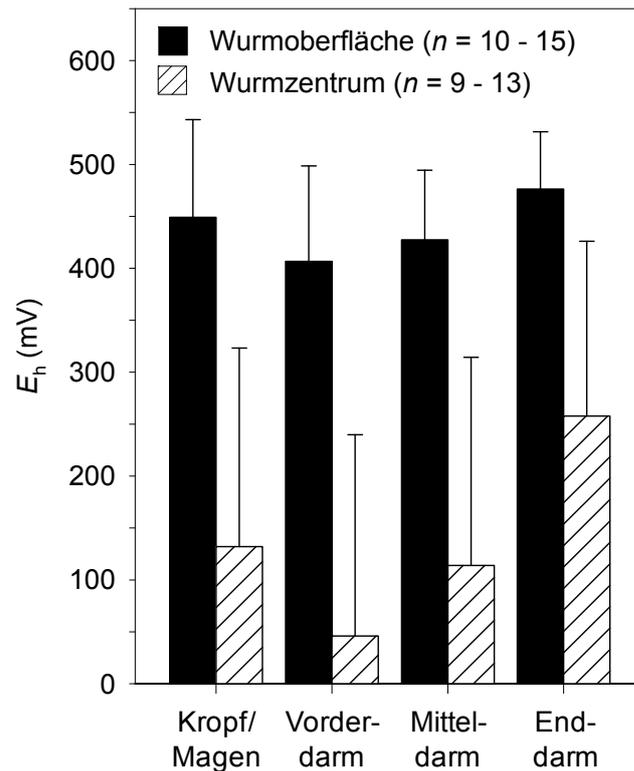


Abbildung 21. *In situ*-Redoxpotentiale (E_h) entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris*. Dargestellt sind die Mittelwerte von 9 - 15 Replikaten (+ Standardabweichung).

Die *in situ*-Konzentrationen von O_2 , N_2O und H_2 wurden ebenfalls entlang des Verdauungstrakts bestimmt (Abbildung 22 und Daten nicht gezeigt). Freier O_2 wurde in keiner Wurmregion detektiert (Abbildung 20 und Daten nicht gezeigt). Analog zum *in situ*-Redoxpotential war auch bei den *in situ*-Konzentrationen von N_2O und H_2 eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Replikaten zu finden. Höchste N_2O -Konzentrationen wurden im Kropf/Magen ($2,2 \mu\text{mol l} [\text{Wassergehalt}]^{-1}$) und im Enddarm ($0,7 \mu\text{mol l} [\text{Wassergehalt}]^{-1}$) detektiert, was konsistent mit den Ergebnissen zur N_2O -Bildung von Regenwurmabschnitten (Abbildung 18) war. Im Mitteldarm war die mittlere N_2O -Konzentration niedriger als an der Wurmoberfläche. H_2 wurde in jeder Region von Freilandwürmern und käuflich erworbenen Würmern detektiert. Höchste mittlere H_2 -Konzentrationen wurden im Vorderdarm ($6,8 \mu\text{mol l} [\text{Wassergehalt}]^{-1}$) und im Mitteldarm ($4,2 \mu\text{mol l} [\text{Wassergehalt}]^{-1}$) detektiert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass in Kropf/Magen und Enddarm die N_2O -Bildung dominiert, während in Vorder- und Mitteldarm überwiegend H_2 -Bildung stattfindet.

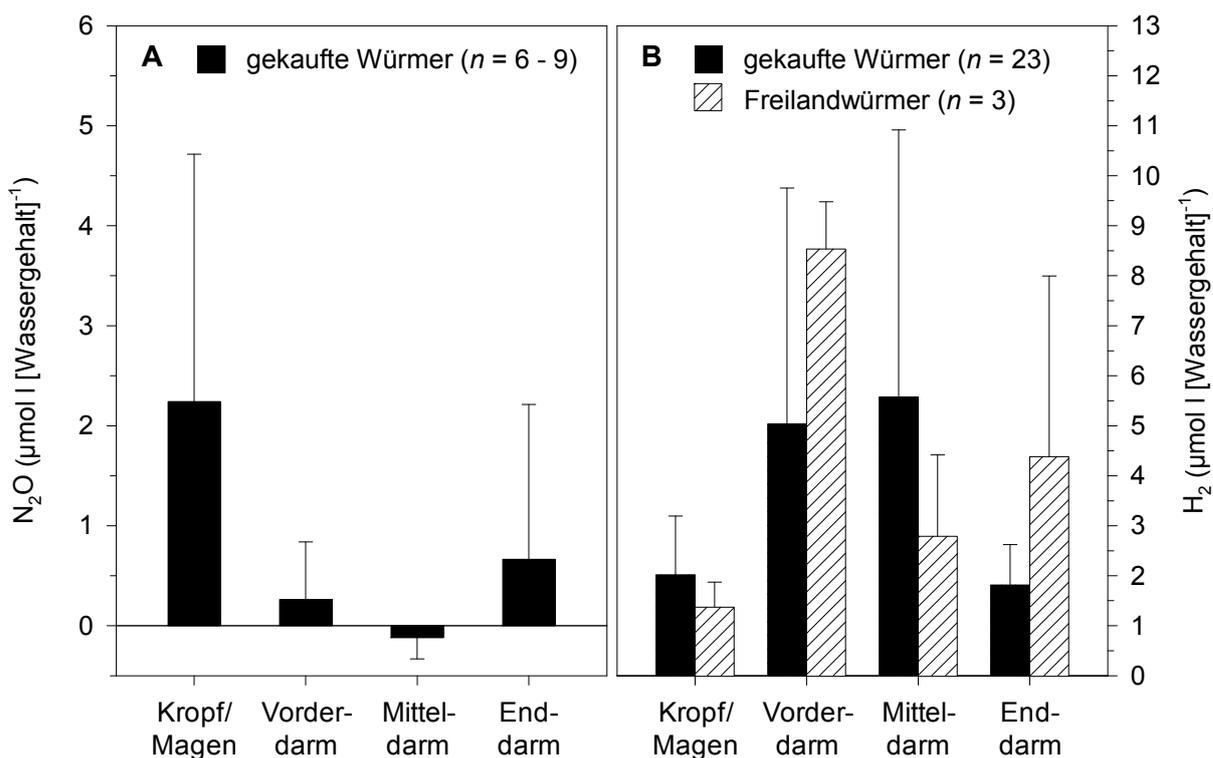


Abbildung 22. *In situ*-Konzentrationen von N₂O (A) und H₂ (B) entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris*. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 - 23 Replikaten (+ bzw. - Standardabweichung).

3.2.5.2 Wassergehalt entlang des Verdauungstrakts und im Boden

Der mittlere Wassergehalt im Verdauungstrakt von *L. terrestris* betrug 46,7 % und war damit mehr als doppelt so hoch wie im Boden, der die Würmer umgab (Tabelle 18). Der Wassergehalt war im Vorderdarm am höchsten und nahm entlang des Darms ab.

Tabelle 18. Wasser- und Gesamtproteingehalt entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im Boden.

	Kropf/ Magen	Vorderdarm	Mitteldarm	Enddarm	Boden
Wassergehalt (%) ^a	41,8 ± 3,0	51,9 ± 0,2	49,1 ± 2,3	44,0 ± 3,3	19,9 ± 1,4
Gesamtprotein (mg ml ⁻¹) ^b	n. b. ^c	10,5	1,9	1,0	n. b.

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Triplikaten (± Standardabweichung); jedes Wurmreplikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von fünf Würmern.

^b Die angegebenen Werte sind Einzelwerte. Jede Probe besteht aus Verdauungstraktinhalt von 19 Würmern.

^c n. b., nicht bestimmt, da das Material für die Analyse nicht ausreichend war.

3.2.5.3 Proteingehalt entlang des Verdauungstrakts

Der Gesamtproteingehalt war im Vorderdarm am höchsten und nahm entlang des Verdauungstrakts ab (Tabelle 18). Der hohe Proteingehalt im Vorderdarm ist durch die Sekretion von Verdauungsenzymen und proteinhaltigem Mucus im vorderen Bereich des Verdauungstrakts zu erklären (Edwards und Bohlen, 1996).

3.2.5.4 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte entlang des Verdauungstrakts und im Boden

Die Gesamtkohlenstoffgehalte waren im Verdauungstrakt 1,1 - 1,6 x und die Gesamtstickstoffgehalte 1,3 - 2,7 x höher als im umgebenden Boden (Abbildung 23). Das resultierende C-zu-N-Verhältnis betrug im Boden 12 und im Verdauungstrakt 7 - 10. Der Großteil des Gesamtkohlenstoffs im Verdauungstrakt und im Boden (89 - 98 %) war organischen Ursprungs.

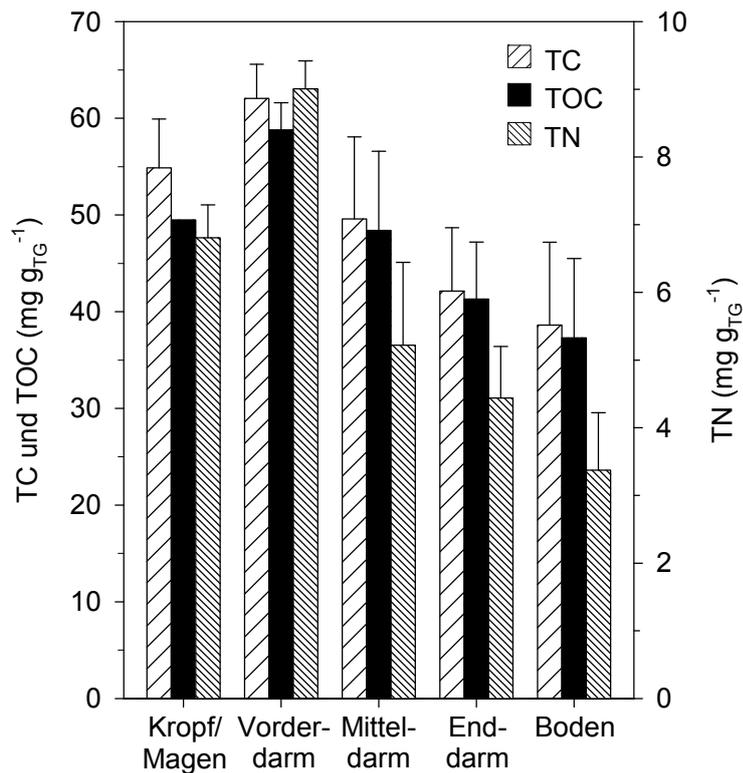


Abbildung 23. Gehalt an Gesamtkohlenstoff (TC), gesamtem organischen Kohlenstoff (TOC) und Gesamtstickstoff (TN) entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (+ Standardabweichung); jedes Wurmreplikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von fünf Würmern. Wenn keine Standardabweichung angegeben ist, wurden alle Replikate vereinigt, um genügend Material für die Analyse zu erhalten.

Der Gehalt an Gesamtkohlenstoff, gesamtem organischen Kohlenstoff und Gesamtstickstoff war im Vorderdarm am höchsten und nahm entlang des Darms ab. Der im Vergleich zu den anderen Verdauungstraktbereichen niedrige Anteil des organischen Kohlenstoffs am Gesamtkohlenstoff im Kropf/Magen (89 %) ist auf die Sekretion von Kalziumcarbonat im Ösophagus zurückzuführen (Edwards und Bohlen, 1996).

3.2.5.5 Anorganische Ionen entlang des Verdauungstrakts und im Boden

Die Konzentrationen von Nitrat waren im Boden 2,5 - 7,5 x höher als im Verdauungstraktinhalt (Abbildung 24A). Nitritkonzentrationen waren im Kropf-/Mageninhalt 23,8 x und im Vorderdarminhalt 15,8 x höher als im umgebenden Boden. Die Ammoniumkonzentrationen lagen 14,3 - 22,2 x über denen des umgebenden Bodens (Abbildung 24B). Ammoniak ist das primäre Exkretionsprodukt von Regenwürmern und wird über die Metanephridien in das Coelom ausgeschieden (Storch und Welsch, 1999), was zu erhöhten Ammoniumkonzentrationen im Verdauungstrakt führen könnte. Höchste Ammonium- und Eisen(II)-Konzentrationen wurden im Kropf-/Mageninhalt detektiert. Im Verdauungstrakt waren die Nitratkonzentrationen im Bereich des Vorder- und Mitteldarms am niedrigsten. Die Konzentrationen von Nitrit, Ammonium und Eisen(II) nahmen hingegen entlang des Verdauungstrakts ab. Die Eisen(II)-Konzentrationen im Enddarm und im Boden waren ähnlich.

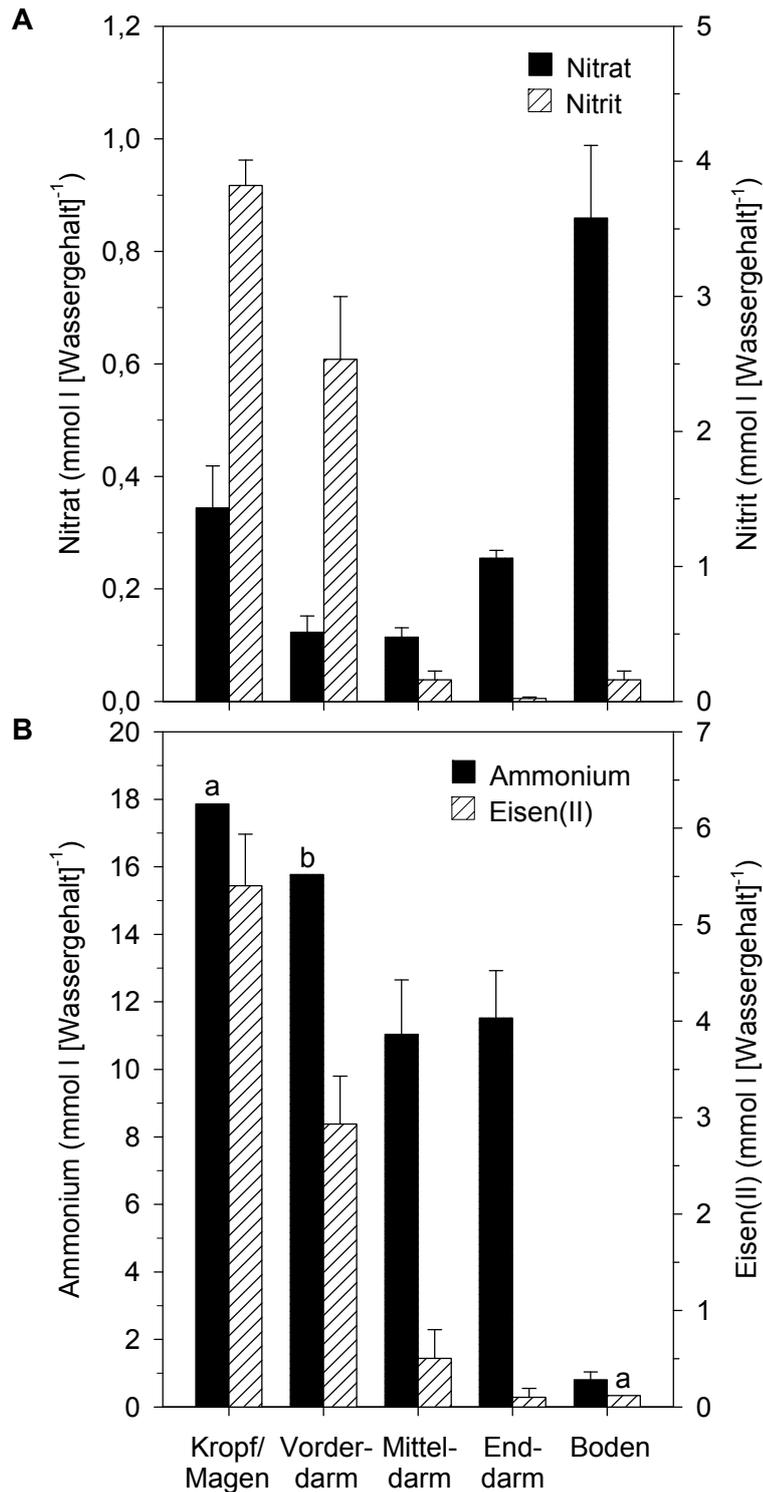


Abbildung 24. Nitrat- und Nitritkonzentrationen (A) sowie Ammonium- und Eisen(II)-Konzentrationen (B) entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (+ Standardabweichung); jedes Wurmreplikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von fünf Würmern. a, Es ist keine Standardabweichung angegeben, weil zwei Replikate analysiert und der Mittelwert der zwei Replikate dargestellt wurde. b, Es ist keine Standardabweichung angegeben, weil alle Replikate vereinigt wurden, um genügend Material für die Analyse zu erhalten.

3.2.5.6 Lösliche organische Verbindungen entlang des Verdauungstrakts und im Boden

Im Gegensatz zum Boden enthielt die wässrige Phase der Verdauungstraktinhalte von *L. terrestris* hohe Konzentrationen an leicht verwertbaren organischen Verbindungen wie Saccharide (Abbildung 25) und organische Säuren (Abbildung 26). Maltose, Isomaltose und Glucose waren dominante nichtpolymere Saccharide im Verdauungstrakt (Abbildung 25). Nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) waren die Konzentrationen und die Diversität der Monosaccharide stark erhöht. Der Kropf-/Mageninhalt wies mit etwa 110 mmol l (Wassergehalt)⁻¹ die höchste Konzentration an Monosaccharidäquivalenten auf. Mannose, Glucose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Fucose waren im Verdauungstraktinhalt vertreten und nahmen entlang des Verdauungstrakts ab. Im hydrolysierten Boden wurden geringe Konzentrationen (< 0,2 mmol l [Wassergehalt]⁻¹) von Mannose und Glucose detektiert.

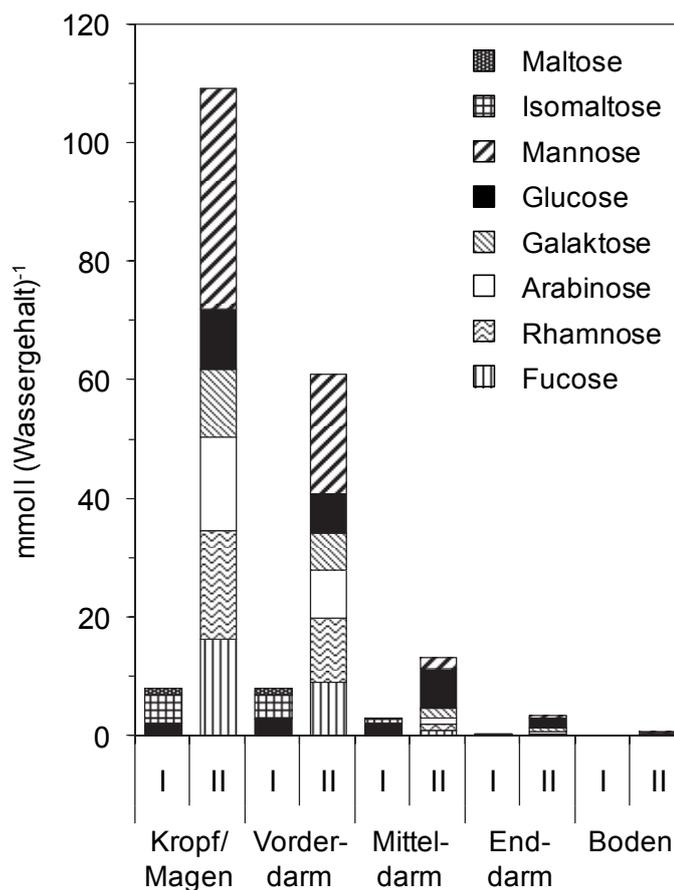


Abbildung 25. Saccharide entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten; jedes Wurmreplikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von fünf Würmern. I, unhydrolysiert; II, hydrolysiert mit 4 M TFA.

Die höchsten Konzentrationen (insgesamt etwa 32 mmol l [Wassergehalt]⁻¹) und die höchste Diversität organischer Säuren wurden im Mitteldarm nachgewiesen (Abbildung 26). Propionat und Lactat wurden überwiegend im Inhalt aus Kropf/Magen und Vorderdarm nachgewiesen, während Acetat, 2-Methylbutyrat und Butyrat hauptsächlich im Mittel- und Enddarminhalt vorkamen. Im Boden wurden vor allem Propionat, Succinat und Formiat detektiert.

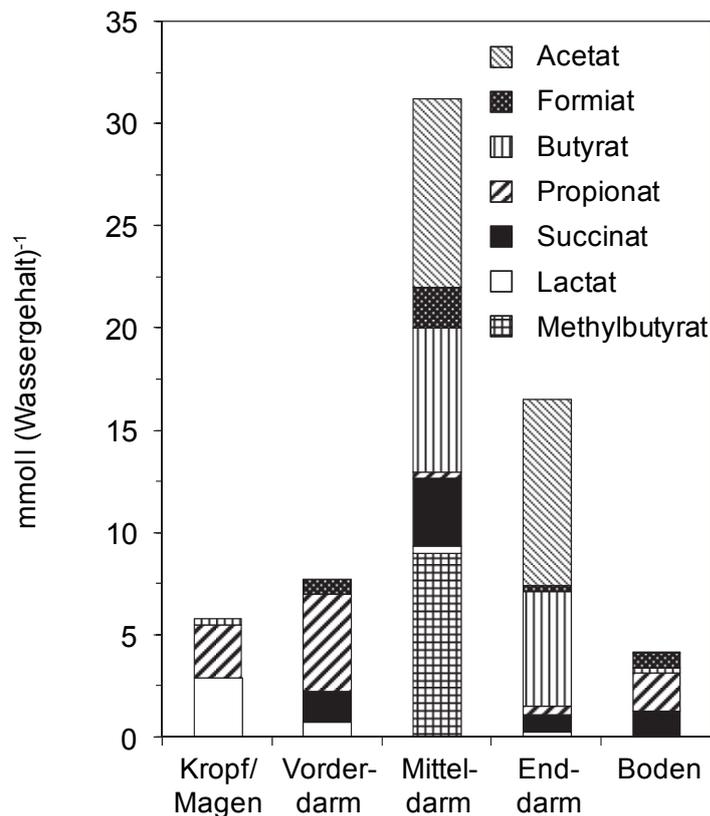


Abbildung 26. Organische Säuren entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und im Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten; jedes Wurmreplikat besteht aus Verdauungstraktinhalt von fünf Würmern.

3.2.6 Einfluss von Bodennitrat auf die *in situ*-Konzentration und die *in vivo*-Emission von N₂O bei *L. terrestris*

Um den Einfluss von erhöhten Nitratkonzentrationen im Boden auf die *in situ*-Konzentration von N₂O im Verdauungstrakt und die *in vivo*-N₂O-Emission durch Regenwürmer zu untersuchen, wurden Würmer (*L. terrestris*; durchschnittliches Frischgewicht 4,9 g ± 1,2 g) in Gefäße mit Boden der Versuchsfläche TW (Tabelle 2) gesetzt, der unterschiedlich hohe Nitratkonzentrationen aufwies (Tabelle 19). Feldfrischer Kontrollboden, dessen Wassergehalt durch Zugabe von ddH₂O an den der Nitrat-

supplementierten Böden (Wassergehalt 23 %) angepasst wurde, enthielt vor der Wurmhaltung $1,5 \text{ mmol Nitrat l (Wassergehalt)}^{-1}$ (Tabelle 19). Für Nitrat-supplementierte Böden wurden Nitratkonzentrationen von $4,7 \text{ mmol}$ und $6,2 \text{ mmol l (Wassergehalt)}^{-1}$ gemessen. Nach sechs- bis neuntägiger Haltung der Würmer auf den Böden waren die Nitratwerte im Kontrollboden um das 3,7-Fache und in Nitrat-supplementierten Böden um das 1,3- bis 1,7-Fache erhöht. Vor Zugabe der Würmer wurde weder im Kontrollboden, noch in den Nitrat-supplementierten Böden Nitrit detektiert. Nach der Wurmhaltung wurden in allen Böden Nitritkonzentrationen von $0,2 - 0,3 \text{ mmol l (Wassergehalt)}^{-1}$ gemessen.

Tabelle 19. Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Boden vor (0 d) und nach (6 - 9 d) der Zugabe von *L. terrestris*.^a

	mmol l (Wassergehalt) ⁻¹					
	vor der Wurmhaltung			nach der Wurmhaltung		
	Kontrollboden (n = 6)	Nitratboden 1 (n = 3)	Nitratboden 2 (n = 3)	Kontrollboden (n = 14)	Nitratboden 1 (n = 5)	Nitratboden 2 (n = 8)
Nitrat	$1,5 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,7$	$5,5 \pm 1,4$	$6,2 \pm 1,2$	$10,3 \pm 2,2$
Nitrit	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,2$

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 - 14 Replikaten (\pm Standardabweichung).

Nach sechs bis neun Tagen wurden die *in situ*-Konzentrationen von N_2O entlang des Darms und das N_2O -Emissionspotential der Würmer untersucht (Abbildung 27 und Abbildung 28). Trotz der hohen Variabilität zwischen den einzelnen Würmern wurde im Vorderdarm eine signifikante Zunahme der N_2O -Konzentration mit steigender Bodennitratkonzentration festgestellt (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu wirkten sich erhöhte Nitratkonzentrationen im Boden kaum auf die N_2O -Konzentrationen in Mittel- und Enddarm aus. Mittlere N_2O -Konzentrationen von $0,7 \text{ } \mu\text{mol l (Wassergehalt)}^{-1}$ wurden bereits im Enddarm von Würmern aus unsupplementiertem Boden gemessen ($n = 7$; 3.2.5.1), weshalb höhere Bodennitratkonzentrationen als Ursache für die leicht höheren N_2O -Konzentrationen im Enddarm als unwahrscheinlich gelten. Im Mitteldarm war die mittlere N_2O -Konzentration stets niedriger als an der Wurmoberfläche, was konsistent mit den Daten früherer Mikrosensormessungen (3.2.5.1) war.

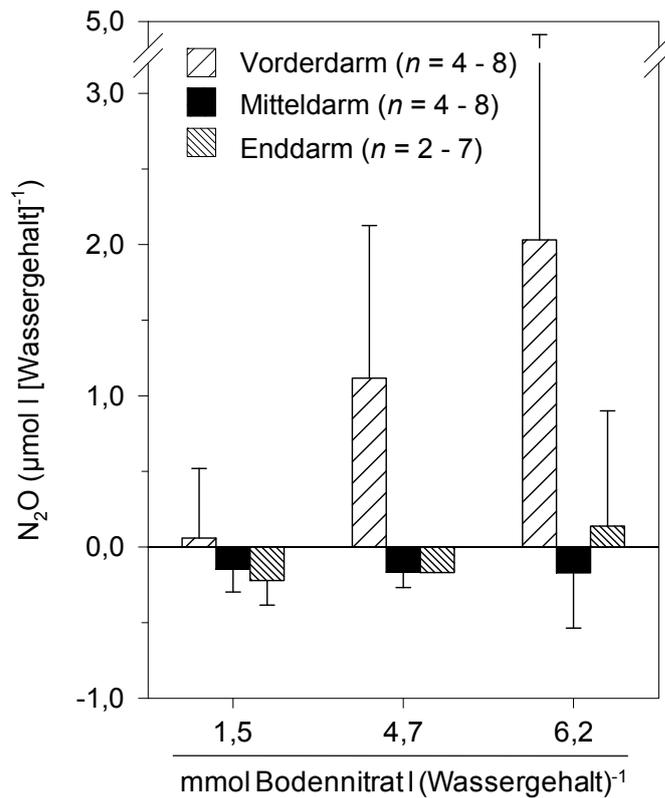


Abbildung 27. Einfluss von Bodennitrat auf die *in situ*-Konzentrationen von N₂O entlang des Darms von *L. terrestris*. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei bis acht Replikaten (+ oder - Standardabweichung). Wenn keine Standardabweichung angegeben ist, wurden zwei Replikate analysiert und der Mittelwert der zwei Replikate dargestellt.

Die *in vivo*-Emission von N₂O durch Regenwürmer stieg mit zunehmender Bodennitratkonzentration an (Abbildung 28). Würmer aus Boden mit 4,7 mmol Nitrat I (Wassergehalt)⁻¹ emittierten 1,5 x mehr und Würmer aus Boden mit 6,2 mmol Nitrat I (Wassergehalt)⁻¹ emittierten 2,6 x mehr N₂O als Würmer aus Boden mit 1,5 mmol Nitrat I (Wassergehalt)⁻¹. In Gegenwart von Acetylen erhöhten sich die N₂O-Emissionsraten aller Würmer. Der höchste Anstieg der N₂O-Emissionsrate nach Zugabe von Acetylen wurde bei Würmern aus Boden mit 4,7 mmol Nitrat I (Wassergehalt)⁻¹ verzeichnet. Ein direkter Zusammenhang zwischen Bodennitrat und Anteil an emittiertem N₂ war daher nicht abzuleiten.

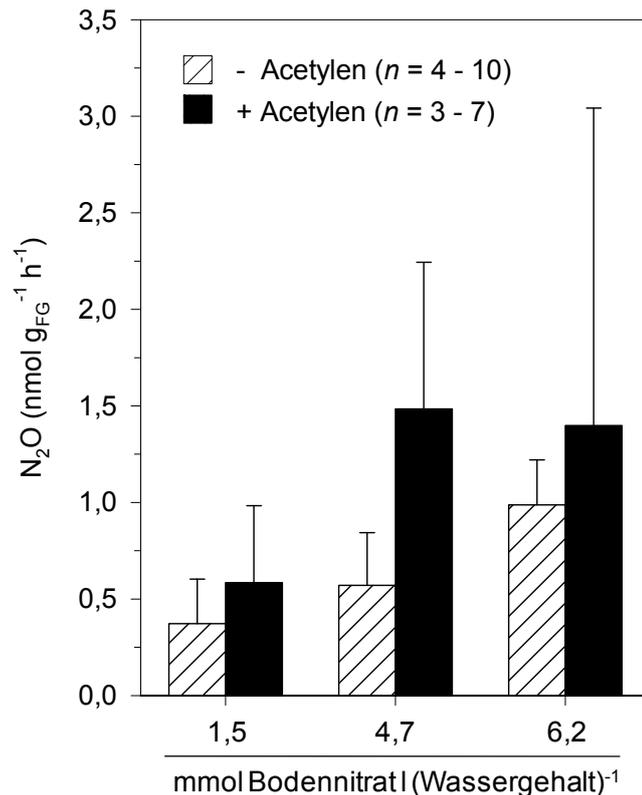


Abbildung 28. Einfluss von Bodennitrat auf die *in vivo*-Emission von N₂O durch *L. terrestris*.

Dargestellt sind die Mittelwerte von drei bis zehn Replikaten (+ Standardabweichung). Die Würmer wurden unter oxidischen Bedingungen inkubiert; nach 1,5 h wurde der Gasphase 15 % (v/v) Acetylen zugesetzt. Die Berechnung der Bildungsrate basiert auf dem Inkubationszeitraum mit einer linearen Zunahme der N₂O-Konzentration (Bildungsrate ohne Acetylen: 0 - 1,5 h, $r^2 = 0,77 - 1,00$; Bildungsrate mit Acetylen: 1,5 - 4,0 h, $r^2 = 0,63 - 1,00$).

3.2.7 Eisen(III)-Reduzierer im Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa* und *L. terrestris* und im umgebenden Boden

Im anoxischen Verdauungstrakt von *L. terrestris* wurden bis zu 5,4 mmol Eisen(II) I (Wassergehalt)⁻¹ detektiert (Abbildung 24B), was auf die Anwesenheit von aktiven Eisen(III)-Reduzierern im Verdauungstrakt hinweist. Daher wurden die höchstwahrscheinlichen Keimzahlen (MPN) von Eisen(III)-Reduzierern im Verdauungstraktinhalt des endogäischen Regenwurms *A. caliginosa* und des anözischen Regenwurms *L. terrestris* sowie im umgebenden Boden bestimmt (Tabelle 20). Die MPN von Eisen(III)-Reduzierern für Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* waren ca. 200 x und die MPN für Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa* ca. 1,5 x höher als die MPN für Boden. Zur näheren Charakterisierung der kultivierten Anaerobier wurden der Glucoseverbrauch und die Bildung organischer Säuren in den MPN-Ansätzen verfolgt (Tabelle 20 und Abbildung 29). Die MPN von Glucose-verwertenden Anaerobiern waren sehr ähnlich zu den MPN von Eisen(III)-

Reduzierern (Tabelle 20). Die Bildung von organischen Säuren wurde in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-6} von Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa* und in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-7} von Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* und Boden beobachtet (Abbildung 29). Dominantes Endprodukt in allen MPN-Ansätzen war Acetat, was auf die Vergärung des im Medium vorhandenen Citrats und/oder auf dessen Oxidation zu CO_2 und Acetat mit Eisen(III) als Elektronenakzeptor zurückzuführen ist (Bott, 1997; Coates *et al.*, 1998; Lovley, 2006). 2-Methylbutyrat kam etwa zu gleichen Konzentrationen in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} aller MPN-Ansätze vor und weist auf die Vergärung der im Medium vorhandenen Aminosäuren (in Form von Hefeextrakt) hin (Gottschalk, 1986). Die Bildung von Propionat wurde ebenfalls in allen MPN-Ansätzen beobachtet und nahm mit zunehmender Verdünnung ab. Lactat wurde ausschließlich in den höheren Verdünnungsstufen von Boden gebildet; Succinat und Formiat wurden hauptsächlich in den höheren Verdünnungsstufen von Verdauungstraktinhalt aus *L. terrestris* gebildet. Die Bildung von Butyrat wurde in beiden MPN-Ansätzen für Verdauungstraktinhalt beobachtet, konnte jedoch aufgrund methodischer Limitationen nicht quantifiziert werden. Die gesammelten Beobachtungen deuten an, dass neben Eisen(III)-Reduzierern auch diverse gärende Mikroorganismen im Verdauungstrakt von Regenwürmern vorkommen.

Tabelle 20. Höchstwahrscheinliche Keimzahlen (MPN) von Eisen(III)-Reduzierern und Glucose-verwertenden Anaerobiern aus Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa*, *L. terrestris* und umgebendem Boden. ^a

	MPN g (Trockengewicht) ⁻¹		
	<i>A. caliginosa</i>	<i>L. terrestris</i>	Boden
Eisen(III)-Reduzierer	$4,5 \times 10^4$ ($9,6 \times 10^3 - 2,1 \times 10^5$)	$5,6 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^6 - 2,6 \times 10^7$)	$2,8 \times 10^4$ ($6,1 \times 10^3 - 1,3 \times 10^5$)
Glucose-verwertende Anaerobier	$4,5 \times 10^4$ ($9,6 \times 10^3 - 2,1 \times 10^5$)	$2,0 \times 10^6$ ($4,2 \times 10^5 - 9,2 \times 10^6$)	$2,8 \times 10^4$ ($6,1 \times 10^3 - 1,3 \times 10^5$)

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Triplikaten. In Klammern sind die Konfidenzintervalle mit 95 % Wahrscheinlichkeit angegeben. Die Bestimmung der MPN pro Gramm Trockengewicht wurde mit seriell verdünntem Material durchgeführt, das für vier Monate unter anoxischen Bedingungen inkubiert wurde. Als Medium diente ERan (2.7.1.2.1), das neben Hefeextrakt 1 mM Succinat, 1 mM Acetat, ca. 8,5 mM Citrat, 0,2 mM Glucose und 40 mM Eisen(III) enthielt.

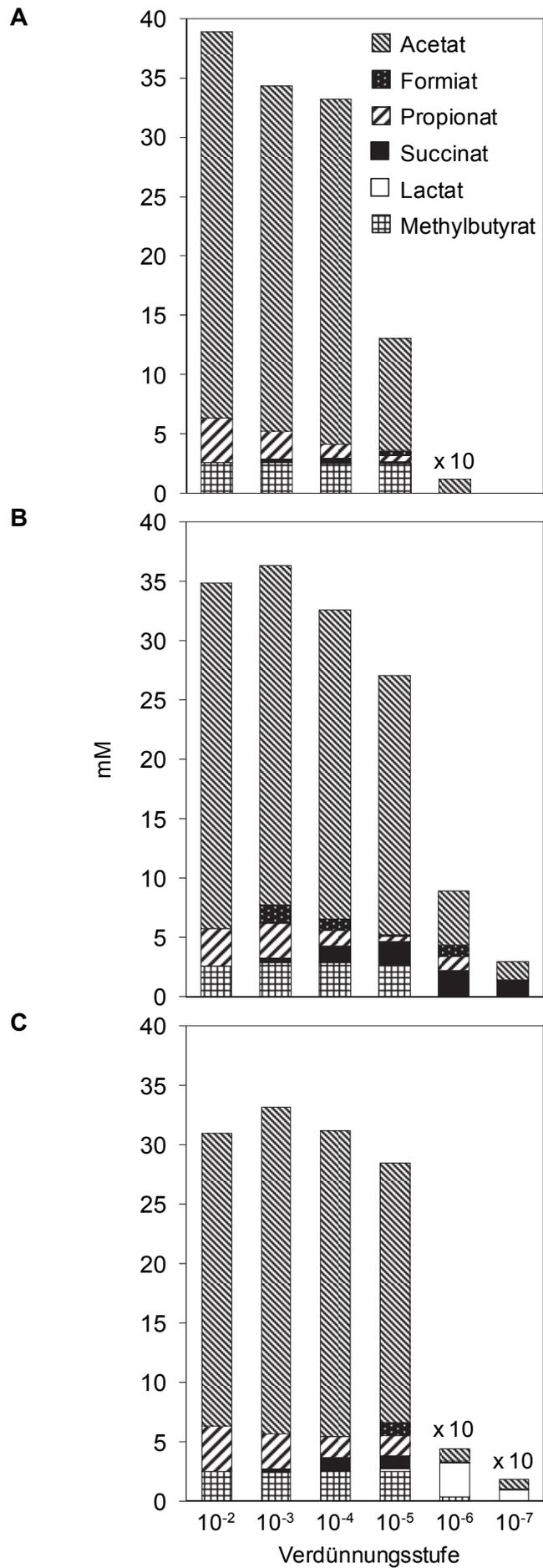


Abbildung 29. Lösliche organische Verbindungen in anoxischen MPN-Ansätzen für Eisen(III)-Reduzierer aus Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa* (A), *L. terrestris* (B) und umgebendem Boden (C). Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten, die um die unbeimpften Kontrollen korrigiert wurden. Die Bestimmung der MPN pro Gramm Trockengewicht wurde mit seriell verdünntem Material durchgeführt, das für vier Monate unter anoxischen Bedingungen inkubiert wurde. Als Medium diente ERan (2.7.1.2.1), das neben Hefeextrakt 1 mM Succinat, 1 mM Acetat, ca. 8,5 mM Citrat, 0,2 mM Glucose und 40 mM Eisen(III) enthielt.

3.2.8 Gärungsprozesse im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* und im umgebenden Boden

Um das Gärungspotential von Verdauungstraktinhalt und Boden zu bestimmen und aktive Gärungsprozesse zu identifizieren, wurden Inhalt aus verschiedenen Verdauungstraktbereichen von *L. terrestris* und umgebender Boden mit 10 mmol Glucose I (Wassergehalt)⁻¹ unter anoxischen Bedingungen inkubiert.

3.2.8.1 Einfluss von Glucose auf Gärungsprozesse im Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm und im Boden

Im Gegensatz zu den unsupplementierten Bodeninkubationen wurden in den unsupplementierten Inkubationen von Kropf-, Magen- und Vorderdarminhalt zu Beginn 0,6 mmol Glucose I (Wassergehalt)⁻¹ detektiert (Abbildung 30A), was auf die Anwesenheit von endogenen Sacchariden im Verdauungstrakt schließen lässt (3.2.5.6). Da der Verdauungstraktinhalt vor der Inkubation im Verhältnis 1 : 10 (w/v) verdünnt wurde (2.5.4), kann eine durchschnittliche *in situ*-Konzentration von 6 mmol Glucose I (Wassergehalt)⁻¹ im Kropf/Magen und Vorderdarm der analysierten Regenwürmer angenommen werden. Der Verbrauch von Glucose setzte erst nach etwa 8 h ein (Abbildung 30A). Innerhalb von 24 h wurden im Glucose-supplementierten Verdauungstraktinhalt 5,5 mmol Glucose I (Wassergehalt)⁻¹ und im Glucose-supplementierten Boden 2,2 mmol Glucose I (Wassergehalt)⁻¹ verbraucht. In Bodeninkubationen akkumulierten während der ersten 2 h etwa 1,5 mmol N₂O I (Wassergehalt)⁻¹, welche unmittelbar danach verbraucht wurden (Abbildung 30B). Zusätzliche Glucose hatte keinen Einfluss auf die N₂O-Bildung im Boden. Im Verdauungstraktinhalt wurde überhaupt keine N₂O-Bildung detektiert. CO₂ wurde in allen Inkubationen von Beginn an gebildet, während die H₂-Konzentrationen während der ersten 8 h sehr niedrig (< 0,004 mmol I [Wassergehalt]⁻¹) waren (Abbildung 30C und Abbildung 30D). In den unsupplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt war nach 24 h die CO₂-Bildung 34 x höher als in den unsupplementierten Bodeninkubationen. Zusätzliche Glucose hatte im Verdauungstraktinhalt und im Boden nur einen minimal stimulierenden Effekt auf die CO₂-Bildung. Innerhalb von 24 h akkumulierten in den unsupplementierten

Inkubationen von Verdauungstraktinhalt $1,2 \text{ mmol H}_2 \text{ l (Wassergehalt)}^{-1}$, während in den unsupplementierten Bodeninkubationen keine H_2 -Bildung stattfand. In Glucose-supplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt wurden $2,6 \text{ mmol H}_2 \text{ l (Wassergehalt)}^{-1}$ und in Glucose-supplementierten Bodeninkubationen $0,02 \text{ mmol H}_2 \text{ pro l (Wassergehalt)}^{-1}$ gebildet.

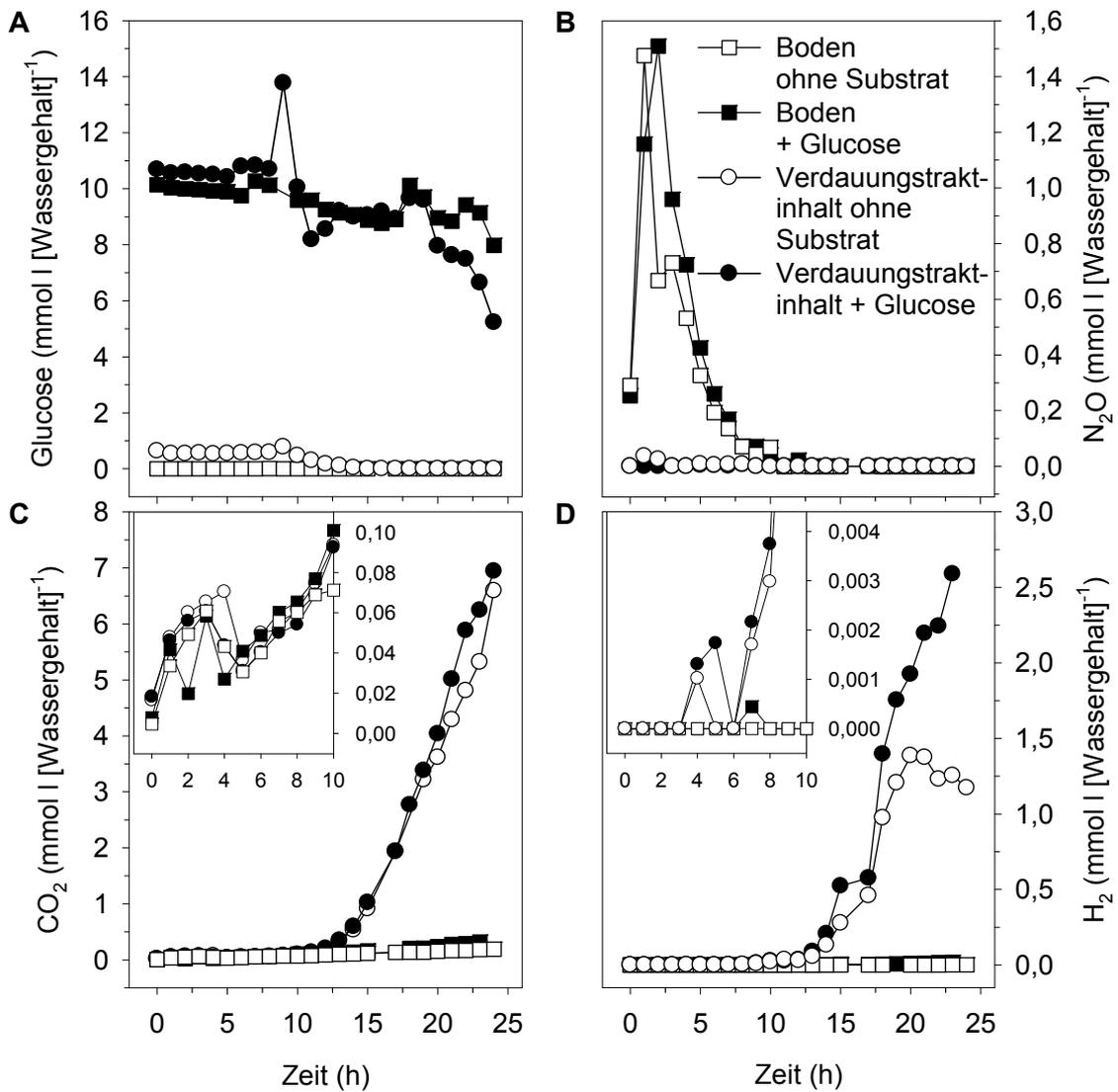


Abbildung 30. Einfluss von Glucose (A) auf die Bildung von N_2O (B), CO_2 (C) und H_2 (D) in anoxischen Inkubationen von Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm von *L. terrestris* und in anoxischen Inkubationen von Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. In den Elementen C und D befinden sich Vergrößerungen der initialen Inkubationszeit. Die Inkubationsbedingungen sind unter 2.5.4.1 aufgeführt.

Zu Inkubationsbeginn wurde für alle Inkubationen ein pH-Wert von 7,2 gemessen. Nach 24-stündiger Inkubation betrug der pH-Wert in den Bodeninkubationen und in den un-supplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt 7,0 bis 7,2. In Glucose-supplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt wurde nach 24 h ein pH-Wert von 6,6 gemessen. Insgesamt wurden in un-supplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt 6,0 mmol und in Glucose-supplementierten Inkubationen von Verdauungstraktinhalt 7,8 mmol organische Säuren l (Wassergehalt)⁻¹ gebildet (Tabelle 21). In un-supplementierten Bodeninkubationen akkumulierten 0,1 mmol und in Glucose-supplementierten Bodeninkubationen 0,4 mmol organische Säuren l (Wassergehalt)⁻¹. Acetat, Propionat und 2-Methylbutyrat waren Endprodukte in den Inkubationen von Verdauungstraktinhalt. Die Konzentrationen von Formiat waren nach 18 h am höchsten und nahmen danach ab. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Formiat ein Intermediat war. In un-supplementierten Bodeninkubationen akkumulierte lediglich Formiat. In den Bodeninkubationen stimulierte zusätzliche Glucose die Formiat-Bildung und führte zur Acetat-Bildung.

Das Gärungspotential von Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm des Regenwurms war wesentlich höhere als das von Boden und wurde durch zusätzliche Glucose nur gering gesteigert. Die großen Mengen an endogenen organischen Kohlenstoffverbindungen im vorderen Bereich des Verdauungstrakts (3.2.5.6) bieten möglicherweise bereits ideale Bedingungen für Gärungsaktivitäten und führten für die Inkubationsdauer von 24 h zu einer Substratsättigung der mikrobiellen Gemeinschaft. Für den Hauptversuch, der die Identifikation von Glucose-verwertenden Bakterien aus dem Verdauungstrakt zum Ziel hatte, war der Verbrauch der supplementierten Glucose erforderlich. Für weitere Inkubationen wurde daher die Inkubationsdauer verdoppelt und Inhalt aus Mittel- und Enddarm eingesetzt, der weniger endogene organische Kohlenstoffverbindungen enthält (3.2.5.6).

Tabelle 21. Einfluss von Glucose auf die Bildung von löslichen organischen Verbindungen in anoxischen Inkubationen von Inhalt aus Kropf, Magen und Vorderdarm von *L. terrestris* und in anoxischen Inkubationen von Boden. ^a

Probe, Substrat	Zeit (h)	Organische Verbindung (mmol l [Wassergehalt] ⁻¹)			
		Acetat	Formiat	Propionat	2-Methylbutyrat
Darminhalt, ohne Substrat	0	0,1	0	0	0
	6	0,1	0	0	0
	12	0	0,2	0	0
	18	3,4	0,7	0,2	0,2
	24	4,6	0	0,9	0,5
Darminhalt, Glucose	0	0,1	0	0	0
	6	0,1	0	0	0
	12	0	0,2	0	0
	18	3,1	1,1	0,2	0,2
	24	6,6	0	0,7	0,5
Boden, ohne Substrat	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	12	0	0,1	0	0
	18	0	0,1	0	0
	24	0	0,1	0	0
Boden, Glucose	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
	18	0,1	0,1	0	0
	24	0,2	0,2	0	0

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Duplikaten. Die Inkubationsbedingungen sind unter 2.5.4.1 aufgeführt.

3.2.8.2 Einfluss von [^{12}C]- und [^{13}C]Glucose auf Gärungsprozesse im Mittel- und Enddarminhalt

Um aktive Glucose-verwertende Mikroorganismen im Verdauungstraktinhalt zu identifizieren, wurde Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* mit ^{13}C -markierter Glucose inkubiert. Zu Beginn der Inkubation wurde in den unsupplementierten Kontrollen etwa 1 mmol Glucose I (Wassergehalt) $^{-1}$ detektiert (Abbildung 31A). Da der Verdauungstraktinhalt vor der Inkubation im Verhältnis 1 : 10 (w/v) verdünnt wurde (2.5.4), kann eine durchschnittliche *in situ*-Konzentration von 10 mmol Glucose I (Wassergehalt) $^{-1}$ im Mittel- und Enddarm der analysierten Regenwürmer angenommen werden. In allen Inkubationen war nach 6 h ein leichter Anstieg der Glucose-Konzentration zu verzeichnen, der möglicherweise auf die Hydrolyse von Polysacchariden im Verdauungstraktinhalt zurückzuführen ist (3.2.5.6). Die Detektion von Glucose in den unsupplementierten Kontrollen sowie von Cellobiose in allen Inkubationen unterstützt die Hypothese, dass im Mittel- und Enddarm endogene Saccharide vorkommen. In den Glucose-supplementierten Inkubationen wurde Glucose innerhalb von 48 h und in den unsupplementierten Inkubationen innerhalb von 24 h vollständig verbraucht (Abbildung 31A). Der Verbrauch von Glucose verlief relativ linear; pro Stunde wurden durchschnittlich 0,3 mmol [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose verbraucht (Berechnung basiert auf dem Inkubationszeitraum mit einer linearen Abnahme der Glucose-Konzentration; $r^2 = 1$). Die Produktprofile der [^{12}C]- und [^{13}C]Glucose-Inkubationen waren nahezu identisch (Abbildung 31B, Abbildung 31C und Tabelle 22), was auf ähnliche mikrobielle Aktivitäten in beiden Inkubationsansätzen schließen lässt. In den unsupplementierten Kontrollen akkumulierten innerhalb von 51 h etwa 7 mmol CO_2 I (Wassergehalt) $^{-1}$ und 0,6 mmol H_2 I (Wassergehalt) $^{-1}$. In den Glucose-supplementierten Inkubationen waren die CO_2 -Bildung 3 x und die H_2 -Bildung 13 x höher als in den Kontrollen. Die Zugabe von Glucose senkte folglich das stöchiometrische Verhältnis von gebildetem CO_2 zu gebildetem H_2 . CO_2 wurde von Beginn an gebildet, während die H_2 -Konzentrationen während der ersten 12 h sehr niedrig (< 0,02 mmol I [Wassergehalt] $^{-1}$) waren.

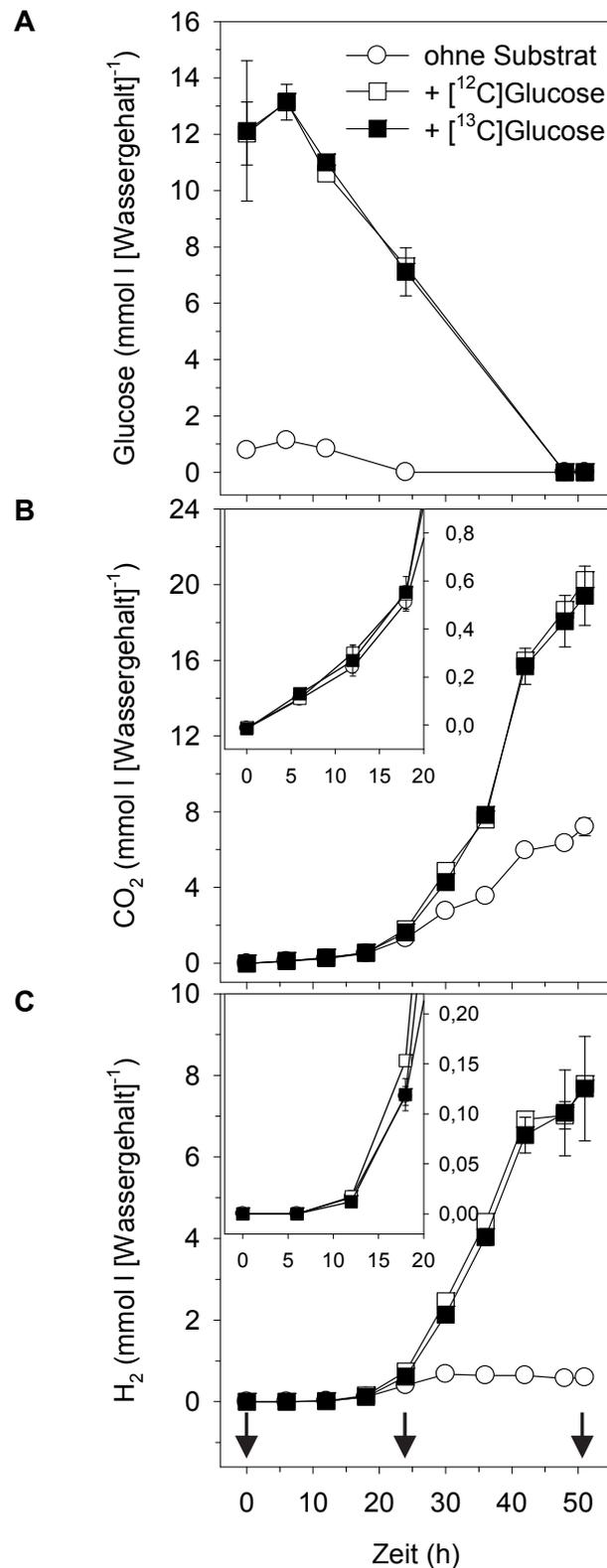


Abbildung 31. Einfluss von [¹²C]- und [¹³C]Glucose (A) auf die Bildung von CO₂ (B) und H₂ (C) in anoxischen Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris*. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten (± Standardabweichung). In den Elementen B und C befinden sich Vergrößerungen der initialen Inkubationszeit. Pfeile markieren die Probenahme für molekularbiologische Analysen (RNA-SIP). Die Inkubationsbedingungen sind unter 2.5.4.2 aufgeführt.

Tabelle 22. Einfluss von [¹²C]- und [¹³C]Glucose auf die Bildung von löslichen organischen Verbindungen in anoxischen Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris*.^a

Substrat	Zeit (h)	Organische Verbindung (mmol l [Wassergehalt] ⁻¹)							
		Acetat	Lactat	Butyrat	Formiat	Succinat	Propionat	Ethanol	Cellobiose
ohne Substrat	0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	6	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,0
	12	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	24	1,3 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0 ± 0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0 ± 0	0,5 ± 0,5	0 ± 0
	48	2,6 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,0	0 ± 0	0,3 ± 0,1	0 ± 0
	51	4,0 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0 ± 0
[¹² C]Glucose	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0,2
	6	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,0
	12	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,0
	24	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0 ± 0	1,0 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0 ± 0,1	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,0
	48	5,9 ± 0,6	3,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0 ± 0	2,1 ± 0,1	0 ± 0
	51	8,9 ± 0,4	4,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0 ± 0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	4,2 ± 1,1	0 ± 0
[¹³ C]Glucose	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0,2
	6	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,0
	12	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,0
	24	1,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0 ± 0	1,1 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0
	48	5,5 ± 1,5	3,4 ± 1,0	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0 ± 0	1,7 ± 0,6	0 ± 0
	51	8,0 ± 1,9	3,9 ± 0,8	1,5 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0	3,6 ± 1,0	0 ± 0

^a Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Triplikaten (± Standardabweichung). Wenn keine Standardabweichung aufgeführt ist, wurden zwei Replikate analysiert und der Mittelwert der zwei Replikate angegeben. Die Inkubationsbedingungen sind unter 2.5.4.2 aufgeführt.

Zu Inkubationsbeginn wurde für alle Inkubationen ein pH-Wert von 7,3 gemessen. Nach 51-stündiger Inkubation betrug der pH-Wert in den Glucose-supplementierten Inkubationen 6,9 und in den unsupplementierten Inkubationen 7,3, was mit der erhöhten Produktion von organischen Säuren in den Glucose-supplementierten Inkubationen einherging (Tabelle 22). Acetat, Butyrat, Lactat, Propionat, Succinat und Ethanol waren Endprodukte in den Glucose-supplementierten Inkubationen, während Formiat ein Intermediat war und höchste

Konzentrationen nach 24 h aufwies. In den Kontrollen waren Lactat, Formiat und Succinat Intermediate, während Actetat, Propionat und Ethanol als Endprodukte detektiert wurden. In allen Inkubationen war Acetat die am höchsten konzentrierte organische Säure. Zudem wurden in den Kontrollen geringe Konzentrationen ($< 0,06 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Wassergehalt}]^{-1}$) an Isobutyrat und 2-Methylbutyrat detektiert (Daten nicht gezeigt).

Nach 51-stündiger Inkubation wurden 72 % des zugegebenen Glucose-Kohlenstoffs in Gärungsprodukten der ^{12}C - und 60 % in Gärungsprodukten der ^{13}C -Inkubationen wiedergefunden (Abbildung 32A).

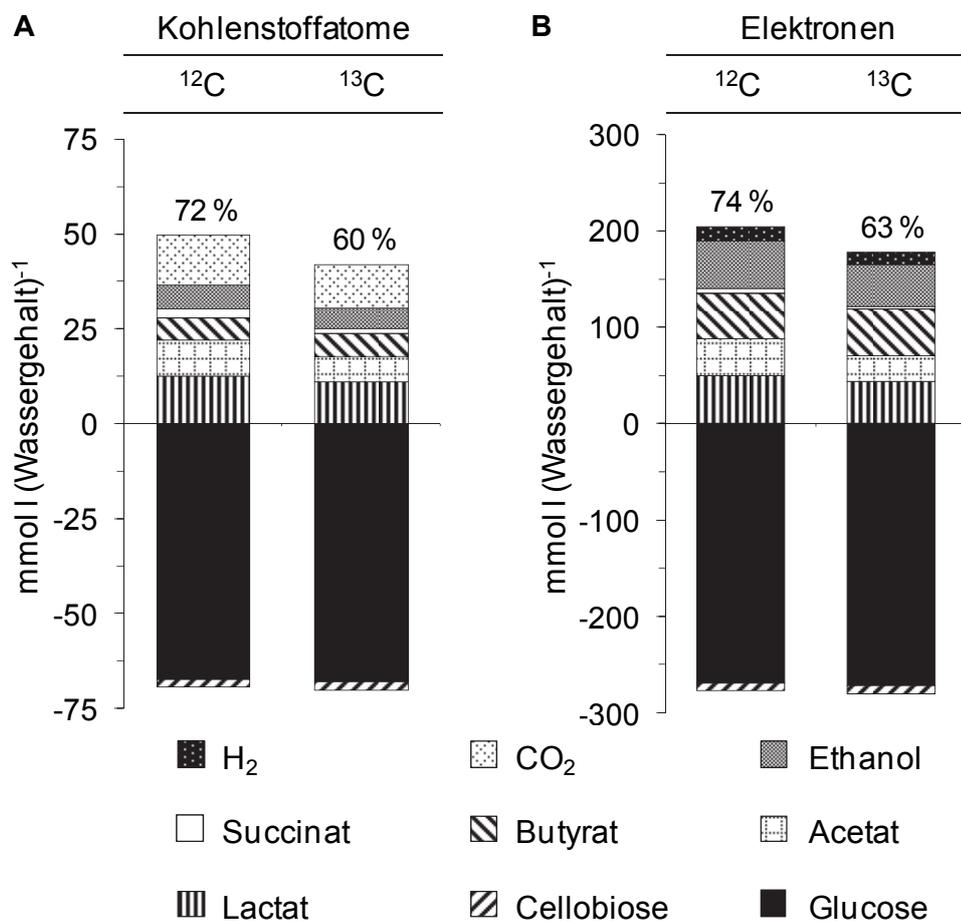


Abbildung 32. Bilanzierung der Kohlenstoff- (A) und Elektronenflüsse (B) nach 51 h einer anoxischen Inkubation von Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* mit ^{12}C - bzw. ^{13}C Glucose. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten, die um die un-supplementierten Kontrollen korrigiert wurden. Die Bilanzierung erfolgte für die komplette Inkubationsdauer von 51 h. Positive Werte weisen auf eine Bildung, negative Werte auf einen Verbrauch hin. Die Werte über den Balken geben die prozentuale Wiederfindung der verbrauchten Kohlenstoffatome bzw. Elektronen in den detektierten Gärungsprodukten an. ^{12}C , Inkubation mit ^{12}C Glucose; ^{13}C , Inkubation mit ^{13}C Glucose.

Der größte Anteil an Glucose-Kohlenstoff wurde in CO₂ nachgewiesen (19 % in der [¹²C]- und 16 % in der [¹³C]-Inkubation), gefolgt von Lactat (18 % in der [¹²C]- und 16 % in der [¹³C]-Inkubation) und Acetat (14 % in der [¹²C]- und 9 % in der [¹³C]-Inkubation). Etwa 74 % der zugegebenen Glucose-Elektronen wurden in Gärungsprodukten der [¹²C]- und 63 % in Gärungsprodukten der [¹³C]-Inkubationen detektiert (Abbildung 32B). Der größte Anteil an Glucose-Elektronen wurde in Lactat (18 % in der [¹²C]- und 15 % in der [¹³C]-Inkubation), Ethanol (18 % in der [¹²C]- und 15 % in der [¹³C]-Inkubation) und Butyrat (17 % in beiden Inkubationen) detektiert.

3.2.9 Identifikation von Glucose-verwertenden *Bacteria* im Mittel- und Enddarminhalt mit Hilfe der 16S rRNA basierten Stablen-Isotopenbeobachtung

Die Technik der Stablen-Isotopenbeobachtung („stable isotope probing“, SIP) wurde angewendet, um aktive und Glucose-verwertende Mikroorganismen der Domäne *Bacteria* aus den Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt (3.2.8.2) zu identifizieren und den oben beschriebenen Prozessen zuzuordnen.

3.2.9.1 Dichtegradientenzentrifugation

Nach Extraktion und Aufreinigung der RNA aus den Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt (3.2.8.2) wurde die isotopisch ‚schwere‘ ¹³C-RNA der Glucose-assimilierenden Organismen mit Hilfe einer CsTFA-Dichtegradientenzentrifugation von der isotopisch ‚leichten‘ ¹²C-RNA der restlichen mikrobiellen Gemeinschaft getrennt. Im Anschluss an die Fraktionierung der einzelnen Gradienten wurde anhand eines Kontrollgradienten ohne RNA die Schwebdichte in den einzelnen Fraktionen bestimmt (Abbildung 33). Während der 62-stündigen Zentrifugation bildete sich ein reproduzierbarer, linearer Gradient aus, der sich über eine Dichte von 1,76 bis 1,83 g ml⁻¹ erstreckte. In der Literatur wird für vollständig markierte ¹³C-rRNA, die aus einer Reinkultur von *Methylobacterium extorquens* (GC-Gehalt 55 %) stammte, eine mittlere Schwebdichte von 1,815 g ml⁻¹ angegeben, während die mittlere Schwebdichte von unmarkierter ¹²C-rRNA unter 1,790 g ml⁻¹ liegt (Lueders *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA jedoch nicht aus einer Reinkultur mit einem definierten GC-Gehalt gewonnen, sondern aus Umweltproben. Vollständig markierte ¹³C-RNA (in der ‚schweren‘ Fraktion) und unmarkierte ¹²C-RNA (in der ‚leichten‘ Fraktion) wurden daher mit Hilfe der RNA-Quantifizierung und der tRFLP-Analyse (3.2.9.2) unterschieden.

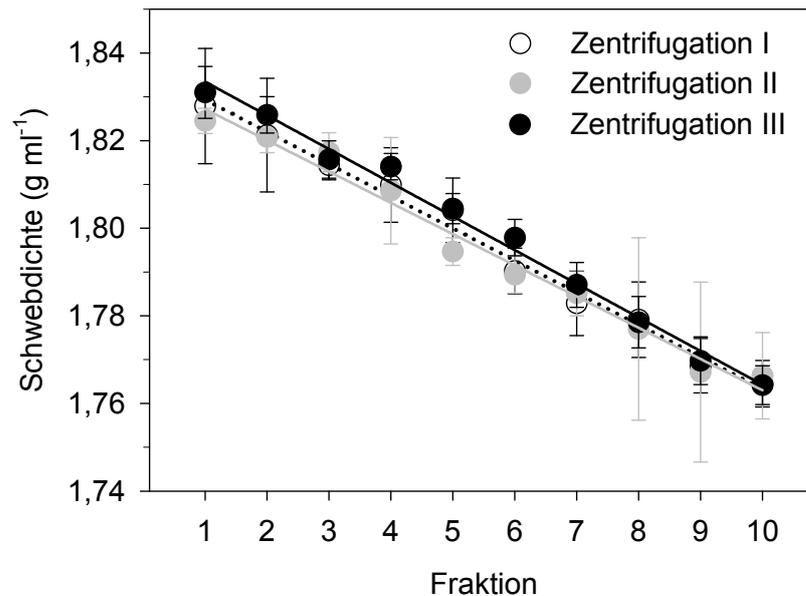


Abbildung 33. Schwebdichte der fraktionierten CsTFA-Gradientenlösung ohne RNA bei 25 °C nach den Ultrazentrifugationen. Dargestellt sind die Mittelwerte von zehn Messungen (\pm Standardabweichung). Die Linien zeigen die lineare Regression ($r^2 = 0,98 - 0,99$).

3.2.9.2 Auswahl der ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Fraktionen

3.2.9.2.1 Verteilung der RNA entlang des Dichtegradienten

Die fraktionierte RNA wurde präzipitiert und quantifiziert. Die Verteilung der RNA über alle Gradientenfraktionen wurde am Beispiel jeweils eines Replikats für die [¹²C]- und die [¹³C]-Inkubationen bestimmt (Abbildung 34). Für das Replikat der [¹²C]-Inkubation wurden 64 - 98 % der für die Ultrazentrifugation eingesetzten RNA in den Fraktionen 1 - 11 wiedergefunden. Für das Replikat der [¹³C]-Inkubation betrug die RNA-Wiederfindung 76 - 97 %. Zu Beginn der Inkubationen wies der Großteil der RNA eine Dichte zwischen 1,778 und 1,785 g ml⁻¹ auf (Abbildung 34). Für RNA aus der [¹²C]-Inkubation wurde vor (0 h, Zeitpunkt t_0), während (24 h, Zeitpunkt t_{24}) und nach (51 h, Zeitpunkt t_{51}) der Inkubation eine ähnliche Verteilung festgestellt (Abbildung 34A). Die meiste RNA aus der [¹³C]-Inkubation wies nach 24 h eine Dichte von 1,785 g ml⁻¹ und nach 51 h eine Dichte von 1,801 g ml⁻¹ auf (Abbildung 34B). Die Verschiebung der RNA-Verteilung während der Inkubation mit [¹³C]Glucose deutet auf eine Anreicherung der RNA mit dem ‚schweren‘ Isotop ¹³C hin und belegt eine erfolgreiche Markierung [¹³C]Glucose-assimilierender Mikroorganismen. Unter Berücksichtigung der höchstwahrscheinlich stark variierenden GC-Gehalte der Nukleinsäuren im Regenwurmdarminhalt wurden Fraktionen mit einer Dichte zwischen 1,769 und 1,778 g ml⁻¹ (Fraktionen 8 und 9) als ‚leichte‘ Fraktionen und Fraktionen mit einer Dichte zwischen 1,811 und 1,816 g ml⁻¹ (Fraktionen 3 und 4) als ‚schwere‘ Fraktionen definiert und für weitere molekularbiologische Analysen herangezogen.

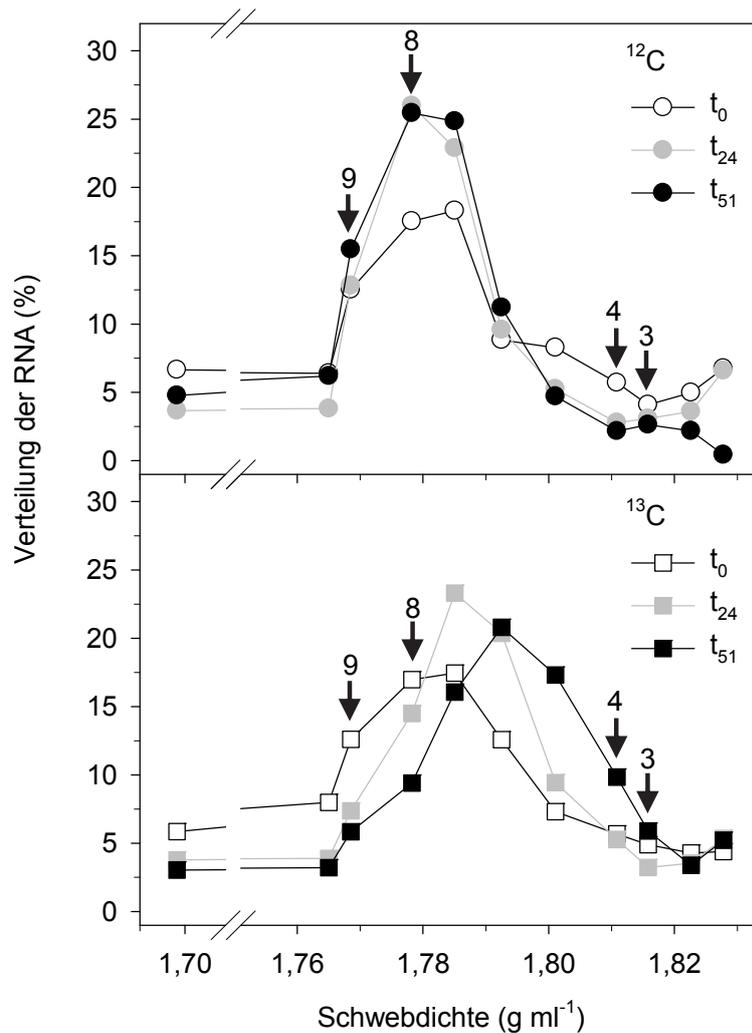


Abbildung 34. Verteilung der RNA aus Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* vor (0 h), während (24 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose entlang des Dichtegradienten. Dargestellt sind die Werte für jeweils ein Replikat. Pfeile markieren die ‚schweren‘ Fraktionen (3 und 4) und die ‚leichten‘ Fraktionen (8 und 9), die für weitere Analysen ausgewählt wurden. t_0 , Inkubationsbeginn; t_{24} , 24 h Inkubationszeit; t_{51} , 51 h Inkubationszeit; ^{12}C , Inkubation mit [^{12}C]Glucose; ^{13}C , Inkubation mit [^{13}C]Glucose.

3.2.9.2.2 *t*RFLP-Analyse

Die Anreicherung der RNA mit dem ‚schweren‘ Isotop ^{13}C sowie die Auswahl der ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Fraktionen wurden zudem mit Hilfe der *t*RFLP-Analyse überprüft. Hierfür wurden für jeweils ein Replikat der [^{12}C]- und [^{13}C]-Inkubationen die bakteriellen 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus der cDNA aller Fraktionen unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Vorwärtsprimers amplifiziert. Die Amplifikation der 16S rRNA Genfragmente war für alle Proben erfolgreich (Abbildung 35 und Daten nicht gezeigt). Jedoch lieferte auch der PCR-Ansatz mit der Negativkontrolle der RT-PCR statt eines

Templates (Negativkontrolle 4) ein PCR-Produkt (Abbildung 35). Weitere PCR-Analysen, Klonierung und Sequenzierung dieses PCR-Produkts sowie eine gesonderte tRFLP-Analyse ergaben, dass es sich hierbei ausschließlich um Sequenzen eines *Escherichia coli*-Stammes handelt (Daten nicht gezeigt). Diese Sequenzen wurden auch mit neu geöffneten RT-PCR-Chemikalien nachgewiesen und sind höchstwahrscheinlich auf eine mangelhafte Aufreinigung der Reversen Transkriptase seitens des Herstellers (SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Paisley, UK) zurückzuführen, welche laut Herstellerangaben über *E. coli* synthetisiert wird.

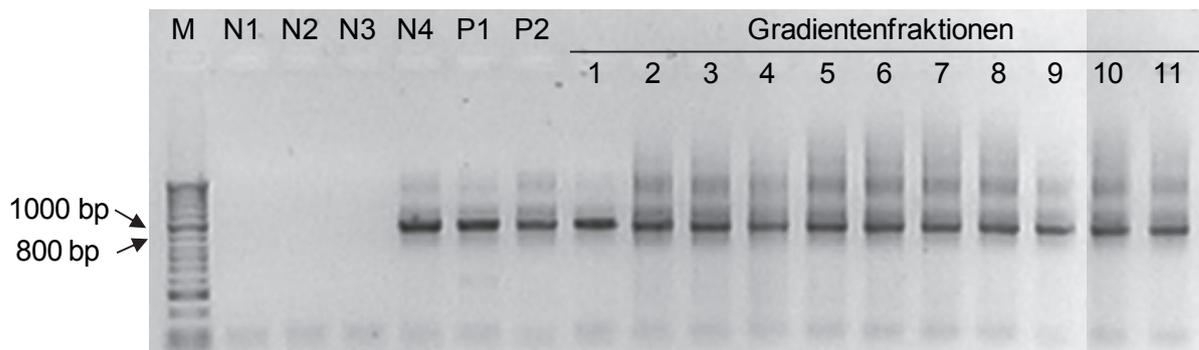


Abbildung 35. Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR potentieller 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus cDNA der Gradientenfractionen 1 - 11 mit dem Primerpaar 27f-DY681/907r für die tRFLP-Analyse. Dargestellt sind die Ergebnisse für das Replikat der [^{12}C]-Inkubation und 51 h Inkubationszeit (t_{51}). M, DNA-Marker MWM-2; N1, Negativkontrolle 1 (Ansatz mit RNA); N2, Negativkontrolle 2 (Ansatz mit PCR- H_2O); N3, Negativkontrolle 3 (Ansatz mit RNase-freiem H_2O aus RT-PCR-Kit); N4, Negativkontrolle 4 (Ansatz mit Negativkontrolle der RT-PCR); P1, Positivkontrolle 1 (Ansatz mit Positivkontrolle der RT-PCR); P2, Positivkontrolle 2 (Ansatz mit genomischer DNA aus einer Reinkultur). Die Pfeile weisen auf die Fragmentgröße wichtiger Markerbanden hin.

Die tRFLP-Profile der bakteriellen 16S rRNA Genfragmente aus [^{12}C]- und [^{13}C]-Inkubationen wiesen deutliche Unterschiede auf, welche bereits nach 24-stündiger Inkubation auftraten (Abbildung 36). Zudem unterschieden sich die tRFLP-Profile der 16S rRNA Genfragmente aus den ‚leichten‘ Fraktionen (8 und 9) von den tRFLP-Profilen der ‚schweren‘ Fraktionen (3 und 4) der [^{13}C]-Inkubation. Diese Beobachtungen belegen, dass (a) Mikroorganismen der Domäne *Bacteria* [^{13}C]Glucose assimilierten und das ‚schwere‘ Isotop ^{13}C in ihre RNA einbauten, (b) die Auftrennung von ^{12}C -RNA und ^{13}C -RNA erfolgreich war und (c) cDNA aus den Fraktionen 3, 4, 8 und 9 zur vergleichenden Analyse der bakteriellen Gemeinschaft geeignet ist.

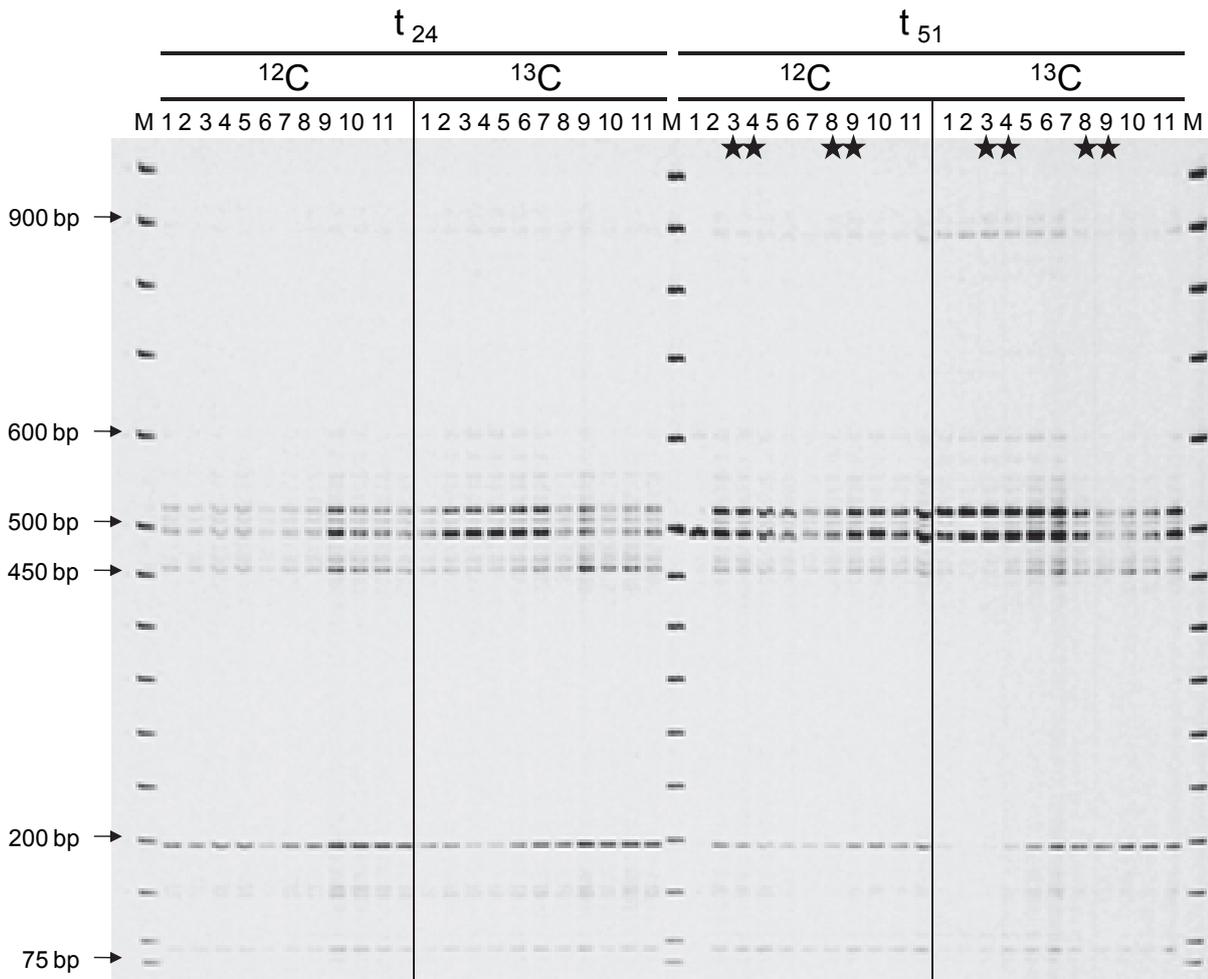


Abbildung 36. tRFLP-Analyse der 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus den Gradientenfraktionen 1 - 11 nach 24 h bzw. 51 h einer anoxischen Inkubation von Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* mit [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose. Dargestellt ist die tRFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease MspI für jeweils ein Replikat. t_{24} , 24 h Inkubationszeit; t_{51} , 51 h Inkubationszeit; ^{12}C , Inkubation mit [^{12}C]Glucose; ^{13}C , Inkubation mit [^{13}C]Glucose; M, DNA-Marker Microzone 15a. Sterne markieren die ‚schweren‘ Fraktionen (3 und 4) und die ‚leichten‘ Fraktionen (8 und 9), die für weitere Analysen ausgewählt wurden. Die Pfeile weisen auf die Fragmentgröße wichtiger Markerbanden hin.

3.2.9.3 Erstellung der 16S rRNA Genbibliotheken

Für die Erstellung der Genbibliotheken wurden die bakteriellen 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus der cDNA der Fraktionen 3, 4, 8 und 9 der [^{12}C]- und [^{13}C]-Inkubationen amplifiziert. Die Amplifikation der 16S rRNA Genfragmente war für alle Proben erfolgreich und lieferte Banden mit der gewünschten Fragmentgröße (Daten nicht gezeigt). Alle PCR-Produkte der ‚schweren‘ (3 und 4) bzw. der ‚leichten‘ Fraktionen (8 und 9) wurden zu gleichen Teilen vereinigt und für die Klonierung eingesetzt. Es wurden acht Genbibliotheken

angefertigt, um die Diversität und Abundanz der *Bacteria* in den ‚schweren‘ und ‚leichten‘ Fraktionen vor (0 h) und nach (51 h) den [¹²C]- und [¹³C]Glucose-Inkubationen von Verdauungstraktinhalt zu vergleichen. Insgesamt wurden 964 Klon-Inserts erfolgreich sequenziert, wovon 244 (25 %) als chimärische Sequenzen identifiziert wurden (Tabelle 23).

Tabelle 23. Analyse der 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [¹²C]- bzw. [¹³C]Glucose. ^a

	Genbibliotheken							
	[¹² C]Glucose				[¹³ C]Glucose			
	t ₀		t ₅₁		t ₀		t ₅₁	
	L	H	L	H	L	H	L	H
Anzahl sequenzierter Inserts	96	109	103	99	111	105	104	94
Anteil chimärischer Sequenzen (%)	32	26	27	27	24	25	25	16
Anzahl eliminiertes chimärischer Sequenzen	15	16	12	11	15	11	16	5
Anzahl <i>E. coli</i> BL21-Sequenzen	0	4	0	1	0	8	0	0
Anzahl verwertbarer Sequenzen	81	89	91	87	96	86	88	89
Coverage (%) ^b	79	78	98	94	71	74	92	100

^a t₀, Inkubationsbeginn; t₅₁, 51 h Inkubationszeit, L, ‚leichte‘ Fraktionen („light“) (Fraktionen 8 und 9; Abbildung 34); H, ‚schwere‘ Fraktionen („heavy“) (Fraktionen 3 und 4; Abbildung 34).

^b Die Coverage wurde auf Familien-Ebene berechnet. Eine Familien-entsprechende OTU besteht aus 16S rRNA cDNA Sequenzen mit einer DNA-Ähnlichkeit von ≥ 87,5 % (Yarza *et al.*, 2008).

Der Anteil an chimärischen Sequenzen pro Genbibliothek variierte zwischen 16 % und 32 %. Über die Hälfte aller chimärischen Sequenzen (59 %) konnten korrigiert und für weitere Analysen verwendet werden. 13 Sequenzen wurden mit einer Nukleotidsequenz-ähnlichkeit von 100 % dem *E. coli*-Stamm BL21 (Zugangsnummer CP001509) zugeordnet. Diese Sequenzen stammen höchstwahrscheinlich aus den RT-PCR-Chemikalien (3.2.9.2.2) und wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. Insgesamt waren 707 Sequenzen für anschließende Analysen verwertbar. Die Genbibliotheken bestanden aus 81 - 97 Sequenzen. Die Coverage auf Familien-Ebene lag für Sequenzen aus t₀-Genbibliotheken zwischen 71 % und 79 % und für Sequenzen aus t₅₁-Genbibliotheken zwischen 92 % und 100 %. Für die zusammengefassten t₀-Sequenzen wurde eine Coverage von 93 % erreicht, während für die zusammengefassten t₅₁-Sequenzen eine Coverage von 97 % ermittelt wurde. Die Berechnung der Sequenzähnlichkeit innerhalb einer Genbibliothek

war aufgrund der variierenden Sequenzlängen (ca. 460 - 880 bp) und unterschiedlich großer Überlappungsbereiche nicht möglich.

3.2.9.4 Rarefaction-Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen

Die Anzahl der erwarteten Familien-entsprechenden OTUs wurde für jede Genbibliothek als Funktion der analysierten 16S rRNA cDNA Sequenzen in Form einer Rarefaction-Kurve dargestellt (Abbildung 37). Der abflachende Verlauf aller Rarefaction-Kurven zeigt, dass die Anzahl der analysierten Sequenzen ausreichend war und der Großteil der Diversität für ‚schwere‘ und ‚leichte‘ Fraktionen der [¹²C]- und [¹³C]-Inkubationen sowie für beide Probenahmezeitpunkte (t_0 und t_{51}) auf Familien-Ebene gut erfasst wurde. Die in den Genbibliotheken detektierten Diversitäten waren vor Inkubationsbeginn sehr ähnlich. Nach der Inkubation war die Diversität in der ‚schweren‘ Fraktion der [¹³C]-Inkubation am niedrigsten. Der Vergleich der zusammengefassten t_0 - mit den zusammengefassten t_{51} -Sequenzen zeigt, dass die detektierte Diversität zu Inkubationsbeginn signifikant höher war als nach 51-stündiger Inkubation. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den berechneten Coverages und weisen auf eine Anreicherung einzelner Familien während der Inkubation hin.

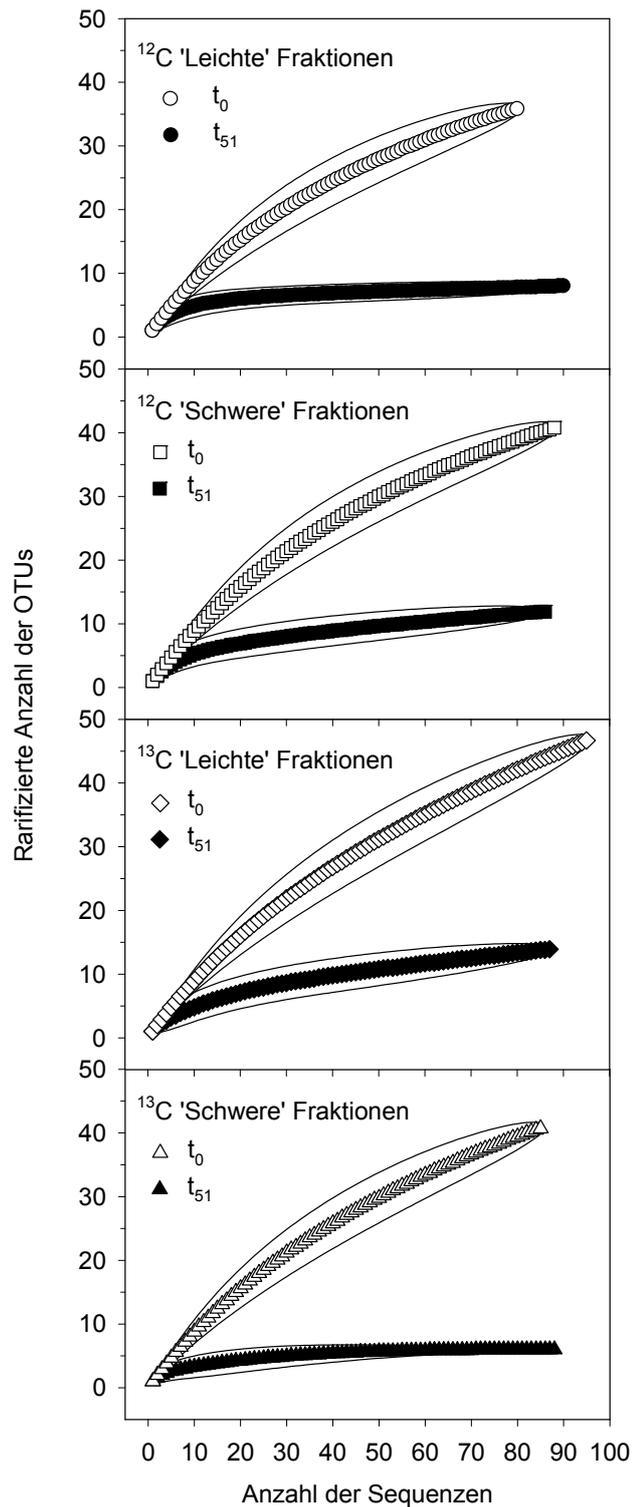


Abbildung 37. Rarefaction-Analyse der 16S rRNA cDNA Sequenzen (700 - 880 bp) aus Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [^{12}C]- bzw. [^{13}C]Glucose auf Familien-Ebene. Die Linien beschreiben die 95 % Konfidenzintervalle. Eine Familien-entsprechende OTU besteht aus 16S rRNA cDNA Sequenzen mit einer DNA-Ähnlichkeit von $\geq 87,5\%$ (Yarza *et al.*, 2008). ^{12}C , Inkubation mit [^{12}C]Glucose; ^{13}C , Inkubation mit [^{13}C]Glucose; t_0 , Inkubationsbeginn; t_{51} , 51 h Inkubationszeit. ‚Leichte‘ Fraktionen, Fraktionen 8 und 9 (Abbildung 34); ‚schwere‘ Fraktionen, Fraktionen 3 und 4 (Abbildung 34).

3.2.9.5 Phylogenetische Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen

3.2.9.5.1 Identifikation von metabolisch aktiven Bacteria

Die in dieser Arbeit analysierten 707 16S rRNA cDNA Sequenzen sind Teilsequenzen (ca. 880 bp) des vollständigen 16S rRNA Gens (ca. 1.500 bp) und wurden den Phyla *Proteobacteria* (34,5 %), *Firmicutes* (32,4 %), *Actinobacteria* (20,9 %), *Planctomycetes* (4,0 %), *Bacteroidetes* (3,5 %), *Acidobacteria* (1,6 %), *Verrucomicrobia* (1,0 %), *Chloroflexi* (0,3 %), *Gemmatimonadetes* (0,3 %), *Nitrospirae* (0,3 %), *Tenericutes* (0,1 %) und *Cyanobacteria* (0,1 %) zugeordnet bzw. wurden als unklassifizierte *Bacteria* (0,8 %) bezeichnet (Tabelle 24). Zu Inkubationsbeginn wurden in Mittel- und Enddarminhalt 79 metabolisch aktive Familien detektiert, wovon 17 eine 16S rRNA Genähnlichkeit von < 87,5 % zu kultivierten Spezies aufwiesen und daher als neue Familien-ähnliche Gruppen definiert wurden (Tabelle 24; Yarza *et al.*, 2008). Etwa ein Drittel dieser 79 Familien gehörte dem Phylum der *Actinobacteria* an. Nach 51-stündiger Inkubation des Darminhalts unter anoxischen Bedingungen wurden lediglich 20 aktive Familien inklusive zwei neuer Familien-ähnlicher Gruppen detektiert. Vor der Inkubation waren *Planctomycetaceae* (7,4 %), *Nocardioideaceae* (6,8 %), *Flavobacteriaceae* (5,7 %) und *Microbacteriaceae* (5,4 %) abundante Familien, nach der Inkubation dominierten *Clostridiaceae* (28,2 %), „*Peptostreptococcaceae*“ (22,3 %), *Enterobacteriaceae* (22,3 %) und *Aeromonadaceae* (12,1 %).

Tabelle 24. Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* vor (0 h) und nach (51 h) einer anoxischen Inkubation mit [¹²C]- bzw. [¹³C]Glucose. ^a

Phylogenetische Zuordnung (Relative Abundanz eines Phylums [%])		Relative Abundanz von Sequenzen (%)							
		[¹² C]Glucose				[¹³ C]Glucose			
		t ₀		t ₅₁		t ₀		t ₅₁	
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	L	H	L	H	L	H	L	H
<i>Acidobacteria</i> (1,6)	<i>Acidobacteriales</i> ,								
	<i>Acidobacteriaceae</i>	3,7	1,1	-	-	6,3	1,2	-	-
<i>Actinobacteria</i> (20,9)	Neue Familie 4 ^b	-	-	-	-	1,0	1,2	-	-
	Neue Familie 6 ^b	4,9	1,1	-	1,1	2,1	1,2	-	-
	Neue Familie 7 ^b	-	-	-	-	1,0	-	-	-
	Neue Familie 8 ^b	-	-	-	-	-	2,3	-	-
	Neue Familie 17 ^b	1,2	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Acidimicrobiales</i> ,								
	<i>Acidimicrobiaceae</i>	1,2	-	-	-	-	2,3	-	-
	<i>Iamiaceae</i>	-	-	-	-	2,1	1,2	-	-
	<i>Actinomycetales</i> ,								

Phylogenetische Zuordnung (Relative Abundanz eines Phylums [%])		Relative Abundanz von Sequenzen (%)							
		¹² C]Glucose				¹³ C]Glucose			
		t ₀		t ₅₁		t ₀		t ₅₁	
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	L	H	L	H	L	H	L	H
	Neue Familie 5 ^b	-	-	-	-	-	1,2	-	-
	<i>Actinosynnemataceae</i>	-	1,1	-	-	-	-	-	-
	<i>Beutenbergiaceae</i>	-	-	-	-	1,0	-	-	-
	<i>Cellulomonadaceae</i>	1,2	1,1	-	-	1,0	-	-	-
	<i>Cryptosporangiaceae</i>	-	1,1	-	-	1,0	-	1,1	-
	<i>Frankiaceae</i>	-	2,2	-	-	-	1,2	-	-
	<i>Intrasporangiaceae</i>	-	2,2	-	-	1,0	-	-	-
	<i>Microbacteriaceae</i>	2,5	9,0	-	-	5,2	4,7	-	-
	<i>Micrococcaceae</i>	1,2	1,1	-	-	-	-	-	-
	<i>Micromonosporaceae</i>	-	2,2	-	-	-	2,3	1,1	-
	<i>Mycobacteriaceae</i>	-	3,4	-	-	-	2,3	-	-
	<i>Nakamurellaceae</i>	-	2,2	-	-	2,1	4,7	-	-
	<i>Nocardiaceae</i>	1,2	2,2	-	1,1	-	1,2	1,1	-
	<i>Nocardioideaceae</i>	6,2	4,5	-	-	8,3	8,1	-	-
	<i>Propionibacteriaceae</i>	-	-	-	-	2,1	1,2	1,1	-
	<i>Pseudonocardiaceae</i>	2,5	4,5	-	-	-	4,7	-	-
	<i>Sporichthyaceae</i>	2,5	3,4	-	-	1,0	-	-	-
	<i>Streptomycetaceae</i>	1,2	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rubrobacterales,</i>								
	Neue Familie 1 ^b	2,5	5,6	-	-	1,0	2,3	-	-
	<i>Rubrobacteraceae</i>	2,5	3,4	-	-	3,1	2,3	-	-
	<i>Solirubrobacterales,</i>								
	<i>Patulibacteraceae</i>	-	-	-	1,1	-	1,2	-	-
<i>Bacteroidetes</i> (3,5)	<i>Flavobacteriales,</i>								
	<i>Flavobacteriaceae</i>	11,1	2,2	-	-	5,2	4,7	-	-
	<i>Sphingobacteriales,</i>								
	<i>Chitinophagaceae</i>	-	-	-	-	-	1,2	-	-
	<i>Flexibacteraceae</i>	-	-	-	-	2,1	1,2	-	-
	Neue Familie 16 ^b	-	-	-	-	1,0	-	-	-
<i>Chloroflexi</i> (0,3)	Neue Familie 14 ^b	-	1,1	-	-	-	1,2	-	-
<i>Cyanobacteria</i> (0,1)	Family I	-	-	-	-	-	1,2	-	-
<i>Firmicutes</i> (32,4)	<i>Bacillales,</i>								
	<i>Bacillaceae</i>	1,2	1,1	6,6	5,7	1,0	-	5,7	3,4
	Incertae Sedis XII	-	1,1	-	-	1,0	-	-	-
	" <i>Paenibacillaceae</i> "	-	-	6,6	4,6	2,1	-	5,7	-
	<i>Clostridiales,</i>								
	<i>Clostridiaceae</i>	1,2	1,1	27,5	25,3	-	-	9,1	50,6
	" <i>Lachnospiraceae</i> "	-	-	1,1	2,3	-	-	-	2,2
	" <i>Peptostreptococcaceae</i> "	-	-	16,5	17,2	1,0	-	51,1	4,5

Phylogenetische Zuordnung (Relative Abundanz eines Phylums [%])		Relative Abundanz von Sequenzen (%)							
		¹² C]Glucose				¹³ C]Glucose			
		t ₀		t ₅₁		t ₀		t ₅₁	
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	L	H	L	H	L	H	L	H
	<i>Sinobacteraceae</i>	-	-	-	-	2,1	-	-	-
	<i>Xanthomonadaceae</i>	1,2	-	-	-	1,0	-	-	-
<i>Deltaproteobacteria</i>	Neue Familie 9 ^b	3,7	1,1	-	1,1	-	1,2	-	-
	Neue Familie 10 ^b	-	1,1	-	-	-	-	-	-
	Unklassifizierte Gruppe 1 ^c	6,2	1,1	-	-	2,1	3,5	-	-
	<i>Myxococcales</i> ,								
	<i>Cystobacteraceae</i>	-	1,1	1,1	-	1,0	-	-	-
	<i>Polyangiaceae</i>	6,2	-	-	-	5,2	1,2	-	-
	Neue Familie 2 ^b	-	-	-	-	1,0	2,3	-	-
	Neue Familie 3 ^b	2,5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tenericutes</i> (0,1)	Unklassifizierte Gruppe 2 ^d	-	-	-	-	-	1,2	-	-
<i>Verrucomicrobia</i> (1,0)	Unklassifizierte Gruppe 3 ^e	-	2,2	-	-	1,0	1,2	-	-
	<i>Opitutales</i> ,								
	<i>Opitutaceae</i>	1,2	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Verrucomicrobiales</i> ,								
	Neue Familie 11 ^b	-	-	-	-	-	1,2	-	-
	Subdivision 3	-	-	-	-	1,0	-	-	-
WS3 (0,1)	Incertae sedis	-	-	-	-	1,0	-	-	-
Unklassifizierte <i>Bacteria</i> (0,8)	Neue Familie 12 ^b	-	1,1	-	-	1,0	-	-	-
	Neue Familie 13 ^b	2,5	-	-	-	1,0	1,2	-	-

^a Die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit dem Online-Tool RDP Classifier (Wang *et al.*, 2007) und BLASTn (Zhang *et al.*, 2000). Die Sequenzanzahl pro Klonbibliothek betrug 81 - 96 (Tabelle 23). Namen in Anführungszeichen sind laut „List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature“ (Euzéby, 2010) nicht valide. t₀, Inkubationsbeginn; t₅₁, 51 h Inkubationszeit, L, ‚leichte‘ Fraktionen („light“) (Fraktionen 8 und 9; Abbildung 34); H, ‚schwere‘ Fraktionen („heavy“) (Fraktionen 3 und 4 ; Abbildung 34). ¹³C-markierte Familien sind grau hinterlegt.

^b Neue Familien-entsprechende Gruppe basierend auf einer 16S rRNA Genähnlichkeit von < 87,5 % (Yarza *et al.*, 2008).

^c Nächst verwandte Spezies: Candidatus „*Entotheonella palauensis*“ (AF130847; 86,2 - 90,9 % 16S rRNA Genähnlichkeit).

^d Nächst verwandte Spezies: Candidatus „*Lumbricincola* sp. Lr-C2“ (FM165584; 90,2 % 16S rRNA Genähnlichkeit).

^e Nächst verwandte Spezies: Candidatus „*Xiphinematobacter rivesi*“ (AF217461; 89,5 - 90,3 % 16S rRNA Genähnlichkeit).

3.2.9.5.2 Identifikation von aktiven Glucose-verwertenden Bacteria

Die 16S rRNA Gensequenzen aus den ‚schweren‘ Fraktionen der [¹³C]-Inkubation wurden den Familien *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, „*Lachnospiraceae*“ und „*Peptostreptococcaceae*“ innerhalb des Phylums *Firmicutes* sowie den Familien *Aeromonadaceae* und *Enterobacteriaceae* innerhalb des Subphylums *Gammaproteobacteria* zugeordnet (Tabelle 24). Die relative Abundanz von *Clostridiaceae*- und *Enterobacteriaceae*-Sequenzen war in den ‚schweren‘ Fraktionen der [¹³C]-Inkubation wesentlich höher als in den ‚schweren‘ Fraktionen der [¹²C]-Inkubation und in den ‚leichten‘ Fraktionen der [¹³C]-Inkubation. Zudem wurden nach der Inkubation mehr *Clostridiaceae*- und *Enterobacteriaceae*-Sequenzen detektiert als zu Inkubationsbeginn. Damit sind alle Kriterien für ein „Labeling“ erfüllt und Organismen der Familien *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* eindeutig als aktive Glucose-Verwerter identifiziert.

Zur Klassifizierung der ¹³C-markierten Sequenzen auf Spezies-Ebene wurden alle Verdauungstraktsequenzen des Phylums *Firmicutes* und des Subphylums *Gammaproteobacteria* zur Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen herangezogen (Abbildung 38). Sequenzen, die zuvor zu einer phylogenetischen Familie zusammengefasst wurden, bildeten auch im Stammbaum ein Cluster. Die mit BLAST ermittelten Ergebnisse für die nächstverwandten Sequenzen stimmten sehr gut mit der Baumtopologie überein. Generell waren Verdauungstraktsequenzen innerhalb der *Firmicutes* und *Gammaproteobacteria* phylogenetisch sehr nahe stehend zu unkultivierten Bakterien aus unterschiedlichen Böden, Wasser, Verdauungstrakten und Fäkalien. ¹³C-markierte Sequenzen der *Clostridiaceae* waren eng zu Sequenzen von *Clostridium beijerinckii*, „*Clostridium chromoreductans*“ und *Clostridium puniceum* verwandt (Abbildung 38A). Nächstverwandt zu ¹³C-markierten *Enterobacteriaceae*-Sequenzen waren Sequenzen von *Buttiauxella* spp., *Kluyvera cryocrescens*, *Pantoea agglomerans*, *Raoultella* spp. und *Serratia fonticola* (Abbildung 38B).

Abbildung 38. Phylogenetische Stammbäume repräsentativer 16S rRNA Gensequenzen (700 - 880 bp) für *Firmicutes* (A) und *Gammaproteobacteria* (B). Die Berechnung erfolgte mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus auf Nukleinsäureebene nach dem „p-Distance“-Modell. An den Verzweigungen sind die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) > 50 % angezeigt. Verzweigungsstellen mit Knotenpunkten sind mit dem „Maximum Likelihood“-Algorithmus AxML reproduzierbar. Die Gensequenz von *Methanosarcina barkeri* (AF028692) wurde als Referenzsequenz („Outgroup“) verwendet. Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett gedruckt. Namen in Anführungszeichen sind laut „List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature“ (Euzéby, 2010) nicht valide. Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken („Accession Numbers“) sind in Klammern angegeben. Die 16S rRNA Gensequenzen wurden aus cDNA gewonnen. ¹³C-markierte Taxa sind mit einem Stern gekennzeichnet. t0, Inkubationsbeginn; t51, 51 h Inkubationszeit; L, ‘leichte’ Fraktionen („light“); H, ‘schwere’ Fraktionen („heavy“).

Abbildung 38A. Die Familie *Veillonellaceae* wurde im Baum nicht dargestellt, weil die betreffende *Veillonellaceae*-verwandte Sequenz (t51_12H90) kürzer als 700 bp war und daher von der Baumberechnung ausgeschlossen wurde. Für die Berechnung des „Neighbor-Joining“-Baums wurden 651 Positionen berücksichtigt (Position 104 - 815 des 16S rRNA Gens von *E. coli*, 50 % Mindestähnlichkeit). Der Balken stellt einen Sequenzunterschied von 1 % dar.

Abbildung 38B. Die ¹³C-markierte Sequenz t51_13H112 (nächst verwandte Spezies *Serratia fonticola*, AY236502, 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) wurde von der Berechnung ausgeschlossen, weil sie kürzer als 700 bp war. Für die Berechnung des „Neighbor-Joining“-Baums wurden 698 Positionen berücksichtigt (Position 101 - 816 des 16S rRNA Gens von *E. coli*, 50 % Mindestähnlichkeit). Der Balken stellt einen Sequenzunterschied von 5 % dar.

4 DISKUSSION

4.1 Denitrifikanten-abhängige Emission von N₂O und/oder N₂ als universelles Merkmal von Regenwürmern

Europäische Regenwürmer der Familie *Lumbricidae* emittieren N₂O und N₂ (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2006b). Entsprechend ihrer Lebens- und Ernährungsweise können Regenwürmer in drei verschiedene ökologische Gruppen eingeteilt werden (1.1.3; Bouché, 1977) und die Emission von N₂O wurde bisher bei europäischen Regenwürmern aller ökologischen Gruppen beobachtet (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2006b). Diese Literaturdaten unterstützen die Annahme, dass die Fähigkeit der N₂O-Emission unabhängig von der ökologischen Gruppe verbreitet ist. Es ist allerdings nicht bekannt, ob diese Eigenschaft auch unabhängig von der taxonomischen Einordnung und geografischen Verbreitung der Würmer auftritt. In Palmerston North, Neuseeland, wurden daher vier Regenwurmartenspezies aus zwei phylogenetischen Familien (*Lumbricidae* und *Megascolecidae*) auf die Fähigkeit zur N₂O-Emission hin untersucht.

Zunächst lässt die generelle Stimulation der *in vivo*-Emission und der N₂O-Bildung von Verdauungstrakten durch Nitrat, Nitrit und Acetylen (Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14) darauf schließen, dass die Emission und Bildung von N₂O hauptsächlich auf aktive Denitrifikation zurückzuführen ist. Alle untersuchten Individuen der eingeführten Arten *Lumbricus rubellus* und *Aporrectodea rosea* und nur ein Individuum der eingeführten Art *Octolasion cyaneum* emittierten unter *in situ*-Bedingungen N₂O (Tabelle 15). Überraschenderweise emittierte kein Individuum der einheimischen Art *Octochaetus multiporus* unter *in situ*-Bedingungen N₂O (Tabelle 15). Die vergleichende Analyse einheimischer und eingeführter Regenwürmer Neuseelands zeigt, dass die Fähigkeit zur N₂O-Emission auch bei Würmern der südlichen Hemisphäre auftritt, widerlegt jedoch gleichzeitig die Hypothese, dass die Emission von N₂O ein universelles Merkmal von Regenwürmern ist (Hypothese 1; 1.4).

O. multiporus emittierte nur nach Stimulation mit Nitrat, Nitrit und Acetylen N₂O und selbst dann lagen die emittierten Mengen an N₂O weit unter den Werten der eingeführten Würmer (Abbildung 12 und Abbildung 13). Das N₂O-Emissionspotential des einheimischen Wurms war demzufolge deutlich schwächer ausgeprägt als das der eingeführten Würmer. Diese unterschiedlichen N₂O-Emissionspotentiale könnten im Zusammenhang mit den unterschiedlichen *in situ*-Bedingungen in den Verdauungstrakten der Regenwürmer stehen. Im Vergleich zu den eingeführten Regenwurmartenspezies war *O. multiporus* wesentlich länger (bis zu 30 cm), schwerer (ca. 10 x höheres Frischgewicht) und dicker (ca. 10 x größerer Wurmdurchmesser). Die dementsprechend längere Darmpassagezeit von *O. multiporus*

sollte daher den Ablauf der kompletten Denitrifikation (d. h. die Reduktion von Nitrat oder Nitrit zu N_2) begünstigen (Drake und Horn, 2007). *In situ*-Konzentrationen von N_2O sind im Zentrum des anoxischen Verdauungstrakts am höchsten und lassen darauf schließen, dass die N_2O -Bildung dort stattfindet (Abbildung 20; Horn *et al.*, 2003b). Der große Durchmesser des Verdauungstrakts von *O. multiporus* könnte daher bewirken, dass N_2O weiter zu N_2 reduziert wird, bevor es die Verdauungstraktwand passiert. Im Gegensatz zu *L. rubellus* war bei *O. multiporus* die N_2O -Emission in Anwesenheit des N_2O -Reduktase-Inhibitors Acetylen deutlich erhöht (Abbildung 13). Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass N_2 (und nicht N_2O) das dominante Endprodukt der Denitrifikation im Verdauungstrakt von *O. multiporus* ist.

Der Waldboden, aus welchem *O. multiporus* stammte, enthielt deutlich mehr Nitrat als der Wiesenboden, in welchem *L. rubellus* gefunden wurde (Tabelle 2). Folglich könnten im Waldboden Nitrat-reduzierende Prozesse aktiv gewesen sein, wodurch der Ablauf der kompletten Denitrifikation im Verdauungstrakt von *O. multiporus* begünstigt worden sein könnte. Weiterhin zeigen zahlreiche Studien zur Denitrifikationsaktivität in Böden eine negative Korrelation zwischen Boden-pH-Wert und dem Verhältnis von gebildetem N_2O zu N_2 (Simek und Cooper, 2002; Cuhel *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010), höchstwahrscheinlich weil saure Bedingungen die Aktivität der N_2O -Reduktase hemmen (Weier und Gilliam, 1986; Kesik *et al.*, 2006; Zumft und Körner, 2007). Der nahezu neutrale pH-Wert im Waldboden könnte daher bewirken, dass mit dem Boden aufgenommene Denitrifikanten im Verdauungstrakt von *O. multiporus* vorwiegend N_2 bilden.

Die unterschiedlichen N_2O -Emissionspotentiale von einheimischen und eingeführten Regenwürmern könnten auch durch das Vorkommen von funktionell unterschiedlichen Mikrobiota im Verdauungstrakt bedingt sein. Möglicherweise überwiegen im Verdauungstrakt von *O. multiporus* dissimilatorische Nitratreduzierer, die Nitrat und Nitrit zu Ammonium reduzieren (1.3.2.2; Tiedje, 1988). Dissimilatorische Nitratreduzierer können den Großteil aller aus Regenwurmdarminhalt isolierten Nitratreduzierer bilden (Ihssen *et al.*, 2003; Drake und Horn, 2007). Die Literaturdaten von Studien an europäischen Regenwürmern sprechen jedoch dafür, dass vorwiegend Denitrifikanten und nicht dissimilatorische Nitratreduzierer für die Bildung von N_2O im Verdauungstrakt verantwortlich sind (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2003b; Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2006a). Diese Annahme ist konsistent mit der erhöhten N_2O -Emission durch *O. multiporus* in Gegenwart von Acetylen (Abbildung 13) und den nahezu identischen N_2O -Bildungskapazitäten von Verdauungstrakten aus *O. multiporus* und *L. rubellus* in Anwesenheit von Nitrit und Acetylen (Abbildung 14), die auf eine aktive Denitrifikantenpopulation und eine für die Reduktion von Nitrit erforderliche Elektronenquelle im Verdauungstrakt von *O. multiporus* hindeuten.

Eine hohe Variabilität in Bezug auf die N_2O -Emission wurde bereits bei europäischen Regenwürmern festgestellt (Karsten und Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*,

2006b). Etwa 5 % aller getesteten Individuen emittierten unmittelbar nach der Entnahme aus frischem Boden kein N₂O (unpublizierte Daten). Auch käuflich erworbene Individuen der Art *L. terrestris* emittierten anfangs kein N₂O, sondern erst nach einer 2,5-tägigen Haltung in Gartenboden (Matthies *et al.*, 1999). Welche der genannten Faktoren tatsächlich auf das N₂O-Emissionspotential von Regenwürmern Einfluss nehmen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden.

Die kultivierungsunabhängige Analyse der N₂O-Reduktasegene (*nosZ*) wurde angewendet, um die Denitrifikanten-Diversitäten im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* und *O. multiporus* sowie in den umgebenden Böden zu charakterisieren und zu vergleichen. Die *nosZ* Gendiversität in den Genbibliotheken wurde mit 97 - 99 % fast vollständig erfasst, was die Aussagekraft der kultivierungsunabhängigen Diversitätsbestimmung unterstreicht. Die detektierte *nosZ* Diversität im Verdauungstraktinhalt von *O. multiporus* war signifikant höher als im Verdauungstraktinhalt von *L. rubellus* (Abbildung 16). Ebenso wurde im Waldboden, dem Habitat von *O. multiporus*, eine höhere Denitrifikanten-Diversität als im Wiesenboden, dem Habitat von *L. rubellus*, detektiert. Im Verdauungstrakt wie auch im Boden wurden *nosZ* Gene gefunden, die mit *nosZ* Genen von *Azospirillum lipoferum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris* und *Rhodospirillum centenum* verwandt sind (Abbildung 17). N₂O-Reduktasegene dieser Organismen wurden häufig in Böden nachgewiesen (Rösch *et al.*, 2002; Rich *et al.*, 2003; Stres *et al.*, 2004; Throbäck *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2010). Der Großteil der detektierten *nosZ* Sequenzen (89 %) war eng mit *nosZ* Genen von *B. japonicum* verwandt. *B. japonicum* ist ein denitrifizierendes Alphaproteobakterium, das freilebend im Boden vorkommt oder als Symbiont in den Wurzeln der Sojabohne lebt und dort N₂ fixiert (Bedmar *et al.*, 2005). N₂-fixierende Bakterien werden häufig im Verdauungstrakt von Bodentieren gefunden, die sich von abgestorbener pflanzlicher Biomasse ernähren (Citernes *et al.*, 1977). *B. japonicum* ist zudem fähig, atmosphärische N₂O-Konzentrationen (d. h. 0,34 ppm N₂O) zu nutzen (Sameshima-Saito *et al.*, 2006), was auf einen effizienten N₂O-Verbrauch von *Bradyrhizobium*-verwandten Arten im Verdauungstrakt des Regenwurms schließen lässt. Der Nachweis von *Bradyrhizobium*-verwandten 16S rRNA Gensequenzen an der Darmwand von endogäischen und anözischen Regenwürmern (Thakuria *et al.*, 2010) und die Detektion von 16S rRNA der *Bradyrhizobiaceae* im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* (Tabelle 24) verstärken die Annahme, dass *Bradyrhizobium*-verwandte Arten bedeutende Denitrifikanten des Regenwurmverdauungstrakts sind.

Die Dominanz von *Bradyrhizobium*-verwandten Sequenzen in den Genbibliotheken hängt möglicherweise auch mit der Spezifität des verwendeten Primersystems (*nosZ*-F-1181 und *nosZ*-R-1880 [Rich *et al.*, 2003]) zusammen. Mit anderen Primersystemen (*nosZ*661F/*nosZ*1773R [Scala und Kerkhof, 1999] und PsNosZ175F/PsNosZ1144R [Horn *et*

al., 2006a]) wurde eine alternative *nosZ* Diversität im Verdauungstrakt europäischer Regenwürmer erfasst (Horn *et al.*, 2006a). Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit wurden mit alternativen Primersystemen im Verdauungstrakt des Regenwurms *nosZ* Gene detektiert, die den Gattungen *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas* und *Sinorhizobium* zugeordnet werden konnten; zusätzlich wurden mit alternativen Primersystemen *nosZ* Gene der Gattungen *Dechloromonas*, *Flavobacterium*, *Brucella* und *Ralstonia* nachgewiesen (Horn *et al.*, 2006a). Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten stützen die Hypothese, dass die Denitrifikanten im Verdauungstrakt neuseeländischer Regenwürmer aus dem aufgenommenen Boden stammen und für die Emission von stickstoffhaltigen Gasen durch Regenwürmer verantwortlich sind.

4.2 Simultane Aktivierung von Denitrifikanten und Gärern im Verdauungstrakt des Regenwurms

Vorangegangene Studien liefern eindeutige Hinweise, dass mit der Nahrung aufgenommene Bodenbakterien durch die *in situ*-Bedingungen des Regenwurmverdauungstrakts aktiviert werden (Lavelle *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 2003b; Drake und Horn, 2006, 2007). Beispielsweise liegen die Keimzahlen von anaeroben Mikroorganismen im Verdauungstrakt des Regenwurms deutlich über denen des umgebenden Bodens (Karsten und Drake, 1995, 1997; Ihssen *et al.*, 2003).

Der pH-Wert ist im Regenwurmverdauungstrakt nahezu neutral und schwankt kaum entlang des Verdauungstrakts (Heran, 1956), was auf eine homöostatische Regelung des pH-Werts im Regenwurm hindeutet. Die Konzentrationen des Mucopolysaccharid-haltigen Verdauungsschleims nehmen entlang des Verdauungstrakts ab (Trigo *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000), wodurch sich auch die *in situ*-Bedingungen entlang des Verdauungstrakts ändern dürften. Im Einklang mit dieser Annahme stehen die Werte für Wasser-, Gesamtstickstoff- und Gesamtkohlenstoffgehalte, welche im Verdauungstrakt von *L. terrestris* deutlich höher waren als im umgebenden Boden und vom Vorder- zum Enddarm hin abnahmen (Tabelle 18 und Abbildung 23; Brown *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2003b). Die Konzentrationen von Eisen(II), Ammonium und Nitrit nahmen entlang des Verdauungstrakts ab (Abbildung 24). Im Kropf/Magen und im anschließenden Darmkanal wurde kein freier O₂ detektiert (Abbildung 20; Horn *et al.*, 2003b). Daher ist anzunehmen, dass anaerobe mikrobielle Prozesse unmittelbar nach Aufnahme des Bodens in den Verdauungstrakt aktiv sind. Die Abwesenheit von freiem O₂ im Verdauungstrakt und im Wurmgewebe (Abbildung 20) lässt zudem darauf schließen, dass freier O₂ direkt an Hämoglobin gebunden (Edwards und Bohlen, 1996) und für die Atmung genutzt wird. Das Redoxpotential war an der Wurmoberfläche stets höher als im Verdauungstrakt, wo es zwischen -203 und +388 mV betrug (Abbildung 20 und Abbildung 21). Niedrigste Redoxpotentiale wurden im Vorder- und Mitteldarm detektiert. In

vorangegangenen Studien wurden mit einer gewöhnlichen Redoxelektrode im Verdauungstrakt von Regenwürmern Redoxpotentiale zwischen +210 und +290 mV ermittelt (Karsten, 1997). Da der Durchmesser dieser Elektrode jedoch nur unwesentlich kleiner war als der des Regenwurms, konnte das Eindringen von Luft-O₂ in den Verdauungstrakt nicht vermieden werden, weshalb das gemessene Redoxpotential sehr wahrscheinlich über dem tatsächlichen *in situ*-Redoxpotential lag (Karsten, 1997). Auch im Verdauungstrakt von Insekten kann das Redoxpotential stark variieren (Kane, 1997). Beispielsweise liegen die Redoxpotentiale im Verdauungssystem von Termiten zwischen -200 und +400 mV, wobei der Enddarm das niedrigste Redoxpotential aufweist (Ebert und Brune, 1997; Kappler und Brune, 2002). Im Verdauungstrakt von Wiederkäuern kann das Redoxpotential zwischen -350 und +186 mV betragen (Marounek *et al.*, 1987; Schlegel und Jannasch, 2006) und für anoxische Böden werden Werte zwischen -400 und +200 mV angegeben (Rowell, 1981). Auch im Regenwurmverdauungstrakt erlauben die vorherrschenden Redoxpotentiale das Auftreten von anaeroben Prozessen.

Der Gehalt an gesamtem organischen Kohlenstoff war im Verdauungstrakt höher als im umgebenden Boden (Abbildung 23; Brown *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2003b). Hydrolysierte Extrakte des Verdauungstraktinhalts enthielten die Monosaccharide Mannose, Glucose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Fucose (Abbildung 25). Bei der Hydrolyse von Hemicellulose, einem pflanzlichen Heteropolymer, werden die Pentosen Xylose und Arabinose, die Hexosen Glucose, Mannose und Galaktose sowie das Disaccharid Cellobiose frei (Saddler *et al.*, 1983). Fucose kommt in bakteriellen extrazellulären Polysacchariden, pflanzlichen Zellwänden und tierischen Glycoproteinen vor (Vanhooren und Vandamme, 1999). Die Saccharide im Verdauungstrakt des Regenwurms könnten demzufolge aus aufgenommener und teilweise verdauter Biomasse stammen (Judas, 1992; Schönholzer *et al.*, 1999; Schönholzer *et al.*, 2002; Curry und Schmidt, 2007). Da der Verdauungstraktinhalt jedoch bis zu 80 % aus intestinalem Mucus bestehen kann (Rahemtulla und Lovtrup, 1975; Martin *et al.*, 1987; Trigo *et al.*, 1999), ist es wahrscheinlicher, dass der Großteil der Monosaccharidäquivalente vom Mucus stammt (Scheu, 1991; Trigo *et al.*, 1999; Whalen und Janzen, 2002). Tatsächlich sind Glucosamine, Galactosamine, Glucose, Galaktose, Mannose und Fucose wichtige Bestandteile der Mucopolysaccharide in *Lumbricus* spp. (Rahemtulla und Lovtrup, 1975). Polysaccharid-abbauende Enzyme (z. B. Amylase, Cellulase, Xylanase und Chitinase) kommen ebenfalls im Verdauungstrakt des Regenwurms vor (1.1.4; Tracey, 1951; Mishra und Dash, 1980; Urbášek, 1990; Urbášek und Pižl, 1991; Tillinghast *et al.*, 2001). Im vorderen Bereich des Verdauungstrakts treffen höchste Kohlenstoffgehalte und Saccharidkonzentrationen (Abbildung 23 und Abbildung 25) auf maximale Amylase- und Cellulase-Aktivitäten (Tracey, 1951; Tillinghast *et al.*, 2001). Monosaccharid-freisetzende Enzyme (z. B. Mannosidase, Galactosidase und Glucosidase)

sind ebenfalls im Verdauungstrakt des Regenwurms aktiv (Li und Shetlar, 1965) und könnten für die hohen Monosaccharidkonzentrationen im Verdauungstrakt verantwortlich sein. Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten stützen daher die Annahme, dass mit der Nahrung aufgenommene Mikroorganismen während der Passage durch den Verdauungstrakt sich ändernden *in situ*-Bedingungen ausgesetzt sind und dass die *in situ*-Bedingungen im Verdauungstrakt des Regenwurms stimulierend auf heterotrophe Anaerobier wirken.

In vorangegangenen Studien zu Regenwürmern wird die Hypothese aufgestellt, dass Denitrifikation und dissimilatorische Nitratreduktion im Verdauungstrakt des Regenwurms aktiv und für die Emission von N_2O durch den Wurm verantwortlich sind (Horn *et al.*, 2003b; Ihssen *et al.*, 2003). Diese Hypothese ist konsistent mit (a) sehr niedrigen Nitratkonzentrationen im Verdauungstrakt (Abbildung 24A), (b) erhöhten Nitritkonzentrationen im Kropf/Magen und Vorderdarm im Vergleich zum Boden (Abbildung 24A), (c) der Anwesenheit von N_2O im Verdauungstrakt lebender Würmer (Abbildung 22A), (d) der Stimulation der N_2O -Emission von Würmern und der N_2O -Produktion durch Wurmabschnitte und Verdauungstrakte durch Acetylen, Nitrat oder Nitrit (Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 18) und (e) einer positiven Korrelation zwischen Bodennitratkonzentration und *in situ*-Konzentration von N_2O im Vorderdarm sowie zwischen Bodennitratkonzentration und *in vivo*-Emission von N_2O (Abbildung 27 und Abbildung 28). Höchste *in situ*-Konzentrationen von N_2O wurden im Kropf/Magen und im Enddarm von *L. terrestris* detektiert (Abbildung 22A) und auch die höchsten N_2O -Bildungsraten wurden für Regenwurmabschnitte der Kropf/Magen- und Enddarmregion nachgewiesen (Abbildung 18). Folglich scheint Denitrifikation vorwiegend in Kropf/Magen und Enddarm aktiv zu sein. Die deutlich erhöhte N_2O -Bildung durch Wurmabschnitte der Kropf/Magenregion in Gegenwart von Acetylen spricht dafür, dass die vollständige Denitrifikation bereits im Kropf/Magenbereich stattfindet. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der Detektion von *nosZ* Transkripten im Kropf/Magen von *L. terrestris* und *A. caliginosa* (Depkat-Jakob, 2009) und belegt, dass Boden-Denitrifikanten unmittelbar nach Aufnahme in den Verdauungstrakt aktiviert werden.

H_2 wurde von lebenden Regenwürmern emittiert (3.2.1) und in deren Verdauungstrakt unter *in situ*-Bedingungen gebildet (Abbildung 20 und Abbildung 22B). Bei der Vergärung organischer Substanz wird häufig H_2 freigesetzt (Abbildung 3; Schwartz und Friedrich, 2006). Die Abnahme der Saccharidkonzentrationen (Abbildung 25) und die gleichzeitige Bildung von H_2 und anderen Gärungsprodukten entlang des Verdauungstrakts (Abbildung 22B und Abbildung 26) und in anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt (Abbildung 30, Abbildung 31, Abbildung 32, Tabelle 21 und Tabelle 22) unterstützen die Hypothese, dass Gärungsprozesse im Verdauungstrakt hoch aktiv sind (Hypothese 2; 1.4). Mit dem Boden aufgenommene Pilzhyphen werden entweder im vorderen Bereich des Verdauungstrakts

mechanisch zerkleinert oder während der Darmpassage verdaut (Schönholzer *et al.*, 1999; Schönholzer *et al.*, 2002), weshalb angenommen wird, dass Prokaryoten die dominanten Gärer im Verdauungstrakt sind (Horn *et al.*, 2003b; Ihssen *et al.*, 2003). Höchste *in situ*-Konzentrationen von H₂ wurden im Vorder- und Mitteldarm detektiert (Abbildung 22). Analog dazu wurden eine hohe H₂-Bildung von Wurmabschnitten der Mitteldarmregion (Tabelle 17) und Hydrogenaseaktivitäten im zellfreien Extrakt des Mitteldarminhalts (3.2.4) nachgewiesen. Die höchste Konzentration (insgesamt 32 mmol l [Wassergehalt]⁻¹) und auch die größte Diversität an organischen Säuren wurden im Mitteldarm gefunden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass H₂-freisetzende Gärungen in Vorder- und Mitteldarm dominieren. Literaturdaten und Daten aus dieser Arbeit unterstützen daher die Hypothese, dass die gleichzeitige *in vivo*-Emission von N₂O, N₂ und H₂ durch Regenwürmer auf simultane Denitrifikation und Gärungen in deren Verdauungstrakt zurückzuführen ist (Hypothese 2, 1.4).

4.3 Gärungsdiversität und dominante Glucose-verwertende *Bacteria* im Verdauungstrakt des Regenwurms

Im Verdauungstrakt von Regenwürmern wurden hohe Konzentrationen von leicht verwertbaren organischen Verbindungen wie Zuckern, organischen Säuren und Aminosäuren detektiert (Abbildung 25, Abbildung 26 und Tabelle 16; Horn *et al.*, 2003b; Drake und Horn, 2007). Organische Säuren entstehen häufig bei der Vergärung von organischer Substanz (1.2). Qualität und Quantität der organischen Säuren variierten entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* (Abbildung 26) und lassen vermuten, dass dort diverse Gärungsprozesse in räumlicher (und damit auch in zeitlicher) Abfolge aktiv sind. Der Verbrauch von supplementierter Glucose und die gleichzeitige Bildung von diversen Gärungsprodukten in anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* und in anoxischen Kultivierungsansätzen aus Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* und *A. caliginosa* deuten ebenfalls auf eine hohe Gärungsdiversität im Verdauungstrakt des Regenwurms hin (Tabelle 21, Tabelle 22 und Abbildung 29; Ihssen *et al.*, 2003).

4.3.1 Potentielle Gärungsprozesse entlang des Verdauungstrakts

Die Detektion von höchsten Lactat-Konzentrationen im Kropf/Magen (Abbildung 26) impliziert, dass Lactat im vorderen Abschnitt des Verdauungstrakts gebildet und in den anschließenden Bereichen wieder verbraucht wird. Milchsäurebakterien, eine Gruppe grampositiver, säuretoleranter Bakterien innerhalb des Phylums *Firmicutes*, sind sehr häufig aerotolerant (Condon, 1987; Teuber *et al.*, 1992) und könnten daher direkt nach der Aufnahme in den Verdauungstrakt aktiv werden. Milchsäurebakterien bilden einen

bemerkenswerten Anteil der kultivierbaren Darmbakterien von holz- und bodenfressenden Termiten (Schultz und Breznak, 1978; Tholen *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2000). Obwohl in anoxischen Glucose-Inkubationen von Verdauungstraktinhalt des Regenwurms die meisten Glucose-Elektronen in Lactat wiedergefunden wurden (Abbildung 32B), wurden keine klassischen Lactat-bildenden Gattungen wie *Lactobacillus* (Familie *Lactobacillaceae*), *Lactococcus* oder *Streptococcus* (beide Familie *Streptococcaceae*) detektiert (Tabelle 24 und Abbildung 38A). Die meisten Spezies dieser Gattungen sind nicht in Böden verbreitet (Teuber *et al.*, 1992; Hammes und Hertel, 2009; Whiley und Hardie, 2009), wodurch deren Abwesenheit im Verdauungstrakt zu erklären ist. Lactat wird auch von saccharolytischen Clostridien gebildet und kann unter bestimmten Inkubationsbedingungen sogar das Hauptgärungsprodukt von Clostridien sein (Wiegel *et al.*, 2006). Beispielsweise bildet *Clostridium perfringens* unter kohlenstoffreichen Bedingungen fast ausschließlich Lactat (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Auf die zentrale Bedeutung der Clostridien im Verdauungstrakt des Regenwurms wird in diesem Kapitel an späterer Stelle eingegangen.

Propionat wurde hauptsächlich im Boden sowie im Kropf/Magen und Vorderdarm von *L. terrestris* detektiert (Tabelle 16 und Abbildung 26). Propionat ist das dominante Gärungsprodukt der anaeroben Propionsäurebakterien (Gattung *Propionibacterium*, Familie *Propionibacteriaceae*) innerhalb der grampositiven *Actinobacteria* (Tabelle 1; Stackebrandt *et al.*, 2006; Stackebrandt und Schumann, 2006; Ventura *et al.*, 2007). Substrate der Propionsäurebakterien sind diverse Zucker, Zuckeralkohole, einige Aminosäuren, aber auch organische Säuren wie Lactat und Succinat (Stackebrandt *et al.*, 2006), die im vorderen Bereich des Verdauungstrakts gefunden wurden (Abbildung 26). In den un-supplementierten Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt waren Lactat und Succinat Intermediate, während Propionat als Endprodukt detektiert wurde (Tabelle 22). Folglich könnten Lactat und Succinat von Propionsäurebakterien verbraucht worden sein (Gottschalk, 1986). Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass in den un-supplementierten und Glucose-supplementierten Inkubationen gleiche Mengen an Propionat gebildet wurden und Lactat sowie Succinat in Glucose-supplementierten Inkubationen stabile Endprodukte waren (Tabelle 22). Propionsäuregärer des Regenwurmverdauungstrakts scheinen folglich andere Kohlenstoffquellen als Glucose, Lactat oder Succinat zu bevorzugen. Tatsächlich wurden *Propionibacteriaceae*-verwandte Sequenzen vor und nach der anoxischen Inkubation mit [¹³C]Glucose detektiert, aber nicht markiert (Tabelle 24 und Abbildung 38A), weshalb angenommen wird, dass *Propionibacteriaceae*-verwandte Arten kaum bzw. gar keinen Kohlenstoff der supplementierten Glucose assimilierten. Neben den klassischen Propionsäurebakterien können auch einige Vertreter der Familien *Veillonellaceae*, *Clostridiaceae* und „*Peptostreptococcaceae*“ aus dem Phylum *Firmicutes* Propionsäuregärung betreiben (Tabelle 1; Fuchs, 2007). 16S rRNA cDNA Sequenzen dieser

Familien wurden im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* gefunden (Tabelle 24) und weisen auf die Aktivität dieser Familien im Regenwurmverdauungstrakt hin. Weiterhin kämen auch strikt anaerobe *Propionigenium*-Arten aus der Klasse der *Fusobacteria* für die Vergärung von Succinat zu Propionat in Frage. *Propionigenium*-Arten koppeln die Decarboxylierung von Succinat mit membrangebundenen, energieliefernden Ionenpumpen, da die Reaktion nicht genügend Energie liefert, um die ATP-Synthese direkt mit der Substratkettenphosphorylierung zu verknüpfen (Tabelle 1; Schink und Pfennig, 1982; Janssen und Liesack, 1995). Die Analyse von 16S rRNA cDNA aus Verdauungstraktinhalt lieferte jedoch keine Hinweise auf die Aktivität von *Fusobacteria*-verwandten Arten (Tabelle 24).

Vorder- und Mitteldarm von *L. terrestris* enthielten hohe Konzentrationen an Formiat, Acetat, Succinat und H₂ (Abbildung 22B und Abbildung 26) und in anoxischen Glucose-Inkubationen von Verdauungstraktinhalt wurden Formiat, Acetat, Succinat, Lactat, Ethanol, CO₂ und H₂ gebildet (Tabelle 21, Tabelle 22 und Abbildung 32). Diese Verbindungen sind charakteristische Gärungsprodukte der gemischten Säuregärung, die von fakultativen Aerobiern (gramnegative *Enterobacteriaceae* und andere *Gammaproteobacteria* sowie einige grampositive *Bacillaceae* innerhalb der *Firmicutes*) durchgeführt wird (Tabelle 1; Gottschalk, 1986; Brenner, 1992; Brenner und Farmer, 2005). Verbreitete Substrate für die gemischte Säuregärung sind Monosaccharide wie Glucose, Fucose und Rhamnose, die im Verdauungstrakt in hohen Konzentrationen vorkommen (Abbildung 25). *Enterobacteriaceae*-verwandte Arten und andere *Gammaproteobacteria* wurden bereits aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* isoliert (Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005) und 16S rRNA Gensequenzen von *Gammaproteobacteria* wurden im Verdauungstrakt von *L. rubellus* detektiert (Tabelle 24; Singleton *et al.*, 2003). *Enterobacteriaceae* wurden über die Inkubation von Verdauungstraktinhalt mit ¹³C-markierter Glucose und anschließender Stablen-Isotopenbeobachtung (SIP) als dominante Glucose-verwertende Familie identifiziert (Tabelle 24 und Abbildung 38B). ¹³C-markierte Sequenzen der *Enterobacteriaceae* wurden den Gattungen *Buttiauxella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Raoultella* und *Serratia* zugeordnet (Abbildung 38B). Spezies dieser Gattungen können Glucose und andere Zucker vergären (Müller *et al.*, 1996; Ihssen *et al.*, 2003; Brenner und Farmer, 2005; Grimont und Grimont, 2005). Einige markierte *Enterobacteriaceae*-Sequenzen waren phylogenetisch eng (98 - 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) mit Sequenzen von *Buttiauxella agrestis* verwandt (Abbildung 38B). Stämme dieser Spezies sind für die Reduktion von N₂O zu N₂ bekannt (Kaldorf *et al.*, 1993). Viele markierte *Enterobacteriaceae*-Sequenzen gruppieren (96 - 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) mit Sequenzen von *Pantoea agglomerans* (Abbildung 38B). Diese Spezies produziert die Exoenzyme Chitinase, Pektinase und Protease (Mahmoud *et al.*, 2008) und könnte daher auch am Abbau komplexer organischer Verbindungen im Verdauungstrakt des Regenwurms beteiligt sein. *P. agglomerans* weist zudem zahlreiche

anaerobe Aktivitäten und Fähigkeiten auf (Grimont und Grimont, 2005), die in O₂-limitierten Habitaten wie dem Regenwurmverdauungstrakt von Vorteil sein könnten. *P. agglomerans* kann nicht nur Gärung betreiben, sondern auch metallische Verbindungen wie Eisen(III) reduzieren und dabei Lactat, Acetat oder H₂ als Elektronendonator nutzen (Francis *et al.*, 2000). Die hohen Fe(II)-Konzentrationen im Verdauungstrakt von *L. terrestris* (Abbildung 24B) und erhöhte Keimzahlen von Eisen(III)-Reduzieren im Verdauungstraktinhalt von *A. caliginosa* und *L. terrestris* im Vergleich zum Boden (Tabelle 20) deuten darauf hin, dass Eisen(III)-Reduktion *in situ* stattfindet und durch die vorhandenen Gärungsprodukte angetrieben werden könnte. Auch im Darm von boden- und holzfressenden Termiten scheint Eisen(III)-Reduktion hoch aktiv zu sein (Kappler und Brune, 2002; Vu *et al.*, 2004). Die meisten *Enterobacteriaceae* können Nitrat zu Nitrit oder zu Ammonium reduzieren (Tiedje, 1988; Brenner, 1992) und könnten daher zumindest teilweise für die im Vergleich zum Boden niedrigen Nitratkonzentrationen im Verdauungstraktinhalt verantwortlich sein (Abbildung 24A; Horn *et al.*, 2003b).

Die Familie *Aeromonadaceae* ist phylogenetisch nah verwandt zu den *Enterobacteriaceae* (Abbildung 38B; Martin-Carnahan und Joseph, 2005a) und wurde ebenfalls während der anoxischen Glucose-Inkubation angereichert, im Gegensatz zu den *Enterobacteriaceae* jedoch nicht markiert (Tabelle 24 und Abbildung 38B). *Aeromonadaceae* sind ebenfalls fakultative Aerobier, die unter anoxischen Bedingungen viele der im Verdauungstrakt vorkommenden Saccharide (z. B. Arabinose, Galaktose, Glucose, Rhamnose) vergären und dabei organische Säuren und Gase bilden können (Martin-Carnahan und Joseph, 2005a). Ein Großteil der im Verdauungstrakt detektierten *Aeromonadaceae*-Sequenzen war nah zu Sequenzen von *Aeromonas veronii*, *Aeromonas media* oder *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* verwandt (jeweils 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit, Abbildung 38B). Von *Aeromonas*-Spezies ist bekannt, dass sie die Passage durch den Regenwurmverdauungstrakt überleben können (Pedersen und Hendriksen, 1993) und eine Vielzahl an Exoenzymen produzieren (Martin-Carnahan und Joseph, 2005b). *Aeromonas*-Isolate aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* waren fähig, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren und N₂O zu bilden (Ihssen *et al.*, 2003). Einige Vertreter der *Aeromonadaceae* können ebenfalls Eisen(III) reduzieren (Lovley *et al.*, 2004).

Dominante Endprodukte der Buttersäuregärung (d. h. Butyrat und H₂; Tabelle 1) wurden vornehmlich in Mittel- und Enddarm von *L. terrestris* detektiert (Abbildung 26) und auch in anoxischen Glucose-Inkubationen von Mittel- und Enddarminhalt gebildet (Tabelle 22). In vorangegangenen Studien war Butyrat ein Endprodukt in anoxischen Kultivierungsansätzen von Verdauungstraktinhalt aus *A. caliginosa* (Ihssen *et al.*, 2003). Die Buttersäuregärung ist charakteristisch für grampositive, obligat anaerobe Endosporenbildner wie z. B. *Clostridiaceae* innerhalb des Phylums *Firmicutes* (Tabelle 1; Wiegel *et al.*, 2006).

Clostridiaceae-verwandte Arten und andere *Firmicutes* wurden bereits aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* isoliert (Ihssen *et al.*, 2003). Auch in anderen tierischen Verdauungstrakten sowie in Böden sind Clostridien und deren Sporen weit verbreitet (Wiegel *et al.*, 2006). Die Hydrogenasen der Butyrat-produzierenden Clostridien sind O₂-empfindlich (Buckel, 2005), weshalb Buttersäuregärer vermutlich nicht direkt nach der Aufnahme in den Verdauungstrakt aktiv sind. Clostridien können Glucose zu Acetat, Butyrat, Lactat, Ethanol, H₂ und CO₂ vergären (Wiegel *et al.*, 2006; Rainey *et al.*, 2009). Die Bildung dieser Gärungsprodukte wurde in anoxischen Inkubationen durch zusätzliche Glucose stimuliert (Abbildung 30, Abbildung 31, Tabelle 21 und Tabelle 22) und *Clostridiaceae* wurden als dominante [¹³C]Glucose-Verwerter identifiziert (Tabelle 24 und Abbildung 38A). Die meisten 16S rRNA cDNA Sequenzen aus den ‚schweren‘ Fraktionen der [¹³C]Glucose-Inkubation wurden der Gattung *Clostridium sensu strictu* (Cluster I [Collins *et al.*, 1994]; Abbildung 38A) zugeordnet. ¹³C-markierte Sequenzen der *Clostridiaceae* waren eng (97 - 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) mit Sequenzen von *Clostridium beijerinckii* und *Clostridium puniceum* verwandt (Abbildung 38A), die neben Butyrat, Acetat, Formiat und Butanol große Mengen an H₂ bilden (Rainey *et al.*, 2009). Der aus dem Termitendarm isolierte Stamm *C. beijerinckii* AM21B bildet beispielsweise bis zu 2 mol H₂ pro mol Glucose (Taguchi *et al.*, 1993; Nandi und Sengupta, 1998). *C. beijerinckii*- und *C. puniceum*-verwandte Arten könnten folglich von zentraler Bedeutung für die H₂-Bildung im Verdauungstrakt und die daraus resultierende H₂-Emission durch Regenwürmer sein.

Andere ¹³C-markierte *Clostridiaceae*-Sequenzen waren sehr ähnlich (94 - 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) zu Sequenzen von „*Clostridium chromoreductans*“ oder *Clostridium saccharobutylicum* (Abbildung 38A). Einige *C. saccharobutylicum*-Stämme werden für die industrielle Produktion von Butanol eingesetzt, bilden aber während der frühen Wachstumsphase hauptsächlich organische Säuren, CO₂ und H₂ und weisen häufig hohe hemicellulolytische Aktivitäten auf (Keis *et al.*, 2001; Berezina *et al.*, 2009). Einige nicht markierte 16S rRNA cDNA Sequenzen gruppieren mit Sequenzen von *Clostridium gasigenes* oder *Clostridium frigidicarnis* (Abbildung 38A). Beide Arten können bei niedrigen Temperaturen (< 5 °C) wachsen und sind für die Sekretion von hydrolytischen Exoenzymen bekannt (Broda *et al.*, 1999; Broda *et al.*, 2000; Akila und Chandra, 2003). Psychrotolerante Clostridien könnten folglich am Abbau organischer Substanz im Verdauungstrakt beteiligt sein.

Neben *Clostridiaceae*-verwandten Arten wurden auch andere Familien innerhalb der *Firmicutes* (z. B. *Bacillaceae*, „*Paenibacillaceae*“, „*Peptostreptococcaceae*“ und „*Lachnospiraceae*“) während der anoxischen Glucose-Inkubation angereichert, jedoch nicht markiert (Tabelle 24 und Abbildung 38A). *Paenibacillus terrae* MH72 und *Paenibacillus anaericanus* wurden aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* isoliert und betrieben in

Abwesenheit eines exogenen terminalen Elektronenakzeptors Gärung (Horn *et al.*, 2005). Bei *P. anaericanus* wurden zudem Hinweise auf Chitinaseaktivität gefunden (Horn *et al.*, 2005). Auch viele *Bacillaceae* produzieren extrazelluläre hydrolytische Enzyme (Priest, 1977), die im Verdauungstrakt des Regenwurms zum Abbau komplexer Polymere wie Polysaccharide, Nukleinsäuren und Lipide beitragen könnten. Viele *Bacillaceae*-Arten wurden aus Böden isoliert und Bacilli-Sporen werden häufig in Böden gefunden (Slepecky und Hemphill, 2006). Bei günstigen Umweltbedingungen werden *Bacillaceae* sehr schnell aktiv, weshalb sie als *r*-Strategen eingeordnet werden (Sneath, 1991). In der Tat stimuliert die Passage durch den Regenwurmverdauungstrakt die Germination von Bacilli-Sporen (Fischer *et al.*, 1997). „*Lachnospiraceae*“-verwandte Sequenzen waren am nächsten (90 - 93 % 16S rRNA Genähnlichkeit) mit Sequenzen von *Clostridium phytofermentans* und *Cellulosilyticum lentocellum* verwandt (Abbildung 38A). *C. phytofermentans* und *C. lentocellum* vergären neben diversen Hexosen und Pentosen auch Cellulose und bilden dabei hauptsächlich Acetat, Ethanol, CO₂ und H₂ (Murray *et al.*, 1986; Ravinder *et al.*, 2001; Warnick *et al.*, 2002; Cai und Dong, 2010).

2-Methylbutyrat wurde in hohen Konzentrationen im Mitteldarm von *L. terrestris* nachgewiesen (Abbildung 26) und war ein Endprodukt in anoxischen Kultivierungsansätzen von Verdauungstraktinhalt aus *L. terrestris* und *A. caliginosa* (Abbildung 29). Zudem wurden 2-Methylbutyrat und Isobutytrat in anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt produziert (3.2.8). Diese organischen Säuren entstehen häufig bei der Vergärung von verzweigten Aminosäuren wie z. B. Valin und Isoleucin (Tabelle 1; Nanninga und Gottschal, 1985; Gottschalk, 1986; McInerney, 1988; Fardeau *et al.*, 1997). Der Gesamtproteingehalt nahm entlang des Verdauungstrakts ab (Tabelle 18), weshalb anzunehmen ist, dass aufgenommene Bodenbakterien die Aminosäuren im Verdauungstrakt als Kohlenstoffquelle nutzen bzw. assimilieren (Horn *et al.*, 2003b). Aminosäuren sind im Verdauungstrakt abundant und unterscheiden sich in ihrer Quantität und Qualität von den Aminosäuren im umgebenden Boden (Horn *et al.*, 2003b; Drake und Horn, 2007). Viele *Clostridiaceae*-Arten beziehen ihre Energie aus der Vergärung von Aminosäuren (peptolytische Clostridien). Bei der Vergärung einzelner Aminosäuren werden häufig Acetat, Butyrat, CO₂ und H₂ gebildet (Madigan *et al.*, 2009). Einige der im Verdauungstrakt detektierten Aminosäuren (z. B. Arginin und Histidin sowie Alanin und Glycin [Drake und Horn, 2007]) können von Clostridien paarweise über die Stickland-Reaktion vergärt werden, wobei eine Aminosäure oxidiert und die andere Aminosäure reduziert wird (Tabelle 1; Nisman, 1954; McInerney, 1988). Gärungsprodukte der Stickland-Reaktion sind Ammoniak, CO₂ und eine organische Säure (Madigan *et al.*, 2009).

Die Familie der „*Peptostreptococcaceae*“ ist phylogenetisch eng mit den *Clostridiaceae* verwandt (Abbildung 38A; Ezaki *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2009). Die hohe relative

Abundanz von „*Peptostreptococcaceae*“-Sequenzen in den ‚leichten‘ Fraktionen der [^{13}C]Glucose-Inkubation deutet darauf hin, dass „*Peptostreptococcaceae*“-Arten endogene Kohlenstoffquellen verwerteten. Vertreter der „*Peptostreptococcaceae*“ könnten entscheidend an der Vergärung von Aminosäuren im Verdauungstrakt beteiligt sein, denn „*Peptostreptococcus*“-Arten verwerten kaum Saccharide, sondern hauptsächlich Pepton und Aminosäuren. Dabei werden Acetat, Butyrat und Isobutytrat gebildet (Ezaki *et al.*, 2006; Ezaki, 2009). *Clostridium bifermentans* und *Clostridium glycolicum* zählen zu den „*Peptostreptococcaceae*“-Arten, die sowohl Kohlenhydrate als auch Aminosäuren abbauen können (Chamkha *et al.*, 2001a; Chamkha *et al.*, 2001b). Viele „*Peptostreptococcaceae*“-Sequenzen aus dem Verdauungstrakt waren mit Sequenzen dieser beiden Spezies verwandt (92 - 98 % 16S rRNA Genähnlichkeit; Abbildung 38A) und unterstreichen die Annahme, dass fermentativ vielseitige Bakterien im Regenwurmverdauungstrakt aktiv sind.

Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten stützen folglich die Aussage, dass diverse Bakterien während der Passage durch den Verdauungstrakt des Regenwurms am Abbau organischer Substanz beteiligt sind. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass *Clostridiaceae*- und *Enterobacteriaceae*-Arten durch Glucose selektiv stimuliert werden und daher sehr wahrscheinlich auch Saccharide aus Mucus und pflanzlicher Biomasse verwerten können. Weiterhin wurde am Beispiel der *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* demonstriert, wie sich die Passage durch den Verdauungstrakt des Regenwurms auf Bodenbakterien auswirken könnte.

4.3.2 Evaluierung des experimentellen Ansatzes

Clostridiaceae und *Enterobacteriaceae* wurden über eine Inkubation mit ^{13}C -markierter Glucose und anschließender Stablen-Isotopenbeprobung (SIP) als aktive Glucose-verwertende *Bacteria* im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* identifiziert (3.2.9). Die Inkubationsbedingungen imitierten hierbei die *in situ*-Bedingungen des Verdauungstrakts, waren aber nicht mit diesen identisch. Die Verdünnung des Verdauungstraktinhalts im Verhältnis 1 : 10 (w/v) war zur Gewinnung von Flüssigproben für chemische und molekularbiologische Analysen unumgänglich, verdünnte aber natürlich auch die Mikrobiota und die endogenen Nährstoffe im Verdauungstraktinhalt. Zudem wurde nur eines von vielen im Verdauungstrakt verfügbaren Sacchariden für die SIP eingesetzt. Jedoch orientierten sich die gewählten Inkubationsbedingungen (anoxische Bedingungen, 15 °C, 10 mmol Glucose l [Wassergehalt] $^{-1}$, neutraler pH-Wert und eine relativ kurze Inkubationszeit) an wichtigen *in situ*-Parametern des Regenwurmverdauungstrakts, die auch für dort stattfindende Gärungsprozesse relevant sein dürften.

Ein Problem bei der Interpretation von SIP-Versuchen ist das „Cross-Feeding“, was zur Markierung von Taxa führt, die nicht direkt das markierte Substrat, sondern ein

Abbauprodukt davon assimilierten (Neufeld *et al.*, 2007). Die Mitführung aussagekräftiger Kontrollen ist daher bei der SIP unerlässlich. Der apparente Verbrauch geringer Formiat- und Lactat-Mengen in den ungesupplementierten Kontrollen (Tabelle 22) deutet darauf hin, dass auch organische Säuren, die durch den Abbau der [¹³C]Glucose freigesetzt wurden, verbraucht und assimiliert wurden. Falls „Cross-Feeding“ in den Inkubationsversuchen auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass es auch *in situ* vorkommt. Beispielsweise war Acetat ein dominantes Gärungsprodukt in Verdauungstraktinhalt (Tabelle 22) und könnte *in situ* eine trophische Beziehung zwischen Gärern und Denitrifikanten darstellen, da es für viele Denitrifikanten ein verwertbares Substrat ist (Tiedje, 1988). Die markierten Taxa könnten folglich Hinweise auf trophisch verkettete Ereignisse, die während der Darmpassage auftreten, liefern. Mittel- und Enddarminhalt enthielten allerdings nur marginale Mengen an Nitrat und Nitrit (Abbildung 24A) und in anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt wurde kein N₂O gebildet (Abbildung 30B und Daten nicht gezeigt), weshalb das „Cross-Feeding“ von Denitrifikanten unwahrscheinlich erscheint. Diese Annahme wird von den molekularbiologischen Daten unterstützt, denn denitrifizierende Taxa wurden zwar zu Inkubationsbeginn, aber nicht mehr nach 51-stündiger Inkubation mit Glucose detektiert (Tabelle 24). Das Auftreten von „Cross-Feeding“ kann zwar nicht komplett ausgeschlossen werden, gilt jedoch aufgrund der relativ kurzen Inkubationszeit und der limitierten Verfügbarkeit von alternativen Elektronenakzeptoren als sehr unwahrscheinlich. Der Großteil des [¹³C]Glucose-Kohlenstoffs wurde in Gärungsprodukten wiedergefunden, deren Konzentrationen mit der Zeit zunahm, weshalb eine Assimilation dieser Gärungsprodukte höchstwahrscheinlich minimal war. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, dass der selektive Tod bestimmter Mikroorganismen zur Anreicherung und Markierung von anderen Mikroorganismen führte. *Clostridiaceae* (Phylum *Firmicutes*) und *Enterobacteriaceae* (Subphylum *Gammaproteobacteria*) waren die ¹³C-markierten Familien im Verdauungstraktinhalt (Tabelle 24 und Abbildung 38) und wurden bereits in Böden als aktive Glucose-Verwerter identifiziert (Hamberger *et al.*, 2008; Degelmann *et al.*, 2009; Schellenberger *et al.*, 2010). Der RNA-Gehalt in aktiv wachsenden Zellen der *Firmicutes* und *Gammaproteobacteria* ist verhältnismäßig hoch, was zu einer erhöhten Detektierbarkeit dieser Taxa führen könnte (Nechitaylo *et al.*, 2010). Zudem ist es denkbar, dass die vielfältigen metabolischen Fähigkeiten von *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* und ihre kurzen Verdopplungszeiten von 0,5 - 3 h (Francis *et al.*, 2000; Wiegel *et al.*, 2006) diesen Familien einen Vorteil im Wettbewerb um verwertbare Substrate verschaffen. Unter Berücksichtigung der genannten methodischen Limitationen war die Markierung von *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* eindeutig und demonstriert, dass in den Verdauungstrakt aufgenommene obligate Anaerobier und fakultative Aerobier gleichzeitig dieselbe Kohlenstoffquelle nutzen können.

4.4 Diversität metabolisch aktiver *Bacteria* im Verdauungstrakt des Regenwurms

Im Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris* wurden 16S rRNA cDNA Sequenzen der Phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* und *Verrucomicrobia* detektiert (Tabelle 24). Da diese Ergebnisse durch die Analyse der RNA erhalten wurden, kann davon ausgegangen werden, dass Mikroorganismen aus diesen Phyla im Verdauungstrakt metabolisch aktiv sind. Abundante Phyla im frisch gewonnenen Verdauungstraktinhalt (d. h. vor der anoxischen Inkubation mit Glucose) waren *Actinobacteria* (40 %), *Proteobacteria* (33 %) und *Bacteroidetes* (7 %; Tabelle 24). In vorangegangenen Studien zur mikrobiellen Diversität im Verdauungstrakt des Regenwurms wurden *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Firmicutes* sowie *Alpha*-, *Beta*-, und *Gammaproteobacteria* als dominante Phyla bzw. Subphyla identifiziert (Singleton *et al.*, 2003; Knapp *et al.*, 2009; Nechitaylo *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass diese Taxa zu den fünf abundantesten Phyla in Böden weltweit gehören (Janssen, 2006), untermauert die These, dass die Mikroorganismen im Regenwurmverdauungstrakt aus der Nahrung des Regenwurms stammen und keine endogene, spezifische Mikrobiota darstellen (Singleton *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2006a).

Die vor Inkubationsbeginn gewonnenen 16S rRNA cDNA Sequenzen wurden 79 Familien zugeordnet, wovon 17 Familien eine 16S rRNA Genähnlichkeit von < 87,5 % zu beschriebenen Spezies aufwiesen und daher als neue Familien-ähnliche Gruppen definiert wurden (Tabelle 24; Yarza *et al.*, 2008). Etwa ein Drittel der 79 detektierten Familien (darunter sieben neue Familien-ähnliche Gruppen) gehörte dem Phylum *Actinobacteria* an. Die *Actinobacteria* bilden eines der artenreichsten Phyla innerhalb der Domäne *Bacteria* (Ludwig und Klenk, 2001) und beinhalten grampositive, morphologisch und physiologisch äußerst diverse Bakterien mit einem hohen (51 - 70 %) GC-Gehalt (Stackebrandt und Schumann, 2006; Ventura *et al.*, 2007). Obwohl *Actinobacteria* häufig als primäre Aerobier beschrieben werden (Evtushenko und Takeuchi, 2006), sind auch strikte Anaerobier, sowie fakultativ aerobe und microaerophile Spezies in diesem Phylum vertreten (Lechevalier und Lechevalier, 1967). *Actinobacteria* sind häufig in der Lage, eine Vielzahl von natürlichen Polymeren wie Lignocellulose, Hemicellulose, Pektin, Keratin und Chitin abzubauen zu können (Goodfellow und Williams, 1983; Ventura *et al.*, 2007). Zu den morphologischen Eigenschaften einiger *Actinobacteria*-Gattungen zählt die Bildung von Hyphen, welche ein charakteristisches Mycelium auf Substratoberflächen formen (Stackebrandt und Schumann, 2006). Viele beschriebene *Actinobacteria*-Gattungen bilden zudem durch die Differenzierung der terminalen Hyphen-Zellen Sporen aus, die der Verbreitung und der Überdauerung von ungünstigen Bedingungen dienen. *Actinobacteria* sind in Böden weit verbreitet und kommen

dort sehr zahlreich vor (Janssen, 2006; Stackebrandt und Schumann, 2006). Viele Familienentsprechende Taxa der *Actinobacteria* wurden zuerst aus Böden isoliert (Janssen *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003). 16S rRNA Gensequenzen der *Actinobacteria* wurden bereits im Darm und im Kot von Regenwürmern nachgewiesen (Furlong *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2003; Knapp *et al.*, 2009; Nechitaylo *et al.*, 2010) und Taxa der *Actinobacteria* wurden häufig aus dem Verdauungstrakt von Regenwürmern isoliert (Parlé, 1963a; Contreras, 1980; Krištůfek *et al.*, 1993; Byzov *et al.*, 2009). Mehr als die Hälfte aller kultivierbaren Mikroorganismen aus dem Verdauungstrakt von *L. rubellus* wurde den *Actinobacteria* zugeordnet (Knapp *et al.*, 2009) und auch im Verdauungstrakt von *Eisenia foetida* bildeten *Actinobacteria* einen beträchtlichen Anteil der kultivierbaren Bakterien (Tretyakova *et al.*, 1996). In vorangegangenen Studien zur Bedeutung der *Actinobacteria* im Regenwurmverdauungstrakt wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Antibiotika-Produktion der *Actinobacteria* das Wachstum anderer (v. a. grampositiver und sensitiver gramnegativer) Mikroorganismen im Verdauungstrakt gehemmt wird (Ravasz *et al.*, 1986; Krištůfek *et al.*, 1993; Brown, 1995). Daher wurde vermutet, dass die im Vergleich zum Boden erhöhte Abundanz der *Firmicutes* im Kot von *L. rubellus* vor allem auf die Germination von Endosporen und nicht auf Zellwachstum zurückzuführen ist (Furlong *et al.*, 2002).

Am häufigsten wurden zu Inkubationsbeginn die Familien *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*), *Microbacteriaceae* (*Actinobacteria*), *Nocardioideae* (*Actinobacteria*) und *Planctomycetaceae* (*Planctomycetes*) detektiert (Tabelle 24). Die Familie der gramnegativen *Flavobacteriaceae* ist in terrestrischen und aquatischen Habitaten weit verbreitet und zeichnet sich generell durch eine saprotrophe Ernährungsweise aus (Bernadet und Bowman, 2006). Viele Vertreter der *Flavobacteriaceae* gelten als Verwerter komplexer organischer Makromoleküle und können häufig Nitrat zu Nitrit reduzieren (Reichenbach, 1989; Bernardet *et al.*, 2002; Bernadet und Bowman, 2006). *Flavobacteriaceae*-verwandte Sequenzen aus dem Verdauungstrakt gruppieren (95 - 97 % 16S rRNA Genähnlichkeit) mit Sequenzen von *Flavobacterium johnsoniae* und *Flavobacterium succinicans* (Daten nicht gezeigt). *F. johnsoniae* gilt als strikter Aerobier mit Oxidaseaktivität, während *F. succinicans* in Gegenwart von bestimmten Wachstumsfaktoren auch unter anoxischen Bedingungen wachsen kann (Bernadet *et al.*, 1996). Viele *Flavobacterium*-Arten wurden aus feuchten und kohlenstoffreichen Böden isoliert (Bernadet und Bowman, 2006) und könnten daher auch durch die Umgebung des Regenwurmverdauungstrakts stimuliert werden (Schönholzer *et al.*, 2002). *Flavobacterium denitrificans* wurde aus dem Darm von *A. caliginosa* isoliert und ist ein fakultativer Aerobier, der Polymere wie Pektin und Stärke abbauen und zudem die vollständige Denitrifikation betreiben kann (Horn *et al.*, 2005). Im Regenwurmverdauungstrakt könnten *Flavobacteriaceae* demzufolge durch den Abbau hochmolekularer organischer Substanz Substrate für die primären Gärer liefern.

Microbacteriaceae sind nicht-sporenbildende, obligate oder fakultative Aerobier, die sich von anderen *Actinobacteria* durch die Beschaffenheit ihrer Zellwand unterscheiden (Evtushenko und Takeuchi, 2006). Viele Vertreter dieser Familie sind mit Pflanzen assoziiert (Evtushenko *et al.*, 2000; Evtushenko *et al.*, 2001; Behrendt *et al.*, 2002; Dorofeeva *et al.*, 2002; Dorofeeva *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2009) und könnten folglich zusammen mit pflanzlichem Material in den Regenwurmverdauungstrakt gelangen. Aus dem Enddarm einer detritivoren Schnakenlarve (Ordnung *Tipulidae*) wurde kürzlich die mikroaerobe bis aerobe *Microbacteriaceae*-Gattung *Crocebacterium* isoliert, deren Typstamm *Crocebacterium ilecola* Oligosaccharide abbauen und Nitrat zu Ammonium reduzieren kann (Rogers und Doran-Peterson, 2010). Die meisten detektierten *Microbacteriaceae*-Sequenzen wurden der Gattung *Microbacterium* zugeordnet (Daten nicht gezeigt). *Microbacterium*-Arten wurden häufig aus Böden isoliert (Dastager *et al.*, 2008b; Park *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2009) und zählten ebenfalls zu den kultivierbaren Mikroorganismen aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* (Byzov *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer metabolischen Fähigkeiten scheinen *Microbacteriaceae* den Regenwurmverdauungstrakt als Habitat nutzen zu können.

Viele *Nocardioideae*-Arten können in Gegenwart von O₂ Cellobiose, Glucose und andere Saccharide abbauen (Wang *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005; Yoon und Park, 2006) und wurden in oxischen Bodeninkubationen als aktive Verwerter von Cellulose und Glucose identifiziert (Schellenberger *et al.*, 2010). Der Großteil der im Verdauungstraktinhalt detektierten *Nocardioideae*-Sequenzen wurde der hyphenbildenden Gattung *Nocardioides* (Yoon und Park, 2006) zugeordnet (Daten nicht gezeigt), die in Böden weit verbreitet ist. Obwohl alle *Nocardioides*-Arten nach bisherigen Kenntnissen als strikte Aerobier gelten (Prauser, 1976; Lawson *et al.*, 2000; Yoon und Park, 2006; Dastager *et al.*, 2008a), legt diese Beobachtung nahe, dass Vertreter dieser Gattung auch in Abwesenheit von O₂ bzw. unter mikrooxischen Bedingungen metabolisch aktiv sein können.

Planctomycetaceae wurden bereits im Verdauungstrakt von Regenwürmern und anderen Tieren detektiert (Schmitt-Wagner *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Nechitaylo *et al.*, 2010). Im Darm von bodenfressenden Termiten können *Planctomycetaceae* sogar bis zu ein Drittel aller durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) detektierten Bakterien ausmachen (Köhler *et al.*, 2008). Planctomyceten-verwandte Sequenzen sind in Genbibliotheken, die mit dem *Bacteria*-spezifischen Primer 27f erstellt wurden, häufig unterrepräsentiert (Derakshani *et al.*, 2001). Folglich könnte der tatsächliche Anteil der *Planctomycetaceae* im Regenwurmverdauungstrakt höher sein als bisher angenommen. Alle bislang isolierten *Planctomycetaceae*-Arten sind obligat oder fakultativ aerobe Chemoheterotrophe, die häufig Polymere abbauen und/oder N-Acetylglucosamin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen können (Schlesner, 1994; Ward *et al.*, 2006). In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass *Planctomycetaceae* entscheidend zur

Umwandlung und damit zum Abbau gelöster organischer Substanz beitragen können (Tadonlécé, 2007). Einige Vertreter der *Planctomycetaceae* (z. B. Candidatus „*Kuenenia stuttgartiensis*“ [Schmid *et al.*, 2000] und Candidatus „*Brocadia anammoxidans*“ [Jetten *et al.*, 2001]) sind für die Durchführung der anaeroben Ammoniumoxidation (Anammox) bekannt (Abbildung 4; Strous *et al.*, 1999; Jetten *et al.*, 2005). Anammox gilt in Abwassersystemen und marinen Ökosystemen als bedeutender Prozess der Stickstoffentfernung (Kuenen, 2008). Die Bedeutung von Anammox in terrestrischen Ökosystemen ist zwar bislang ungeklärt, jedoch bestehen erste Hinweise auf das Vorkommen und die Aktivität von diversen anaeroben Ammoniumoxidierern in Böden mit hohen Wasser- und/oder hohen Stickstoffgehalten (Humbert *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Da im anoxischen Verdauungstrakt des Regenwurms hohe Konzentrationen an Ammonium und Nitrit vorherrschen (Abbildung 24), könnten auch dort anaerobe Ammoniumoxidierer stimuliert werden und neben Denitrifikanten zur Bildung von N₂ beitragen. Mit [¹⁵N]Ammonium versetzte Regenwurmverdauungstrakte bildeten jedoch kein ¹⁴N¹⁵N, weshalb die Aktivität von anaeroben Ammoniumoxidierern im Regenwurm unwahrscheinlich erscheint (Marcus Horn, persönliche Kommunikation). Der Großteil der im Regenwurmverdauungstrakt detektierten *Planctomycetaceae*-Sequenzen wies eine 16S rRNA Genähnlichkeit < 94 % zu beschriebenen *Planctomycetaceae* auf (Daten nicht gezeigt) und deutet daher auf die Aktivität bisher unbekannter Gattungen der *Planctomycetaceae* im Verdauungstrakt von *L. terrestris* hin (Yarza *et al.*, 2008).

Im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* wurden außerdem drei Familien-entsprechende OTUs (unklassifizierte Gruppen 1 - 3; Tabelle 24) detektiert, die zu bisher nicht valide beschriebenen Taxa im Kandidatenstatus verwandt waren. Eines dieser Taxa (Candidatus „*Lumbricincola* sp.“) wurde kürzlich im Gewebe, Verdauungstraktinhalt und Kot von vier *Lumbricidae*-Arten gefunden und gilt als potentieller Symbiont des Regenwurms, der in der Coelomflüssigkeit lebt (Nechitaylo *et al.*, 2009). Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten stützen folglich die Aussage, dass hoch diverse und zum Teil bislang unkultivierte Taxa im Verdauungstrakt des Regenwurms metabolisch aktiv sind und über trophische Beziehungen miteinander in Verbindung stehen.

4.5 Der Regenwurm als mobile Elektronenquelle in belüfteten Böden

H₂ war in anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt ein stabiles Endprodukt (3.2.8) und wurde sowohl von Regenwurmabschnitten gebildet (3.2.2), als auch von lebenden Regenwürmern emittiert (3.2.1). Viele Anaerobier, fakultative und obligate Aerobier, Methylotrrophe und phototrophe Bakterien nutzen die Hydrogenase-abhängige Bildung von H₂ zur Regeneration ihrer Oxidationsmittel (Nandi und Sengupta, 1998). H₂ stellt eine wichtige trophische Verbindung zu Methanogenese und Acetogenese dar (Zinder, 1993; Drake *et al.*, 2006; Hedderich und Whitman, 2006) und spielt daher eine bedeutende Rolle im intermediären Ökosystemmetabolismus von anoxischen Habitaten, wie Feuchtgebieten (Horn *et al.*, 2003a; Hamberger *et al.*, 2008; Drake *et al.*, 2009; Wüst *et al.*, 2009), Klärschlamm (Xing *et al.*, 2008) oder tierischen Verdauungstrakten (Zimmerman *et al.*, 1982; Flint, 1997). Demgegenüber scheinen Methanogene und Acetogene im Verdauungstrakt des Regenwurms nicht metabolisch relevant zu sein (Karsten und Drake, 1995). Tatsächlich wurde Methan weder in anoxischen Darminhaltsinkubationen gebildet, noch wurde es von Regenwürmern emittiert (Karsten und Drake, 1997). In den hoch spezialisierten Verdauungstrakten von Termiten (Ordnung *Isoptera*) und Schaben (Ordnung *Blattodea*) wird gebildeter H₂ sofort durch Acetogenese und/oder Methanogenese verbraucht, sodass H₂-Produktion und -Verbrauch im Gleichgewicht stehen und nur geringste Mengen an H₂ emittiert werden (Breznak und Switzer, 1986; Breznak, 1994; Ebert und Brune, 1997; Brune, 1998; Lemke *et al.*, 2001; Pester und Brune, 2007). Gegenwärtig ist nicht geklärt, ob es im Regenwurm H₂-Senken gibt. Aufgrund der Anwesenheit verschiedener anorganischer Elektronenakzeptoren im Verdauungstrakt (Abbildung 24) wird jedoch davon ausgegangen, dass H₂ nicht nur vom Regenwurm emittiert, sondern auch im Regenwurm verbraucht wird. Im Verdauungstraktinhalt wurden bis zu 7 mmol Butyrat l (Wassergehalt)⁻¹ detektiert (Abbildung 26). Unter der Annahme, dass Butyrat im Verdauungstrakt ausschließlich über reine Buttersäuregärung entsteht, bei der Butyrat und H₂ im Verhältnis von 1 : 2 gebildet werden (Gottschalk, 1986), müssten etwa 14 mmol H₂ l (Wassergehalt)⁻¹ frei werden. Die *in situ*-Konzentrationen betragen im Verdauungstrakt tatsächlich 8,5 µmol H₂ l (Wassergehalt)⁻¹ (Abbildung 22B). Diese Werte unterstützen die Annahme, dass bisher unbekannte H₂-verbrauchende Prozesse im Regenwurmverdauungstrakt aktiv sind. Zudem bildeten isolierte Verdauungstrakte 116 x mehr H₂ als von lebenden Regenwürmern emittiert wurde (3.2.3), was auf einen H₂-Verbrauch außerhalb des Verdauungstrakts und im Regenwurmgewebe hinweist. Bei Schaben wurde bereits der Transfer von H₂ durch das Epithel verschiedener Darmabschnitte beobachtet (Lemke *et al.*, 2001). Inwiefern außerhalb des Verdauungstrakts Mikroorganismen oder der Wurm selbst am H₂-Verbrauch beteiligt sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Lebende *L. terrestris* emittierten etwa $6 \text{ nmol H}_2 \text{ g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bei einer Wurmdichte von bis zu 2.000 Individuen pro Quadratmeter Boden (Edwards und Bohlen, 1996; Edwards, 2004a) und einem durchschnittlichen Wurm-Frischgewicht von 2 g können Regenwürmer folglich bis zu $600 \text{ } \mu\text{mol H}_2$ pro Quadratmeter und Tag emittieren. Dieser Wert ist um das 7-Fache höher als die tägliche N_2O -Emission eines Quadratmeters Wiesenboden (Matson *et al.*, 1990). Regenwürmer können demzufolge als eine bedeutende mobile Elektronenquelle (in Form von emittiertem H_2) für die Mikrobiota in belüfteten Böden betrachtet werden.

Durch die Emission von H_2 und stickstoffhaltigen Gasen verliert der Regenwurm energetisch wertvolle Reduktionsäquivalente. Bei einer angenommenen Respirationsrate von etwa $3 \text{ } \mu\text{mol O}_2 \text{ g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Lee, 1985) benötigt *L. terrestris* $12 \text{ } \mu\text{mol}$ Reduktionsäquivalente $\text{g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für die Reduktion des O_2 . Die H_2 -Emissionsrate von lebenden *L. terrestris* lag bei etwa $6 \text{ nmol H}_2 \text{ g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und erfordert damit 12 nmol Reduktionsäquivalente $\text{g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die durchschnittliche N_2O -Emissionsrate betrug $0,4 \text{ nmol N}_2\text{O g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Unter der Annahme dass N_2 und N_2O zu gleichen Teilen emittiert werden (Horn *et al.*, 2006b), sind für die Emission von stickstoffhaltigen Gasen 7 nmol Reduktionsäquivalente $\text{g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ notwendig. Auf Basis dieser Schätzwerte ist die für die Respiration benötigte Menge an Reduktionsäquivalenten ca. $630 \times$ höher als die durch die Emission von H_2 , N_2O und N_2 verlorene Menge an Reduktionsäquivalenten. Folglich ist der durch die Emission von H_2 , N_2O und N_2 bedingte Verlust an Reduktionsäquivalenten aus energetischer Sicht für den Wurm irrelevant.

4.6 Schlussfolgerungen und hypothetisches Modell zu den trophischen Beziehungen entlang des Verdauungstrakts

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die Fähigkeit zur N_2O -Emission auch bei Regenwürmern der südlichen Hemisphäre auftritt, widerlegt jedoch gleichzeitig die Hypothese, dass die Emission von N_2O ein universelles Merkmal von Regenwürmern ist (Hypothese 1; 1.4). Vielmehr scheint bei manchen Wurmartensorten N_2 das dominante Endprodukt der Denitrifikation im Verdauungstrakt zu sein, was zur vermehrten Emission von N_2 (statt N_2O) führt. Weiterhin unterstützen die erhobenen Daten die Hypothese, dass im Verdauungstrakt des Regenwurms neben der Denitrifikation auch Gärungsprozesse hoch aktiv sind (Hypothese 2; 1.4). Basierend auf den mit *L. terrestris* erzielten Ergebnissen wurde ein hypothetisches Modell zu den anaeroben Aktivitäten entlang des Verdauungstrakts entwickelt (Abbildung 39).

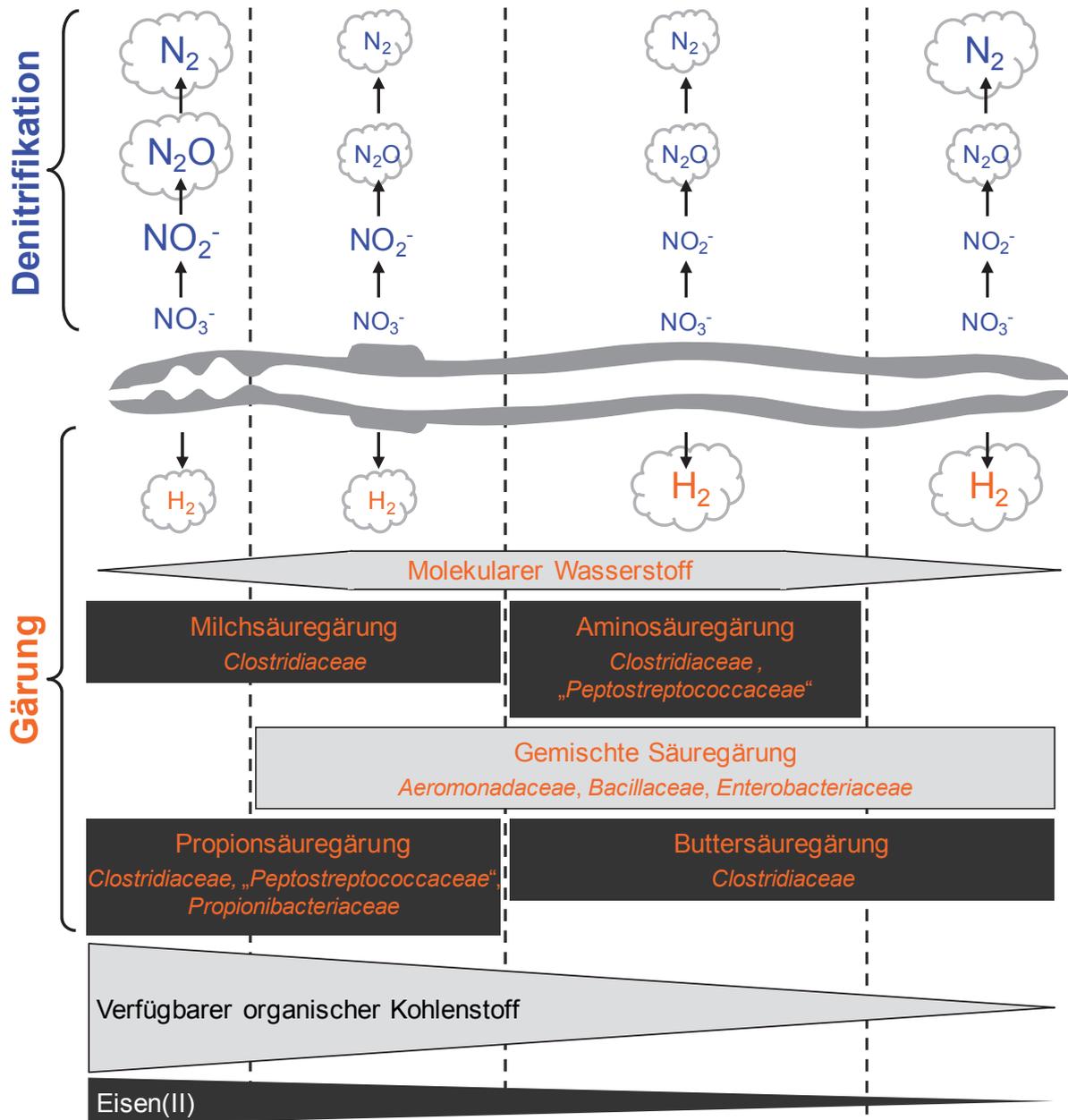


Abbildung 39. Hypothetisches Modell zu den anaeroben mikrobiellen Aktivitäten, assoziierten gärenden Mikroorganismen und potentiellen trophischen Beziehungen entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris*. Die relativen Konzentrationen der Verbindungen sind durch die Schriftgröße angedeutet. Eine Verjüngung der Balkenelemente symbolisiert eine Konzentrationsabnahme der Verbindungen. Gase in Wolken weisen auf eine Emission durch den Wurm hin. Namen in Anführungszeichen sind laut „List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature“ (Euzéby, 2010) nicht valide.

L. terrestris gehört zu den anözischen Regenwürmern, welche in tieferen Bodenschichten leben und sich von Mineralboden sowie von Pflanzenstreu auf der Bodenoberfläche ernähren (1.1.3; Bouché, 1977). Epigäische und endogäische Regenwürmer verfügen über andere Ernährungsstrategien, was sich möglicherweise auf die anaeroben Aktivitäten und

assoziierte Mikroorganismen im Verdauungstrakt auswirken könnte (Brown, 1995). Tatsächlich ist bekannt, dass die Ernährungsstrategie die 16S rRNA Gendiversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Verdauungstrakt beeinflussen kann (Egert *et al.*, 2004; Knapp *et al.*, 2008; Knapp *et al.*, 2009; Thakuria *et al.*, 2010). Weiterhin lieferte die Analyse von *narG* und *nosZ* Genen und deren Transkripten aus dem Verdauungstrakt von *A. caliginosa* (endogäisch), *L. terrestris* (anözisch) und *L. rubellus* (epigäisch) Hinweise darauf, dass sich die Stimulation der dissimilatorischen Nitratreduzierer und Denitrifikanten im Verdauungstrakt von Regenwürmern aus unterschiedlichen ökologischen Gruppen unterscheidet (Depkat-Jakob *et al.*, 2010). Die mit *L. terrestris* gewonnenen Erkenntnisse können aber durchaus dazu herangezogen werden, die räumliche Verteilung potentieller anaerober mikrobieller Prozesse entlang des Verdauungstrakts zu veranschaulichen.

Die gesammelten Daten zu den *in situ*-Konzentrationen von N_2O und H_2 im Verdauungstrakt (Abbildung 22) und der Produktion von N_2O und H_2 durch Regenwurmabschnitte (Abbildung 18 und Tabelle 17) verdeutlichen, dass Denitrifikation vornehmlich im Kropf/Magen und im Enddarm stattfindet, während H_2 -freisetzende Gärungen im Vorder- und Mitteldarm dominieren. Potentielle trophische Verbindungen zwischen mikrobiellen Kohlenstoff- und Stickstofftransformationen im Verdauungstrakt sind Monosaccharide (z. B. Glucose) und Gärungsprodukte (z. B. Succinat, Acetat und Formiat), die von Denitrifikanten als Elektronendonatoren genutzt werden können (Knowles, 1982; Tiedje, 1988; Strohm *et al.*, 2007). Sowohl Gärer als auch Denitrifikanten benötigen zur Energiekonservierung oxidierbaren Kohlenstoff. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff und die Saccharidkonzentrationen nahmen entlang des Verdauungstrakts ab (Abbildung 23 und Abbildung 25), was Hinweise auf den Verbrauch organischer Verbindungen durch Mikroorganismen während ihrer Passage durch den Verdauungstrakt liefert. Leicht verwertbare organische Verbindungen werden zudem vom Regenwurm rückresorbiert (Storch und Welsch, 1999; Curry und Schmidt, 2007). Die Fähigkeit, organische Moleküle im Verdauungstrakt zu resorbieren, ist ein generelles Merkmal von Tieren (Tracey, 1951; Engelhardt und Rechkemmer, 1985; Hogan *et al.*, 1985; Rechkemmer *et al.*, 1988; Bergman, 1990; Duke, 1997). Auch langkettige Fettsäuren von einverleibten Mikroorganismen können vom Regenwurmgewebe aufgenommen werden (Sampedro *et al.*, 2006). Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten unterstützen daher die Annahme, dass Gärer, Denitrifikanten und der Regenwurm selbst um den leicht verfügbaren Kohlenstoff konkurrieren. Tatsächlich ist die Assimilation organischer Verbindungen, die durch den Abbau des intestinalen Mucus und der verdauten Biomasse frei werden, für den Regenwurm essentiell (Scheu, 1991; Edwards und Bohlen, 1996). Hohe Eisen(II)-Konzentrationen im Kropf/Magen lassen vermuten, dass während der initialen Verdauungsphase Eisen(III)-Reduktion stattfindet. Abnehmende

Eisen(II)-Konzentrationen entlang des anoxischen Verdauungstrakts deuten auf die Assimilation von Fe(II) durch Mikroorganismen oder den Wurm hin.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Gesamtzellzahlen und die Keimzahlen vom Vorderdarm zum Enddarm des Regenwurms hin zunehmen (Parlé, 1963a; Krištůfek *et al.*, 1992; Fischer *et al.*, 1995; Schönholzer *et al.*, 1999). Auch die Profile langkettiger Fettsäuren und die mit Hilfe von FISH ermittelten Zellzahlen für die Subphyla *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Deltaproteobacteria* zeigen signifikante Änderungen entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* (Schönholzer *et al.*, 2002; Sampedro und Whalen, 2007). Die vergleichende Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Kot von *L. rubellus* und im umgebendem Boden lässt darauf schließen, dass *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* während der Darmpassage selektiv aktiviert werden (Furlong *et al.*, 2002). Daten aus dieser Arbeit und Literaturdaten belegen, dass im Verdauungstrakt des Regenwurms zahlreiche Anaerobier vorkommen (Tabelle 24 und Tabelle 20; Karsten und Drake, 1995, 1997; Ihssen *et al.*, 2003; Nechitaylo *et al.*, 2010). Hohe Konzentrationen an organischen Säuren im Verdauungstraktinhalt von neuseeländischen und europäischen Regenwürmern weisen auf die Aktivität von gärenden Anaerobiern im Verdauungstrakt hin (Tabelle 16 und Abbildung 26). Qualität und Quantität der organischen Säuren variierten entlang des Verdauungstrakts von *L. terrestris* und lassen vermuten, dass im Verdauungstrakt verschiedene Gärungsprozesse in räumlicher (und damit auch in zeitlicher) Abfolge aktiv sind. Diese Annahme wird durch die Detektion diverser aktiver anaerober und fakultativ aerober Taxa bestätigt. *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* wurden als aktive Glucose-verwertende Familien in Mittel- und Enddarminhalt identifiziert, was mit der Detektion von Gärungsprodukten, die für *Clostridiaceae* (z. B. Butyrat) bzw. *Enterobacteriaceae* (z. B. Succinat und Formiat) charakteristisch sind, in Einklang steht. *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* sind sehr wahrscheinlich am Verbrauch von endogenen Sacchariden aus Mucus und pflanzlicher Biomasse im Verdauungstrakt beteiligt.

Literaturdaten von Studien an Regenwürmern und Daten aus dieser Arbeit unterstützen daher die Schlussfolgerungen, dass (a) sich die anaeroben Aktivitäten und assoziierte mikrobielle Gemeinschaften aufgrund wechselnder *in situ*-Bedingungen während der Passage durch den Verdauungstrakt des Regenwurms ändern und (b) Regenwürmer durch die anaeroben mikrobiellen Aktivitäten in ihrem Verdauungstrakt zum terrestrischen Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf beitragen.

4.7 Ausblick

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, umfassende Kenntnisse über die mikrobiellen Kohlenstoff- und Stickstofftransformationen im Verdauungstrakt des Regenwurms zu erhalten.

Die Untersuchung neuseeländischer Regenwürmer lieferte erstmalig Erkenntnisse über die N₂O-Emission von Regenwürmern der südlichen Hemisphäre. Es ist dringend erforderlich, die Untersuchungen zur N₂O-Emission durch Regenwürmer auf weitere phylogenetische Regenwurmfamilien und Kontinente auszuweiten, um die Zusammenhänge zwischen dem unterschiedlich stark ausgeprägten N₂O-Emissionspotential und den variierenden Parametern (z. B. körperliche Maße der Regenwürmer, Zusammensetzung der Mikrobiota im Verdauungstrakt und Bodenparameter) aufklären zu können.

Es wurden zahlreiche Hinweise gefunden, dass im Verdauungstrakt des Regenwurms aufgrund hoch aktiver Gärungsprozesse große Mengen an H₂ gebildet werden. Die H₂-Senken sind noch weitestgehend ungeklärt. Durch die Analyse von [Fe-Fe]- und [Ni-Fe]-Hydrogenasen und deren Transkripten aus dem Verdauungstrakt und aus angrenzendem Regenwurmgewebe könnten H₂-bildende und -verbrauchende Prokaryoten identifiziert und Hinweise auf deren Aktivität gewonnen werden.

Durch die Inkubation von Verdauungstraktinhalt mit ¹³C-markierter Glucose und anschließender Analyse der RNA wurden dominante Glucose-Verwerter des Regenwurmverdauungstrakts identifiziert. Der Einsatz von weiteren ¹³C-markierten Substraten (z. B. Fucose, Mannose oder Cellulose) in Inkubationsversuchen mit anschließender RNA-SIP würde zeigen, inwiefern neben *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* andere Taxa am Abbau organischer Substanz im Verdauungstrakt beteiligt sind. Der direkte Nachweis, dass tatsächlich der Mucus im Verdauungstrakt für die Aktivierung von aufgenommenen Bodenmikroorganismen verantwortlich ist, steht noch aus und könnte durch den Einsatz von ¹³C-markiertem Mucus erbracht werden. Dieser könnte durch die Anzucht von Regenwürmern auf sterilem Agar und Fütterung der Würmer mit ¹³C-markierter pflanzlicher Biomasse gewonnen werden. Nach Umsetzen der ¹³C-markierten Regenwürmer auf feldfrischen Boden würden diese den Boden und darin enthaltene Prokaryoten in den Verdauungstrakt aufnehmen. Abschließend könnten Mucus-verwertende Prokaryoten aus dem Verdauungstrakt über die RNA-SIP identifiziert werden, was erheblich zur Aufklärung des mikrobiellen Nahrungsnetzes im Regenwurmverdauungstrakt beitragen würde. Weiterhin könnte die Analyse der ¹³C-markierten Proteine über die Protein-SIP (Jehlich *et al.*, 2008) wichtige Informationen zu den Beziehungen zwischen der aktiven Darmmikrobiota und dem Regenwurm selbst liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Verdauungstrakt des Regenwurms ist eine einzigartige Mikrozone in belüfteten Böden, die (durch sauerstofffreie Bedingungen, einen nahezu neutralen pH-Wert, einen hohen Wassergehalt sowie hohe Konzentrationen an organischen Verbindungen) ideale Voraussetzungen für mit der Nahrung aufgenommene Bodenmikroorganismen bietet. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Emission von N_2O und N_2 durch europäische Regenwürmer (Familie *Lumbricidae*) v. a. auf die Aktivierung von Boden-Denitrifikanten zurückzuführen ist. Bisher ist nicht bekannt, ob die Emission von N_2O ein universelles Merkmal von Regenwürmern ist und ob dieses unabhängig von der taxonomischen Einordnung und geografischen Verbreitung der Würmer auftritt. Zudem ist nicht vollständig geklärt, welche Gärungsprozesse im Verdauungstrakt des Regenwurms relevant und welche gärenden Taxa dort aktiv sind. Weiterhin gibt es bislang kaum Erkenntnisse über die *in situ*-Bedingungen und die mikrobiellen Aktivitäten im Kropf und im Magen des Regenwurms.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es daher, die Fähigkeit zur N_2O -Emission bei vier neuseeländischen Regenwurmarten zu untersuchen sowie die Diversität potentieller Denitrifikanten in deren Verdauungstrakt und im jeweils umgebenden Boden zu bestimmen. Der zweite Teil dieser Arbeit zielte darauf ab, die *in situ*-Bedingungen entlang des Verdauungstrakts von *Lumbricus terrestris* (Familie *Lumbricidae*) zu charakterisieren und mit den mikrobiellen Kohlenstoff- und Stickstofftransformationen in Verbindung zu setzen sowie metabolisch aktive und Glucose-verwertende *Bacteria* im Verdauungstraktinhalt von *L. terrestris* zu identifizieren.

Die in Neuseeland eingeführten Arten *Lumbricus rubellus* und *Aporrectodea rosea* (beide Familie *Lumbricidae*) emittierten N_2O , während die eingeführte Art *Octolasion cyaneum* (Familie *Lumbricidae*) nur teilweise und die einheimische Art *Octochaetus multiporus* (Familie *Megascolecidae*) kein N_2O unter *in situ*-Bedingungen emittierten. In Gegenwart von Nitrit bzw. Nitrat und Acetylen (Acetylen inhibiert den letzten Schritt der Denitrifikation, d. h. die Umsetzung von N_2O zu N_2) waren die N_2O -Emissionen aller Regenwürmer erhöht. Dies zeigt, dass N_2O hauptsächlich durch Denitrifikation gebildet wurde. Das N_2O -Emissionspotential des einheimischen Wurms war deutlich schwächer ausgeprägt als das der eingeführten Würmer. Verdauungstrakte von *L. rubellus* und *O. multiporus* wiesen in Gegenwart von Nitrit und Acetylen eine starke N_2O -Bildung auf. Die Diversität der Denitrifikantenpopulationen in Verdauungstrakten und umgebenden Böden von *L. rubellus* und *O. multiporus* wurden anhand der Analyse von N_2O -Reduktasegenen (*nosZ*) bestimmt und verglichen. *NosZ* Sequenzen aus dem Verdauungstrakt von *L. rubellus* und *O. multiporus* waren sehr ähnlich zu *nosZ* Sequenzen aus den umgebenden Böden und

verwandt zu unkultivierten Bodenbakterien (z. B. *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Oligotropha*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* und *Sinorhizobium*).

N₂O und H₂ wurden von lebenden Würmern emittiert. *In situ*-Messungen mit Mikrosensoren zeigten, dass die Konzentrationen von Nitrat/Nitrit und NO an der Wurmoberfläche am höchsten waren und in einem radialen Transekt zum Verdauungstrakt hin abnahmen, während die Konzentrationen von N₂O und H₂ im Zentrum des Verdauungstrakts am höchsten waren. Höchste *in situ*-Konzentrationen von N₂O wurden im Kropf/Magen und im Enddarm detektiert, während H₂ im Vorder- und Mitteldarm höchste *in situ*-Konzentrationen aufwies. Analog dazu waren eine hohe N₂O-Bildung von Wurmabschnitten der Kropf/Magen- und Enddarmregion und eine hohe H₂-Bildung von Wurmabschnitten der Mitteldarmregion zu verzeichnen. Diese Ergebnisse deuten an, dass Denitrifikation vornehmlich im Kropf/Magen und Enddarm stattfindet, während H₂-freisetzende Gärungen im Vorder- und Mitteldarm dominieren.

In situ-Mikrosensormessungen wiesen darauf hin, dass der komplette Verdauungstrakt (vom Kropf/Magen bis zum Enddarm) sauerstofffrei ist. Das *in situ*-Redoxpotential lag im Verdauungstrakt zwischen -203 und +388 mV, wobei niedrigste Redoxpotentiale im Vorder- und Mitteldarm detektiert wurden. Wasser- und Proteingehalt sowie die Gehalte an Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff waren im Vorderdarm am höchsten und nahmen entlang des Darmkanals von anterior nach posterior ab. Die Konzentrationen von Nitrit, Ammonium und Eisen(II) waren im Kropf/Magen am höchsten und nahmen entlang des Verdauungstrakts von anterior nach posterior ab. Im Verdauungstraktinhalt kamen Saccharide und organische Säuren in hohen Konzentrationen vor. Kropf/Magen wiesen mit etwa 110 mmol Monosaccharidäquivalenten l (Wassergehalt)⁻¹ die höchste Konzentration an Sacchariden auf. Mannose, Glucose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Fucose waren dominante Monosaccharide und nahmen entlang des Verdauungstrakts ab. Propionat und Lactat wurden überwiegend im Kropf/Magen und Vorderdarm nachgewiesen, während Acetat, 2-Methylbutyrat und Butyrat hauptsächlich im Mittel- und Enddarm vorkamen. Die höchste Konzentration (insgesamt 32 mmol l [Wassergehalt]⁻¹) und auch die größte Diversität an organischen Säuren wurden im Mitteldarm nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Nahrung aufgenommene Mikroorganismen während der Passage durch den Verdauungstrakt sich ändernden *in situ*-Bedingungen ausgesetzt sind und unterstützen die Annahme, dass im Verdauungstrakt verschiedene anaerobe mikrobielle Prozesse in räumlicher und damit auch in zeitlicher Abfolge aktiv sind.

In anoxischen Inkubationen von Verdauungstraktinhalt mit dem Modellsubstrat Glucose wurden Gase (CO₂ und H₂) und lösliche organische Verbindungen (Ethanol, Acetat, Butyrat, Formiat, Lactat, Propionat und Succinat) gebildet, was auf die Aktivität verschiedener Gärungsprozesse im Verdauungstrakt hinweist. Mit Hilfe der 16S rRNA basierten Stablen-

Isotopenbeprobung wurden *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* als dominante Glucose-Verwerter des Regenwurmverdauungstrakts identifiziert. Weiterhin ergab die Analyse bakterieller 16S rRNA aus frisch entnommenem Mittel- und Enddarminhalt von *L. terrestris*, dass Vertreter der Phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* und *Verrucomicrobia* im Verdauungstrakt metabolisch aktiv waren. Auf Basis einer 16S rRNA Genähnlichkeit von < 87,5 % wurden 79 metabolisch aktive Familien detektiert, wovon 17 als neue Familien-ähnliche Gruppen definiert wurden.

Diese gesammelten Ergebnisse (a) bestätigen frühere Erkenntnisse, welche die Emission von N_2O und N_2 durch Regenwürmer auf aktive Denitrifikation in deren Verdauungstrakt zurückführen und (b) zeigen, dass die Fähigkeit zur N_2O -Emission auch bei Regenwürmern der südlichen Hemisphäre auftritt, jedoch bei Arten aus verschiedenen Regenwurmfamilien (d. h. *Megascolecidae* und *Lumbricidae*) unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Weiterhin wurde demonstriert, (c) dass diverse und teilweise noch unbekannte Taxa im Verdauungstrakt des Regenwurms metabolisch aktiv sind und über trophische Beziehungen miteinander in Verbindung stehen können, (d) dass *Clostridiaceae* und *Enterobacteriaceae* sehr wahrscheinlich an der Verwertung von Sacchariden aus Mucus und aufgenommener pflanzlicher Biomasse beteiligt sind und (e) dass in den Verdauungstrakt aufgenommene obligate Anaerobier und fakultative Aerobier gleichzeitig dieselbe Kohlenstoffquelle nutzen können.

Prozessorientierte Inkubationsversuche, *in situ*-Messungen mit Mikrosensoren, die Charakterisierung der *in situ*-Bedingungen entlang des Verdauungstrakts sowie die molekularbiologische Analyse der Glucose-verwertenden und denitrifizierenden Bakterien aus dem Verdauungstrakt legen die Schlussfolgerung nahe, dass Regenwürmer durch die anaeroben mikrobiellen Aktivitäten in ihrem Verdauungstrakt zum terrestrischen Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf in belüfteten Böden beitragen und eine bedeutende mobile Elektronenquelle (in Form von emittiertem H_2) für die Mikrobiota in diesen Böden darstellen.

6 SUMMARY

The earthworm alimentary canal is a unique microzone in aerated soils that has been proposed to selectively stimulate ingested soil microorganisms by its *in situ* conditions, which include anoxia, a near-neutral pH, high water contents, and high concentrations of organic compounds. Previous studies have documented the capacity of European earthworms (family *Lumbricidae*) to emit N_2O and N_2 , an activity attributed primarily to the activation of ingested soil denitrifiers. However, it is not known, whether the emission of N_2O is a general trait of earthworms independent of their taxonomic affiliation or geographic location. Fermentation processes and active fermentative taxa in the alimentary canal of earthworms are unresolved. Furthermore, relatively little is known about *in situ* conditions and microbial activities in the crop and gizzard of earthworms.

Thus, the central objectives of the first part of this work were to examine four different species of earthworms in New Zealand for their capacity to emit N_2O and to assess the diversity of potential denitrifiers in earthworm alimentary canals and in soils. The objectives of the second part of this study were to resolve potential links between *in situ* conditions and microbial carbon and nitrogen transformations during gut passage of *Lumbricus terrestris* (family *Lumbricidae*) and to identify metabolically active and glucose-consuming *Bacteria* in the alimentary canal content of *L. terrestris*.

In New Zealand, the introduced species *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea rosea* (family *Lumbricidae*) emitted N_2O , whereas emission of N_2O by the introduced species *Octolasion cyaneum* (family *Lumbricidae*) and the native species *Octochaetus multiporus* (family *Megascolecidae*) was variable and negligible, respectively. Exposing earthworms to nitrite or nitrate and acetylene (acetylene inhibits the last step in denitrification, i.e., the reduction of N_2O to N_2) significantly stimulated the amount of N_2O emitted, implicating denitrification as the primary source of N_2O . The native species displayed a lower capacity to emit N_2O than the introduced species. The alimentary canals derived from *L. rubellus* and *O. multiporus* displayed a high capacity to produce N_2O when supplemented with nitrite and acetylene. Analysis of the denitrifier populations in gut and soil by nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) revealed that *nosZ* sequences detected in the alimentary canals of *L. rubellus* and *O. multiporus* were similar to those retrieved from soil and were distantly related to uncultured soil bacteria and genera common to soils (i. e., *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Oligotropha*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, and *Sinorhizobium*).

Both N_2O and H_2 were emitted by living earthworms. *In situ* microsensor analyses revealed that concentrations of nitrate/nitrite and NO were highest at the worm surface and decreased towards the worm center, whereas concentrations of N_2O and H_2 were highest in the worm center. The highest N_2O concentrations occurred in crop/gizzard and hindgut

regions, whereas the highest H₂ concentrations occurred in foregut and midgut regions. Consistently, highest amounts of N₂O were produced by earthworm sections containing the crop/gizzard and the hindgut and highest amounts of H₂ were produced by earthworm sections containing the midgut. Thus, denitrification was more localized in crop/gizzard and hindgut, whereas H₂-producing fermentations dominated in foregut and midgut.

In situ microsensor analyses indicated that the complete alimentary canal (from the crop/gizzard to the hindgut) is anoxic. The *in situ* redox potential in the alimentary canal ranged between -203 and +388 mV with lowest redox potentials in foregut and midgut. Moisture content, total protein, total carbon, and total nitrogen were highest in the foregut and decreased from anterior to posterior of the gut. Nitrite, ammonium, and iron(II) were highest in the crop/gizzard and decreased from anterior to posterior of the alimentary canal. The alimentary canal contained high concentrations of saccharides and organic acids. Highest concentrations of saccharides (approximately 110 mmol monosaccharide equivalents l [water content]⁻¹) were detected in the crop/gizzard. Mannose, glucose, galactose, arabinose, rhamnose, and fucose were dominant monosaccharides and decreased along the alimentary canal. Propionate and lactate occurred primarily in the crop/gizzard and foregut, whereas acetate, 2-methylbutyrate and butyrate dominated in the midgut and hindgut. The highest concentration (in total 32 mmol l [water content]⁻¹) and highest diversity of organic acids were detected in the midgut. These data show that ingested microorganisms are exposed to changing *in situ* conditions, indicating that different anaerobic microbial activities occur spatially and consequently in temporal sequence in the alimentary canal.

In anoxic incubations of alimentary canal content, supplemental glucose yielded gases (CO₂ and H₂) and soluble organic compounds (ethanol, acetate, butyrate, formate, lactate, propionate and succinate), products indicative of diverse fermentations in the alimentary canal. By the use of 16S rRNA based stable isotope probing, *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* were identified as dominant utilizers of glucose-derived carbon in the earthworm alimentary canal. Based on the detection of 16S rRNA derived from fresh midgut and hindgut content of *L. terrestris*, active phyla in gut contents included *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, and *Verrucomicrobia*. Based on a 16S rRNA gene similarity cutoff of 87.5 %, 79 families were metabolically active, 17 of which were novel family-level groups.

These collective findings (a) corroborate previous findings that link the emission of N₂O and N₂ by earthworms to denitrification in the alimentary canal and (b) indicate that species from the southern hemisphere emit N₂O, but also implicate that species of different earthworm families (i. e., *Megascolecidae* vs. *Lumbricidae*) may not have equal capacities to

emit N₂O. Furthermore, the presented data (c) illustrate the large diversity of soil taxa that might be active and trophically linked during gut passage, (d) suggest that *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* might be capable of consuming mucus- and plant-derived saccharides during gut passage, and (e) indicate that ingested obligate anaerobes and facultative aerobes from soil can concomitantly metabolize the same source of carbon.

Microcosm experiments, *in situ* microsensor analyses, the characterization of the *in situ* conditions along the alimentary canal, and molecular analysis of the glucose-consuming and denitrifying bacteria from the alimentary canal suggest that earthworms contribute to terrestrial cycling of carbon and nitrogen in aerated soils via anaerobic microbial activities in the alimentary canal and constitute a mobile source of reductant (i. e., emitted H₂) for microbiota in these soils.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aira M, McNamara NP, Pearce TG, Dominguez J (2009). Microbial communities of *Lumbricus terrestris* L. middens: structure, activity, and changes through time in relation to earthworm presence. *Journal of Soils and Sediments* **9**: 54-61.
- Akila G, Chandra TS (2003). A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. *FEMS Microbiology Letters* **219**: 63-67.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Andersen K, Kjaer T, Revsbech NP (2001). An oxygen insensitive microsensor for nitrous oxide. *Sensors and Actuators B-Chemical* **81**: 42-48.
- Antranikian G (Hrsg.) (2006). *Angewandte Mikrobiologie*. Springer-Verlag: Berlin.
- Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter OM, van Spanning RJ (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1046-1078.
- Barois I, Lavelle P (1986). Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (*Glossoscolecidae*, *Oligochaeta*). *Soil Biology and Biochemistry* **18**: 539-541.
- Bassalik K (1913). Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. *Zeitschrift für Gärungsphysiologie* **2**: 1-32.
- Bauer S, Tholen A, Overmann J, Brune A (2000). Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Archives of Microbiology* **173**: 126-137.
- Baumann B, Snozzi M, Zehnder AJ, Van Der Meer JR (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *Journal of Bacteriology* **178**: 4367-4374.
- Bedmar EJ, Robles EF, Delgado MJ (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 141-144.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Naumann D, Suzuki K (2002). Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1441-1454.
- Berezina OV, Brandt A, Yarotsky S, Schwarz WH, Zverlov VV (2009). Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain: High level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new *Clostridium saccharobutylicum* isolate. *Systematic and Applied Microbiology* **32**: 449-459.
- Bergman EN (1990). Energy contributions of volatile fatty-acids from the gastrointestinal-tract in various species. *Physiological Reviews* **70**: 567-590.

- Bernadet JF, Bowman J (2006). The genus *Flavobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 7: New York. pp 481-531.
- Bernadet J-F, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandamme P (1996). Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 128-148.
- Bernadet JF, Nakagawa Y, Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1049-1070.
- Binnerup SJ, Jensen K, Revsbech NP, Jensen MH, Sørensen J (1992). Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with N and microsensor techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 303-313.
- Blachnik R (1998). *D'Ans Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, 4. Aufl, Bd 3. Springer Verlag: Berlin Heidelberg.
- Bleakley BH, Tiedje JM (1982). Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 1342-1348.
- Bolton PJ, Phillipson J (1976). Burrowing, feeding, egestion and energy budgets of *Allolobophora rosea* (Savigny) (*Lumbricidae*). *Oecologia* **23**: 225-245.
- Bonkowski M, Schaefer M (1997). Interactions between earthworms and soil protozoa: A trophic component in the soil food web. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 499-502.
- Borken W, Grundel S, Beese F (2000). Potential contribution of *Lumbricus terrestris* L. to carbon dioxide, methane and nitrous oxide fluxes from a forest soil. *Biology and Fertility of Soils* **32**: 142-148.
- Bothe H, Jost G, Schlöter M, Ward BB, Witzel K (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 673-690.
- Bott M (1997). Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Archives of Microbiology* **167**: 78-88.
- Bouché MB (1977). Stratégies lombriciennes. In: Lohm U und Persson T (eds). *Soil Organisms as Components of Ecosystems*, vol 25. Ecological Bulletin: Stockholm. pp 122-132.
- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3769-3775.
- Braker G, Tiedje JM (2003). Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3476-3483.

- Brenner DJ (1992). Introduction to the family *Enterobacteriaceae*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W und Schleifer KH (eds). *The Prokaryotes*, 2nd edn, vol 3. Springer Verlag: New York. pp 2673-2695.
- Brenner DJ, Farmer JJ (2005). Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR und Staley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 2. Springer: New York. pp 587-607.
- Breznak JA (1994). Acetogenesis from carbon dioxide in termite guts. In: Drake HL (ed). *Acetogenesis*. Chapman and Hall: New York. pp 303-330.
- Breznak JA, Switzer JM (1986). Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 623-630.
- Broda DM, Lawson PA, Bell RG, Musgrave DR (1999). *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1539-1550.
- Broda DM, Saul DJ, Lawson PA, Bell RG, Musgrave DR (2000). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 107-118.
- Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4801-4805.
- Brown GG (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity. *Plant and Soil* **170**: 209-231.
- Brown GG, Barois I, Lavelle P (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* **36**: 177-198.
- Brown GG, Edwards CA, Brussaard L (2004). How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In: Edwards CA (ed). *Earthworm Ecology, second edition*. CRC Press: Boca Raton. pp 13-50.
- Brune A (1998). Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends in Biotechnology* **16**: 16-21.
- Brune A (2006). Symbiotic associations between termites and prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 1. Springer: New York. pp 439-474.
- Buch W (1986). *Der Regenwurm im Garten*. Ulmer: Stuttgart.
- Buckel W (2005). Special clostridial enzymes and fermentation pathways. In: Dürre P (ed). *Handbook on Clostridia*. CRC-Press: Boca Raton. pp 122-220.
- Byzov BA, Nechitaylo TY, Bumazhkin BK, Kurakov AV, Golyshin PN, Zvyagintsev DG (2009). Culturable microorganisms from the earthworm digestive tract. *Microbiology* **78**: 360-368.
- Cabello P, Roldan MD, Moreno-Vivian C (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* **150**: 3527-3546.

- Cai S, Dong X (2010). *Cellulosilyticum ruminicola* gen. nov., sp. nov., isolated from the rumen of yak, and reclassification of *Clostridium lentocellum* as *Cellulosilyticum lentocellum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 845-849.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Young VL (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications on Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71-80.
- Chamkha M, Labat M, Patel BKC, Garcia JL (2001a). Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 2049-2054.
- Chamkha M, Patel BKC, Garcia J-L, Labat M (2001b). Isolation of *Clostridium bifermentans* from oil mill wastewaters converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of the species. *Anaerobe* **7**: 189-197.
- Chidthaisong A, Conrad R (2000). Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 73-86.
- Chin KJ, Rainey FA, Janssen PH, Conrad R (1998). Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 185-200.
- Chowdhury SP, Schmid M, Hartmann A, Tripathi AK (2009). Diversity of 16S rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. *European Journal of Soil Biology* **45**: 114-122.
- Citernesi U, Neglia R, Seritti A, Lepidi AA, Filippi C, Bagnoli G *et al* (1977). Nitrogen fixation in gastro-enteric cavity of soil animals. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 71-72.
- Clark LC, Jr., Wolf R, Granger D, Taylor Z (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology* **6**: 189-193.
- Clegg CD, Anderson JM, Lappin-scott HM, Vanelsas JD, Jolly JM (1995). Interaction of a genetically-modified *Pseudomonas fluorescens* with the soil-feeding earthworm *Octolasion cyaneum* (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 1423-1429.
- Coates JD, Councell T, Ellis DJ, Lovley DR (1998). Carbohydrate oxidation coupled to Fe(III) reduction, a novel form of anaerobic metabolism. *Anaerobe* **4**: 277-282.
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA *et al* (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* **31**: 442-443.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P *et al* (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 812-826.
- Condon S (1987). Responses of lactic-acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews* **46**: 269-280.
- Contreras E (1980). Studies on the intestinal actinomycete flora of *Eisenia lucens* (Annelida, Oligochaeta). *Pedobiologia* **20**: 411-416.

- Cuhel J, Simek M, Laughlin RJ, Bru D, Cheneby D, Watson CJ *et al* (2010). Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 1870-1878.
- Curry JP, Schmidt O (2007). The feeding ecology of earthworms - a review. *Pedobiologia* **50**: 463-477.
- Daniel O (1991). Leaf-litter consumption and assimilation by juveniles of *Lumbricus terrestris* L. (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) under different environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 202-208.
- Daniel SL, Drake HL (1993). Oxalate-dependent and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3062-3069.
- Darwin C (1881). *The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations of their habits*. Murray: London.
- Dastager SG, Lee J-C, Ju Y-J, Park D-J, Kim C-J (2008a). *Nocardioides halotolerans* sp. nov., isolated from soil on Bigeum Island, Korea. *Systematic and Applied Microbiology* **31**: 24-29.
- Dastager SG, Lee JC, Ju YJ, Park DJ, Kim CJ (2008b). *Microbacterium kribbense* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 2536-2540.
- de Man JC (1975). The probability of most probable numbers. *European Journal of Applied Microbiology* **1**: 67-78.
- Decaens T, Mariani L, Betancourt N, Jimenez JJ (2003). Seed dispersion by surface casting activities of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **24**: 175-185.
- Degelmann DM, Kolb S, Dumont M, Murrell JC, Drake HL (2009). *Enterobacteriaceae* facilitate the anaerobic degradation of glucose by a forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* **68**: 312-319.
- Depkat-Jakob PS (2009). Einfluss des Regenwurm-Ökotyps auf die Diversität und Aktivität von Nitratreduzierern im Regenwurmdarm: Funktionelle Genanalyse und gerichtete Isolierung. *Diplomarbeit*. Universität Bayreuth: Bayreuth.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6205-6214.
- Derakshani M, Lukow T, Liesack W (2001). Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 623-631.
- Devliegher W, Verstraete W (1996). *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: effects of nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) on the availability of plant nutrients and heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 489-496.

- Dickschen F, Topp W (1987). Feeding activities and assimilation efficiencies of *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae) on a plant-only diet. *Pedobiologia* **30**: 31-37.
- Dorofeeva LV, Evtushenko LI, Krausova VI, Karpov AV, Subbotin SA, Tiedje JM (2002). *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1917-1923.
- Dorofeeva LV, Krausova VI, Evtushenko LI, Tiedje JM (2003). *Agromyces albus* sp. nov., isolated from a plant (*Androsace* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1435-1438.
- Drake HL (1982). Demonstration of hydrogenase in extracts of the homoacetate-fermenting bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* **150**: 702-709.
- Drake HL, Gößner AS, Daniel SL (2008). Old acetogens, new light. In: Wiegel J, Maier RJ und Adams MWW (eds). *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels*. New York Academy of Sciences: Boston. pp 100-128.
- Drake HL, Horn MA (2006). Earthworms as a transient heaven for terrestrial denitrifying microbes: A review. *Engineering in Life Sciences* **6**: 261-265.
- Drake HL, Horn MA (2007). As the worm turns: The earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology* **61**: 169-189.
- Drake HL, Horn MA, Wüst PK (2009). Intermediary ecosystem metabolism as a main driver of methanogenesis in acidic wetland soil. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 307-318.
- Drake HL, Küsel K, Matthies C (2006). Acetogenic prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 354-420.
- Duke GE (1997). Gastrointestinal physiology and nutrition in wild birds. *Proceedings of the Nutrition Society* **56**: 1049-1056.
- Dumont MG, Murrell JC (2005). Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 499-504.
- Dürre P (2005). Formation of solvents in clostridia. In: Dürre P (ed). *Handbook on Clostridia*. CRC-Press: Boca Raton. pp 671-693.
- Ebert A, Brune A (1997). Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: a microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4039-4046.
- Edwards CA (ed.) (2004a). *Earthworm Ecology*. CRC Press: Boca Raton.
- Edwards CA (2004b). The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: Edwards CA (ed). *Earthworm Ecology, second edition*. CRC Press: Boca Raton. pp 3-11.
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*, 3rd edn. Chapman and Hall: London.

- Egert M, de Graaf AA, Maathuis A, de Waard P, Plugge CM, Smidt H *et al* (2007). Identification of glucose-fermenting bacteria present in an in vitro model of the human intestine by RNA-stable isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 126-135.
- Egert M, Friedrich MW (2003). Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2555-2562.
- Egert M, Marhan S, Wagner B, Scheu S, Friedrich MW (2004). Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (*Oligochaeta: Lumbricidae*). *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 187-197.
- Ehrlich GG, Goerlitz DF, Bourell JH, Eisen GV, Godsy EM (1981). Liquid chromatographic procedure for fermentation product analysis in the identification of anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 878-885.
- Eisenhauer N, Butenschoen O, Radsick S, Scheu S (2010). Earthworms as seedling predators: Importance of seeds and seedlings for earthworm nutrition. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1245-1252.
- Eisenhauer N, Schuy M, Butenschoen O, Scheu S (2009). Direct and indirect effects of endogeic earthworms on plant seeds. *Pedobiologia* **52**: 151-162.
- Engelhardt WV, Reckemmer G (1985). Colonic transport of short-chain fatty acids and the importance of microclimate. In: Skadhauge E und Heintz K (eds). *Intestinal Absorption and Secretion*. MTP Press: Lancaster. pp 93-101.
- Enwall K, Hallin S (2009). Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 145-148.
- Euzéby JP (2010). List of prokaryotic names with standing nomenclature. *Zugriff am 17.10.2010 unter <http://www.bacterio.cict.fr/number.html>*.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Dobrovolskaya TG, Streshinskaya GM, Subbotin SA, Tiedje JM (2001). *Agreia bicolorata* gen. nov., sp. nov., to accommodate actinobacteria isolated from narrow reed grass infected by the nematode *Heteroanguina graminophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 2073-2079.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, Cole JR, Tiedje JM (2000). *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 371-380.
- Evtushenko LI, Takeuchi M (2006). The family *Microbacteriaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 3. Springer: New York. pp 1020-1098.
- Ezaki T (2009). Genus I. Peptostreptococcus. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA *et al* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3. Springer: New York. pp 1008-1009.

- Ezaki T, Li N, Kawamura Y (2006). The anaerobic gram-positive cocci. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 4. Springer: New York. pp 795-808.
- Fardeau ML, Patel BK, Magot M, Ollivier B (1997). Utilization of serine, leucine, isoleucine, and valine by *Thermoanaerobacter brockii* in the presence of thiosulfate or *Methanobacterium* sp. as electron acceptors. *Anaerobe* **3**: 405-410.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fenner G (1931). Das Genauigkeitsmaß von Summen, Produkten und Quotienten der Beobachtungsreihe. *Die Naturwissenschaften* **19**: 310.
- Fischer K, Hahn D, Amann RI, Daniel O, Zeyer J (1995). *In situ* analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 666-673.
- Fischer K, Hahn D, Honerlage W, Zeyer J (1997). Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1149-1152.
- Flanagan DA, Gregory LG, Carter JP, Karakas-Sen A, Richardson DJ, Spiro S (1999). Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 263-270.
- Flint HJ (1997). The rumen microbial ecosystem - some recent developments. *Trends in Microbiology* **5**: 483-488.
- Focht DD, Chang AC (1975). Nitrification and denitrification processes related to waste water treatment. *Advances in Applied Microbiology* **19**: 153-186.
- Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, Berntsen T, Betts R, Fahey DW *et al* (2007). Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB *et al* (eds). *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. pp 129-234.
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME Journal* **1**: 19-27.
- Francis CA, Obraztsova AY, Tebo BM (2000). Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 543-548.
- Frey JC, Rothman JM, Pell AN, Nizeyi JB, Cranfield MR, Angert ER (2006). Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3788-3792.
- Friedrich MW (2006a). Stabile Isotopenbeprobung von Nukleinsäuren - ein Schlüssel zur Ökophysiologie nicht kultivierter Mikroorganismen. *Biospektrum* **1**: 39-40.
- Friedrich MW (2006b). Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 59-66.

- Fuchs G (Hrsg.) (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme: Stuttgart.
- Furlong MA, Singleton DR, Coleman DC, Whitman WB (2002). Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1265-1279.
- Gadkari D (1984). Influence of herbicides Goltix and Sencor on nitrification. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. **139**: 623-631.
- Garvin MH, Lattaud C, Trigo D, Lavelle P (2000). Activity of glycolytic enzymes in the gut of *Hormogaster elisae* (*Oligochaeta*, *Hormogastridae*). *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 929-934.
- Good IJ (1958). The population frequency of species and the estimation of the population parameters. *Biometrics* **40**: 237-246.
- Goodfellow M, Williams ST (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **37**: 189-216.
- Gößner AS, Küsel K, Schulz D, Trenz S, Acker G, Lovell CR *et al* (2006). Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus*. *Microbiology* **152**: 1209-1219.
- Gottschalk G (1986). *Bacterial metabolism*, 2nd edn. Springer: New York.
- Graff O (1971). Stickstoff, Phosphor und Kalium in der Regenwurmlosung auf der Wiesenversuchsfläche des Sollingprojektes. In: D'Aguilar J (ed). *IV Colloquium Pedobiologiae*. Institut National des Recherches Agricolles Publication: Paris. pp 503-511.
- Graff O (1983). *Unsere Regenwürmer*. M. & H. Schaper: Hannover.
- Graff O, Makeschin F (1980). Crop yield of rye grass influenced by the excretions of three earthworm species. *Pedobiologia* **20**: 176-180.
- Grant JD (1983). The activities of earthworms and the fates of seeds. In: Satchell JE (ed). *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*. Chapman and Hall: New York. pp 107-122.
- Gregory LG, Karakas-Sen A, Richardson DJ, Spiro S (2000). Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiology Letters* **183**: 275-279.
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5488-5491.
- Grimont PAD, Grimont F (2005). Genus XXIII. *Pantoea*. In: Brenner DJ, Krieg NR und Staley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 2. Springer: New York. pp 713-720.
- Hallin S, Lindgren PE (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1652-1657.

- Hamberger A, Horn MA, Dumont MG, Murrell JC, Drake HL (2008). Anaerobic consumers of monosaccharides in a moderately acidic fen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3112-3120.
- Hammes WP, Hertel C (2009). Genus I. *Lactobacillus*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA *et al* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3. Springer: New York. pp 465-511.
- Harrigan WF, Mc Cance ME (1966). *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press: London.
- Hartenstein F, Hartenstein E, Hartenstein R (1981). Gut load and transit time in the earthworm *Eisenia foetida*. *Pedobiologia* **22**: 5-20.
- Hartenstein R, Amico L (1983). Production and carrying-capacity for the earthworm *Lumbricus terrestris* in culture. *Soil Biology and Biochemistry* **15**: 51-54.
- Heck KL, Vanbelle G, Simberloff D (1975). Explicit calculation of rarefaction diversity measurement and determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**: 1459-1461.
- Hedderich R, Whitman WB (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing *Archaea*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 1050-1079.
- Hedley CB, Saggar S, Tate KR (2006). Procedure for fast simultaneous analysis of the greenhouse gases: methane, carbon dioxide, and nitrous oxide in air samples. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **37**: 1501-1510.
- Hendrix PF, Baker GH, Callahan MA, Damoff GA, Fragoso C, Gonzalez G *et al* (2006). Invasion of exotic earthworms into ecosystems inhabited by native earthworms. *Biological Invasions* **8**: 1287-1300.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5181-5189.
- Heran H (1956). Ein Beitrag zur Verdauungsphysiologie von *Lumbricus terrestris* L. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* **39**: 44-62.
- Hogan ME, Slaytor M, O'Brien RW (1985). Transport of volatile fatty-acids across the hindgut of the cockroach *Panesthia cribrata* Saussure and the termite, *Mastotermes darwiniensis* Froggatt. *Journal of Insect Physiology* **31**: 587-591.
- Holland SM (2003). Analytical Rarefaction 1.3. User's guide and application published at: <http://www.uga.edu/~strata/software/>.
- Horn MA (2004). Mikrobiologie der N₂O-Bildung im Darm von Regenwürmern (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). *Dissertation*. Universität Bayreuth: Bayreuth.
- Horn MA, Drake HL, Schramm A (2006a). Nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1019-1026.

- Horn MA, Ihssen J, Matthies C, Schramm A, Acker G, Drake HL (2005). *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1255-1265.
- Horn MA, Matthies C, Küsel K, Schramm A, Drake HL (2003a). Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 74-83.
- Horn MA, Mertel R, Gehre M, Kastner M, Drake HL (2006b). In vivo emission of dinitrogen by earthworms via denitrifying bacteria in the gut. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1013-1018.
- Horn MA, Schramm A, Drake HL (2003b). The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1662-1669.
- Honor SG, Mitchell MJ (1981). Effect of the earthworm *Eisenia foetida* (*Oligochaeta*) on fluxes of volatile carbon and sulfur-compounds from sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* **13**: 367-372.
- Hugenholtz P, Huber T (2003). Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 289-293.
- Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, Mallet M-P, Aragno M, Zopfi J (2010). Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME Journal* **4**: 450-454.
- Hungate RE (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris JR und Ribbons DW (eds). *Methods in Microbiology*. Academic Press: New York. pp 117-132.
- Hurlbert SH (1971). Nonconcept of species diversity - critique and alternative parameters. *Ecology* **52**: 577-586.
- Ihssen J, Horn MA, Matthies C, Gößner A, Schramm A, Drake HL (2003). N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1655-1661.
- Inwood SE, Tank JL, Bernot MJ (2007). Factors controlling sediment denitrification in midwestern streams of varying land use. *Microbial Ecology* **53**: 247-258.
- Jackson WA, Morse A, McLamore E, Wiesner T, Xia S (2009). Nitrification-denitrification biological treatment of a high-nitrogen waste stream for water-reuse applications. *Water Environment Research* **81**: 423-431.
- Janssen PH (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1719-1728.
- Janssen PH, Kirs M (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3619-3625.
- Janssen PH, Liesack W (1995). Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. *Archives of Microbiology* **164**: 29-35.

- 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*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2391-2396.
- Jehmlich N, Schmidt F, von Bergen M, Richnow HH, Vogt C (2008). Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME Journal* **2**: 1122-1133.
- Jetten MS (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* **10**: 2903-2909.
- Jetten MS, Cirpus I, Kartal B, van Niftrik L, van de Pas-Schoonen KT, Sliemers O *et al* (2005). 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions* **33**: 119-123.
- Jetten MS, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 283-288.
- Jolly JM, Lappinscott HM, Anderson JM, Clegg CD (1993). Scanning electron microscopy of the gut microflora of two earthworms - *Lumbricus terrestris* and *Octolasion cyaneum*. *Microbial Ecology* **26**: 235-245.
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**: 373-386.
- Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA, Janssen PH (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7210-7215.
- Judas M (1992). Gut content-analysis of earthworms (*Lumbricidae*) in a beechwood. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 1413-1417.
- Kalachniuk HI, Marounek M, Kalachniuk LH, Savka OH (1994). Rumen bacterial metabolism as affected by extracellular redox potential. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* **66**: 30-40.
- Kaldorf M, Linne von Berg KH, Meier U, Servos U, Bothe H (1993). The reduction of nitrous oxide to dinitrogen by *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **160**: 432-439.
- Kane MD (1997). Microbial fermentation in insect guts. In: Mackie RI, White BA und Isaacson RE (eds). *Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall: New York. pp 231-268.
- Kappler A, Brune A (2002). Dynamics of redox potential and changes in redox state of iron and humic acids during gut passage in soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 221-227.
- Karsten G (1997). Mikrobielle Populationen und Prozesse im Darm von Regenwürmern (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). *Dissertation*. Universität Bayreuth: Bayreuth.
- Karsten GR, Drake HL (1995). Comparative assessment of the aerobic and anaerobic microfloras of earthworm guts and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1039-1044.

- Karsten GR, Drake HL (1997). Denitrifying bacteria in the earthworm gastrointestinal tract and *in vivo* emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1878-1882.
- Kaspar HF, Tiedje JM (1981). Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen - nitrous oxide production and effect of acetylene. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 705-709.
- Kaspar HF, Tiedje JM, Firestone RB (1981). Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in digested sludge. *Canadian Journal of Microbiology* **27**: 878-885.
- Keis S, Shaheen R, Jones DT (2001). Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 2095-2103.
- Kelso B, Smith RV, Laughlin RJ, Lennox SD (1997). Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4679-4685.
- Kesik M, Blagodatsky S, Papen H, Butterbach-Bahl K (2006). Effect of pH, temperature and substrate on N₂O, NO and CO₂ production by *Alcaligenes faecalis* p. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 655-667.
- Khomyakov NV, Kharin SA, Nechitailo TY, Golyshin PN, Kurakov AV, Byzov BA *et al* (2007). Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. *Microbiology* **76**: 45-54.
- Knapp BA, Podmirseg SM, Seeber J, Meyer E, Insam H (2009). Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 2299-2307.
- Knapp BA, Seeber J, Podmirseg SM, Meyer E, Insam H (2008). Application of denaturing gradient gel electrophoresis for analysing the gut microflora of *Lumbricus rubellus* Hoffmeister under different feeding conditions. *Bulletin of Entomological Research* **98**: 271-279.
- Knowles R (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**: 43-70.
- Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 16263-16267.
- Köhler T, Stingl U, Meuser K, Brune A (2008). Novel lineages of *Planctomycetes* densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Environmental Microbiology* **10**: 1260-1270.
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Kopczynski ED, Bateson MM, Ward DM (1994). Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 746-748.
- Köpke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H, Sass H (2005). Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7819-7830.

- Krishnamoorthy RV, Vajranabhaiah SN (1986). Biological activity of earthworm casts - an assessment of plant growth promotor levels in the casts. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Animal Sciences* **95**: 341-351.
- Krištůfek V, Pižl V, Ravasz K (1995). Epifluorescent microscopy of earthworms' intestinal bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **42**: 39-44.
- Krištůfek V, Ravasz K, Pižl V (1992). Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 1499-1500.
- Krištůfek V, Ravasz K, Pižl V (1993). Actinomycete communities in earthworm guts and surrounding soil. *Pedobiologia* **37**: 379-384.
- Kuenen JG (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 320-326.
- Küsel K, Drake HL (1995). Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3667-3675.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E und Goodfellow M (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons: Chichester, England. pp 115-175.
- Larsen LH, Kjaer T, Revsbech NP (1997). A microscale NO₃⁻ biosensor for environmental applications. *Analytical Chemistry* **69**: 3527-3531.
- Lattaud C, Locati S, Mora P, Rouland C, Lavelle P (1998). The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Applied Soil Ecology* **9**: 189-195.
- Lavelle P, Bignell D, Lepage M, Wolters V, Roger P, Ineson P *et al* (1997). Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* **33**: 159-193.
- Lavelle P, Lattaud C, Trigo D, Barois I (1995). Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* **170**: 23-33.
- Lavelle P, Spain AV (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Laverack MS (1963). *The Physiology of Earthworms. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology.*, vol 15. MacMillan: New York.
- Lawson PA, Collins MD, Schumann P, Tindall BJ, Hirsch P, Labrenz M (2000). New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella lacustris* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 219-229.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1967). Biology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **21**: 71-100.
- Lee KE (1959a). *The earthworm fauna of New Zealand*, vol 130. R.E. Owen, Government Printer: Wellington.
- Lee KE (1959b). A key for the identification of New Zealand Earthworms. *Tuatara: Journal of the Biological Society* **8**: 13-60.

- Lee KE (1961). Interactions between native and introduced earthworms. *Proceedings of the New Zealand Ecological Society* **8**: 60-62.
- Lee KE (1985). *Earthworms. Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press: Sydney.
- Lee KE, Foster RC (1991). Soil fauna and soil structure. *Australian Journal of Soil Research* **29**: 745-775.
- Lemke T, van Alen T, Hackstein JHP, Brune A (2001). Cross-epithelial hydrogen transfer from the midgut compartment drives methanogenesis in the hindgut of cockroaches. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4657-4661.
- Li M, Yang H, Gu JD (2009). Phylogenetic diversity and axial distribution of microbes in the intestinal tract of the polychaete *Neanthes glandicincta*. *Microbial Ecology* **58**: 892-902.
- Li YT, Shetlar MR (1965). Glycosidases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **14**: 275-279.
- Liesack W, Weyland H, Stackebrandt E (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology* **21**: 191-198.
- Liu B, Morkved PT, Frostegard A, Bakken LR (2010). Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 407-417.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.
- Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.) (2006). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Louis P, Flint HJ (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters* **294**: 1-8.
- Lovley D (2006). Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 635-658.
- Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP (2004). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* **49**: 219-286.
- Lovley DR, Klug MJ (1982). Intermediary metabolism of organic matter in the sediments of a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 552-560.
- Ludwig W, Klenk H-P (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone DR und Castenholz RW (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 1. Springer: New York. pp 49-65.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB (2009). Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA *et al* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3. Springer: New York. pp 1-15.

- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J *et al* (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar *et al* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-1371.
- Lueders T, Manefield M, Friedrich MW (2004). Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**: 73-78.
- Lundie LL, Drake HL (1984). Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* **159**: 700-703.
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**: 67-72.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap P, Clark DP (2009). *Brock - Biology of Microorganisms*, 12th edn. Benjamin Cummings/ Prentice Hall International: Upper Saddle River.
- Mahmoud DAR, Mahmoud AA, Gomaa AM (2008). Antagonistic activities of potato associated bacteria via their production of hydrolytic enzymes with special reference to pectinases. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **4**: 575-584.
- Makeschin F (1997). Earthworms (*Lumbricidae: Oligochaeta*): important promoters of soil development and soil fertility. In: Benckiser G (ed). *Fauna in soil ecosystems*. Marcel Dekker: New York. pp 173-223.
- Malburg Jr. LM, Tamblyn Lee JM, Forsberg CW (1992). Degradation of cellulose und hemicelluloses by rumen microorganisms. In: Winkelmann G (ed). *Microbial Degradation of Natural Products*. VHC: Weinheim. pp 127-159.
- Mansell GP, Syers JK, Gregg PEH (1981). Plant availability of phosphorus in dead herbage ingested by surface-casting earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* **13**: 163-167.
- Márialigeti K (1979). Community-structure of the gut-microbiota of *Eisenia lucens* (*Annelida, Oligochaeta*). *Pedobiologia* **19**: 213-220.
- Marmur J, Doty P (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* **5**: 109-118.
- Marounek M, Roubal P, Bartos S (1987). The redox potential, rH and pH values in the gastrointestinal tract of small ruminants. *Physiologia Bohemoslovaca* **36**: 71-74.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW (2005a). Family I. *Aeromonadaceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR und Staley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 2. Springer: New York. p 556.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW (2005b). Genus I. *Aeromonas*. In: Brenner DJ, Krieg NR und Staley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 2. Springer: New York. pp 557-578.
- Martin A, Cortez J, Barois I, Lavelle P (1987). The production of intestinal mucus by earthworms - a key process in their interactions with the soil microflora. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* **24**: 549-558.

- Martin A, Mariotti A, Balesdent J, Lavelle P (1992). Soil organic matter assimilation by a geophagous tropical earthworm based on $\delta^{13}\text{C}$ measurements. *Ecology* **73**: 118-128.
- Matson PA, Vitousek PM, Livingston GP, Swanberg NA (1990). Sources of variation in nitrous oxide flux from Amazonian ecosystems. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **95**: 16789-16798.
- Matthies C, Griesshammer A, Schmittroth M, Drake HL (1999). Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N_2O) by earthworms obtained from garden and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3599-3604.
- McInerney MJ (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder AJB (ed). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons: New York. pp 373-416.
- McInerney MJ, Bryant MP (1981). Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. In: Sofer SS und Zaborsky OR (eds). *Biomass conversion processes for energy and fuels*. Plenum: New York. pp 277-296.
- McKellar RC, Sprott GD (1979). Solubilization and properties of a particulate hydrogenase from *Methanobacterium* strain G2R. *Journal of Bacteriology* **139**: 231-238.
- Meselson M, Stahl FW (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**: 671-682.
- Messing J (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* **101**: 20-78.
- Mishra PC, Dash MC (1980). Digestive enzymes of some earthworms. *Experientia* **36**: 1156-1157.
- Mortimer CE (2001). *Chemie - Das Basiswissen der Chemie*, 7. Aufl, Georg Thieme: Stuttgart.
- Müller HE, Brenner DJ, Fanning GR, Grimont PA, Kämpfer P (1996). Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp. nov., *Buttiauxella gaviniae* sp. nov., *Buttiauxella brennerae* sp. nov., *Buttiauxella izardii* sp. nov., *Buttiauxella noackiae* sp. nov., *Buttiauxella warmboldiae* sp. nov., *Kluyvera cochleae* sp. nov., and *Kluyvera georgiana* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 50-63.
- Müller N, Griffin BM, Stingl U, Schink B (2008). Dominant sugar utilizers in sediment of Lake Constance depend on syntrophic cooperation with methanogenic partner organisms. *Environmental Microbiology* **10**: 1501-1511.
- Mulongoy K, Bedoret A (1989). Properties of worm casts and surface soils under various plant covers in the humid tropics. *Soil Biology and Biochemistry* **21**: 197-203.
- Murray WD, Hofmann L, Campbell NL, Madden RH (1986). *Clostridium lentocellum* sp. nov., a cellulolytic species from river sediment containing paper-mill waste. *Systematic and Applied Microbiology* **8**: 181-184.
- Nandi R, Sengupta S (1998). Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Reviews in Microbiology* **24**: 61-84.

- Nanninga HJ, Gottschal JC (1985). Amino acid fermentation and hydrogen transfer in mixed cultures. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 261-269.
- Nechitaylo TY, Timmis KN, Golyshin PN (2009). 'Candidatus Lumbricincola', a novel lineage of uncultured Mollicutes from earthworms of family *Lumbricidae*. *Environmental Microbiology* **11**: 1016-1026.
- Nechitaylo TY, Yakimov MM, Godinho M, Timmis KN, Belogolova E, Byzov BA *et al* (2010). Effect of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* on bacterial diversity in soil. *Microbial Ecology* **59**: 574-587.
- Nentwig W, Bacher S, Beierkuhnlein C, Brandl R, Grabherr G (2004). *Ökologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Neufeld JD, Dumont MG, Vohra J, Murrell JC (2007). Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology* **53**: 435-442.
- Nisman B (1954). The Stickland reaction. *Bacteriological Reviews* **18**: 16-42.
- Nozaki M, Miura C, Tozawa Y, Miura T (2009). The contribution of endogenous cellulase to the cellulose digestion in the gut of earthworm (*Pheretima hilgendorfi*: *Megascolecidae*). *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 762-769.
- Oleynik AS, Byzov BA (2008). Response of bacteria to earthworm surface excreta. *Microbiology* **77**: 765-773.
- Omodeo P (1998). History of *Clitellata*. *Italian Journal of Zoology* **65**: 51 - 73.
- Palmer K, Drake HL, Horn MA (2009). Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5170-5174.
- Palmer K, Drake HL, Horn MA (2010). Association of novel and highly diverse acid-tolerant denitrifiers with N₂O fluxes of an acidic fen. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 1125-1134.
- Park M-J, Kim MK, Kim H-B, Im W-T, Yi T-H, Kim S-Y *et al* (2008). *Microbacterium ginsengisoli* sp. nov., a α -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 429-433.
- Parlé JN (1963a). Micro-organisms in intestines of earthworms. *Journal of General Microbiology* **31**: 1-11.
- Parlé JN (1963b). A microbiological study of earthworm casts. *Journal of General Microbiology* **31**: 13-22.
- Pedersen JC, Hendriksen NB (1993). Effect of passage through the intestinal-tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected gram-negative and total bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **16**: 227-232.
- Pester M, Brune A (2007). Hydrogen is the central free intermediate during lignocellulose degradation by termite gut symbionts. *ISME Journal* **1**: 551-565.
- Peters W, Walldorf V (1986). *Der Regenwurm Lumbricus terrestris L. Eine Praktikumsanleitung*. Quelle & Meyer Verlag: Heidelberg.

- Petri R, Imhoff JF (2000). The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and comparison of *narH* and 16S rDNA based phylogeny. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 47-57.
- Philippot L (2005). Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochemical Society Transactions* **33**: 200-204.
- Philippot L, Hallin S (2005). Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 234-239.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 6121-6128.
- Pearce TG, Roggero N, Tipping R (1994). Earthworms and seeds. *Journal of Biological Education* **28**: 195-202.
- Poth M, Focht DD (1985). N-kinetic analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier-denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1134-1141.
- Prauser H (1976). *Nocardioides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **26**: 58-65.
- Priest FG (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews* **41**: 711-753.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig WG, Peplies J *et al* (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**: 7188-7196.
- Rahemtulla F, Lovtrup S (1975). Comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides - III. *Oligochaeta* and *Hirudinea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B - Biochemistry and Molecular Biology* **50**: 627-629.
- Rainey FA, Hollen BJ, Small A (2009). Genus I. *Clostridium*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA *et al* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3. Springer: New York.
- Ravasz K, Zicsi A, Contreras E, Szell V, Szabo IM (1986). Über die Darmaktinomyceten-gemeinschaft einiger Regenwurmarten. *Opuscula Zoologica Budapest* **22**: 85-102.
- Ravinder T, Swamy MV, Seenayya G, Reddy G (2001). *Clostridium lentocellum* SG6 - a potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid. *Bioresource Technology* **80**: 171-177.
- Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW (2009). Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.
- Rechkemmer G, Ronnau K, von Engelhardt W (1988). Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A - Comparative Physiology* **90**: 563-568.

- Reichenbach H (1989). Order I. *Cytophagales* Leadbetter 1974. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N und Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st edn, vol 3. Williams and Wilkins: Baltimore. pp 2011-2013.
- Revsbech NP, Christensen PB, Nielsen LP, Sørensen J (1989). Denitrification in a trickling filter biofilm studied by a microsensor for oxygen and nitrous oxide. *Water Research* **23**: 867-871.
- Revsbech NP, Jørgensen BB (1986). Microelectrodes - their use in microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology*, vol 9. pp 293-352.
- Reynolds JW, Cook DC (1993). *Nomenclatura Oligochaetologica. Supplementum Tertium. A Catalogue of Names, Descriptions and Type Specimens of the Oligochaeta*. New Brunswick Museum Monographic Series: New Brunswick.
- Rich JJ, Heichen RS, Bottomley PJ, Cromack K, Jr., Myrold DD (2003). Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5974-5982.
- Richardson DJ, van Spanning RJM, Ferguson SJ (2007). The prokaryotic nitrate reductases. In: Bothe H, Ferguson SJ und Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier: Amsterdam. pp 21-35.
- Rinaldo S, Cutruzzolà F (2007). Nitrite reductases in denitrification. In: Bothe H, Ferguson SJ und Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier: Amsterdam. pp 37-55.
- Rizhiya E, Bertora C, van Vliet PCJ, Kuikman PJ, Faber JH, van Groenigen JW (2007). Earthworm activity as a determinant for N₂O emission from crop residue. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 2058-2069.
- Rogers TE, Doran-Peterson J (2010). Analysis of cellulolytic and hemicellulolytic enzyme activity within the *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae) larval gut and characterization of *Crocebacterium ilecola* gen. nov., sp. nov., isolated from the *Tipula abdominalis* larval hindgut. *Insect Science* **17**: 291-302.
- Rösch C, Mergel A, Bothe H (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3818-3829.
- Rowell DL (1981). Oxidation and reduction. In: Greenland DJ und Hayes MHB (eds). *The Chemistry of Soil Processes*. John Wiley and Sons: Chichester. pp 401-462.
- Rudolf M, Kroneck PMH (2005). The nitrogen cycle: its biology. In: Sigel A, Sigel H und Sigel RKO (eds). *Biogeochemical Cycles of Elements - Metal Ions in Biological Systems*, vol 43. Taylor and Francis: Boca Raton. pp 75-103.
- Russell JB, Moselio S (2009). Rumen. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press: Oxford. pp 163-174.
- Sachs L (1999). *Angewandte Statistik*. Springer: Berlin.
- Saddler JN, Yu EKC, Meshartree M, Levitin N, Brownell HH (1983). Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 153-160.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saitou N, Nei M (1987). The Neighbor-Joining Method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor: New York.
- Sameshima-Saito R, Chiba K, Hirayama J, Itakura M, Mitsui H, Eda S *et al* (2006). Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2526-2532.
- Sampedro L, Jeannotte R, Whalen JK (2006). Trophic transfer of fatty acids from gut microbiota to the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2188-2198.
- Sampedro L, Whalen JK (2007). Changes in the fatty acid profiles through the digestive tract of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Applied Soil Ecology* **35**: 226-236.
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1998). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters* **162**: 61-68.
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1999). Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1681-1687.
- Schaefer M (2000). *Brohmer, Fauna von Deutschland: ein Bestimmungsbuch unserer heimischen Tierwelt*, 20th edn. Quelle & Meyer Verlag: Wiebelsheim.
- Scheffer F, Schachtschabel P (2002). *Lehrbuch der Bodenkunde*, 15th edn. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Schellenberger S, Kolb S, Drake HL (2010). Metabolic responses of novel cellulolytic and saccharolytic agricultural soil *Bacteria* to oxygen. *Environmental Microbiology* **12**: 845-861.
- Scheu S (1987). Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (*Lumbricidae*). *Biology and Fertility of Soils* **5**: 230-234.
- Scheu S (1991). Mucus excretion and carbon turnover of endogenic earthworms. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 217-220.
- Schiller M, von der Heydt H, Marz F, Schmidt PC (2002). Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts. *Journal of Chromatography A* **968**: 101-111.
- Schink B, Pfennig N (1982). *Propionigenium modestum*; gen. nov. sp. nov. a new strictly anaerobic, nonsporing bacterium growing on succinate. *Archives of Microbiology* **133**: 209-216.
- Schlegel HG, Jannasch HW (2006). Prokaryotes and their habitats. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 1. Springer: New York. pp 137-184.

- Schlesner H (1994). The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. *Systematic and Applied Microbiology* **17**: 135-145.
- Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.
- Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten M *et al* (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 93-106.
- Schmitt-Wagner D, Friedrich MW, Wagner B, Brune A (2003). Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of *Bacteria* in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6007-6017.
- Schönholzer F, Hahn D, Zarda B, Zeyer J (2002). Automated image analysis and *in situ* hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *Journal of Microbiological Methods* **48**: 53-68.
- Schönholzer F, Hahn D, Zeyer J (1999). Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 235-248.
- Schramm A (2003). *In situ* analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal* **20**: 313-333.
- Schramm A (2006). Microsensors for the study of microenvironments and processes in the intestine of invertebrates. In: König H und Varma A (eds). *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*, vol 6. Springer: Heidelberg. pp 463-473.
- Schramm A, Santegoeds CM, Nielsen HK, Ploug H, Wagner M, Pribyl M *et al* (1999). On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4189-4196.
- Schreiber F, Polerecky L, de Beer D (2008). Nitric oxide microsensor for high spatial resolution measurements in biofilms and sediments. *Analytical Chemistry* **80**: 1152-1158.
- Schultz JE, Breznak JA (1978). Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. *Applied and Environmental Microbiology* **35**: 930-936.
- Schwartz E, Friedrich B (2006). The H₂-metabolizing prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 496-563.
- Shapleigh JP (2006). The denitrifying prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 769-792.
- Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J (1992). Denitrification by Fungi. *FEMS Microbiology Letters* **94**: 277-281.

- Shoun H, Tanimoto T (1991). Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 11078-11082.
- Simek M, Cooper JE (2002). The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *European Journal of Soil Science* **53**: 345-354.
- Simon J (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 285-309.
- Singleton DR, Hendrix PF, Coleman DC, Whitman WB (2003). Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*; *Oligochaeta*). *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1547-1555.
- Skinner FA (1975). Anaerobic bacteria and their activities in soil. In: Walker N (ed). *Soil Microbiology*. Butterworth: London. pp 1-19.
- Slepecky RA, Hemphill HE (2006). The genus *Bacillus* - nonmedical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 4. Springer: New York. pp 530-562.
- Smith MS (1983). Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 1545-1547.
- Sneath PHA (ed.) (1991). *Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci*. Williams and Wilkins: Baltimore.
- Song L, Li W-J, Wang Q-L, Chen G-Z, Zhang Y-S, Xu L-H (2005). *Jiangella gansuensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from a desert soil in north-west China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 881-884.
- Sørensen J (1978). Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in a coastal marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **35**: 301-305.
- Springett JA (1992). Distribution of lumbricid earthworms in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 1377-1381.
- Springett JA, Gray RAJ, Barker DJ, Lambert MG, Mackay AD, Thomas VJ (1998). Population density and distribution of the New Zealand indigenous earthworm *Octochaetus multiporus* (*Megascolecidae*: *Oligochaeta*) in hill pastures. *New Zealand Journal of Ecology* **22**: 87-93.
- Stackebrandt E, Cummins CS, Johnson JL (2006). Family *Propionibacteriaceae*: the genus *Propionibacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 3. Springer: New York. pp 400-418.
- Stackebrandt E, Evers J (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**: 152-155.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.

- Stackebrandt E, Schaal KP (2006). The family *Propionibacteriaceae*: The genera *Friedmanniella*, *Luteococcus*, *Microlunatus*, *Micropruina*, *Propioniferax*, *Propionimicrobium* and *Tessarococcus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 3. Springer: New York. pp 383-399.
- Stackebrandt E, Schumann P (2006). Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W und Schleifer KH (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 3. Springer: New York. pp 297-321.
- Stevens RJ, Laughlin RJ, Malone JP (1998). Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and dinitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 1119-1126.
- Stolz JF, Basu P (2002). Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. *Chembiochem* **3**: 198-206.
- Storch V, Welsch U (1999). *Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum*, 23. Aufl, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Storch V, Welsch U (2004). *Systematische Zoologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Stres B, Mahne I, Avgustin G, Tiedje JM (2004). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 301-309.
- Strohm TO, Griffin B, Zumft WG, Schink B (2007). Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1420-1424.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT *et al* (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.
- Tadonlécé RD (2007). Strong coupling between natural *Planctomycetes* and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 543-555.
- Taguchi F, Chang JD, Mizukami N, Saitotaki T, Hasegawa K, Morimoto M (1993). Isolation of a hydrogen-producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites. *Canadian Journal of Microbiology* **39**: 726-730.
- Takaya N, Kuwazaki S, Adachi Y, Suzuki S, Kikuchi T, Nakamura H *et al* (2003). Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biochemistry* **133**: 461-465.
- Tamura H, Goto K, Yotsuyan.T, Nagayama M (1974). Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-phenanthroline in presence of large amounts of iron(III). *Talanta* **21**: 314-318.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Teuber M, Geis A, Neve H (1992). The genus *Lactococcus*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin MM, Harder W und Schleifer KH (eds). *The Prokaryotes*, 2nd edn, vol 2. Springer: New York. pp 1482-1501.

- Thakuria D, Schmidt O, Finan D, Egan D, Doohan FM (2010). Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *ISME Journal* **4**: 357-366.
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**: 100-180.
- Tholen A, Schink B, Brune A (1997). The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 137-149.
- Thomsen JK, Geest T, Cox RP (1994). Mass-spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 536-541.
- 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 Microbiology Ecology* **49**: 401-417.
- Tiedje JM (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder AJB (ed). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons: New York. pp 179-243.
- Tillinghast EK, O'Donnell R, Eves D, Calvert E, Taylor J (2001). Water-soluble luminal contents of the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and their physiological significance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A - Molecular and Integrative Physiology* **129**: 345-353.
- Tiwari SC, Tiwari BK, Mishra RR (1989). Microbial populations, enzyme activities and nitrogen-phosphorus-potassium enrichment in earthworm casts and in the surrounding soil of a pineapple plantation. *Biology and Fertility of Soils* **8**: 178-182.
- Toyota K, Kimura M (2000). Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 187-190.
- Tracey MV (1951). Cellulase and chitinase of earthworms. *Nature* **167**: 776-777.
- Tretyakova EB, Dobrovolskaya TG, Byzov BA, Zvyagintsev DG (1996). Bacterial communities associated with soil invertebrates. *Microbiology* **65**: 91-97.
- Trigo D, Barois I, Garvin MH, Huerta E, Irisson S, Lavelle P (1999). Mutualism between earthworms and soil microflora. *Pedobiologia* **43**: 866-873.
- Tsutsuki K, Kuwatsuka S (1979). Chemical studies on soil humic acids. VII. pH dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition* **25**: 373-384.
- Unisense AS (2010). Manual profiling set-up. *Zugriff am 17.10.2010 unter <http://www.unisense.com/Default.aspx?ID=725>*.
- Urbášek F (1990). Cellulase activity in the gut of some earthworms. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* **27**: 21-28.
- Urbášek F, Chalupsky J (1991). Activity of digestive enzymes in 4 species of *Enchytraeidae* (*Oligochaeta*). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* **28**: 145-154.

- Urbášek F, Pižl V (1991). Activity of digestive enzymes in the gut of 5 earthworm species (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). *Revue d'Ecologie et de biologie du sol* **28**: 461-468.
- Van Spanning RJM, Richardson DJ, Ferguson SJ (2007). Introduction to the biogeochemistry and molecular biology of denitrification. In: Bothe H, Ferguson SJ und Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier: Amsterdam. pp 3-20.
- Vanhooren PD, Vandamme EJ (1999). L-fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **74**: 479-497.
- Velghe N, Claeys A (1985). Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral waters with resorcinol. *Analyst* **110**: 313-314.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF *et al* (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 495-548.
- Vu AT, Nguyen NC, Leadbetter JR (2004). Iron reduction in the metal-rich guts of wood-feeding termites. *Geobiology* **2**: 239-247.
- Wallwork JA (1983). *Studies in Biology no. 161: Earthworm Biology*. Edward Arnold: London.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5261-5267.
- Wang YM, Zhang ZS, Xu XL, Ruan JS, Wang Y (2001). *Actinopolymorpha singaporensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 467-473.
- Ward N, Staley JT, Fuerst JA, Giovannoni S, Schlesner H, Stackebrandt E (2006). The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 7. Springer: New York. pp 757-793.
- Warnick TA, Methe BA, Leschine SB (2002). *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1155-1160.
- Weier KL, Gilliam JW (1986). Effect of acidity on denitrification and nitrous oxide evolution from Atlantic coastal plain soils. *Soil Science Society of America Journal* **50**: 1202-1205.
- Westheide W, Rieger R (Hrsg.) (2007). *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag: München.
- Whalen JK, Janzen HH (2002). Labeling earthworms uniformly with ¹³C and ¹⁵N: implications for monitoring nutrient fluxes. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1913-1918.
- Whiley RA, Hardie JM (2009). Genus I. *Streptococcus*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA *et al* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3. Springer: New York. pp 655-711.
- White D (2007). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*, 3rd edn. Oxford University Press: New York.

- Whiteley AS, Thomson B, Lueders T, Manefield M (2007). RNA stable-isotope probing. *Nature Protocols* **2**: 838-844.
- Whitman BW, Bowe TL, Boone DR (2006). The methanogenic bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 2. Springer: New York. pp 165-207.
- Wiegel J, Tanner R, Rainey FA (2006). An introduction to the family *Clostridiaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 4. Springer: New York. pp 654-678.
- Winkelmann G (ed.) (1992). *Microbial Degradation of Natural Products*. VCH: Weinheim.
- Witty JF (1991). Microelectrode measurements of hydrogen concentrations and gradients in legume nodules. *Journal of Experimental Botany* **42**: 765-771.
- Wolter C, Scheu S (1999). Changes in bacterial numbers and hyphal lengths during the gut passage through *Lumbricus terrestris* (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*). *Pedobiologia* **43**: 891-900.
- Wuebbles DJ (2009). Nitrous oxide: no laughing matter. *Science* **326**: 56-57.
- Wüst PK, Horn MA, Drake HL (2009). Trophic links between fermenters and methanogens in a moderately acidic fen soil. *Environmental Microbiology* **11**: 1395-1409.
- Xing D, Ren N, Rittmann BE (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1232-1239.
- Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer KH *et al* (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology* **31**: 241-250.
- Yoon J-H, Park Y-H (2006). The genus *Nocardioides*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H und Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol 3. Springer: New York. pp 1099-1113.
- Yoon J-H, Schumann P, Kang S-J, Lee C-S, Lee S-Y, Oh T-K (2009). *Microbacterium insulae* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 1738-1742.
- Yoshinari T, Knowles R (1976). Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **69**: 705-710.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**: 203-214.
- Zhu G, Jetten MS, Kusch P, Ettwig KF, Yin C (2010). Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1043-1055.
- Zimmerman PR, Greenberg JP, Wandiga SO, Crutzen PJ (1982). Termites: a potentially large source of atmospheric methane, carbon dioxide, and molecular hydrogen. *Science* **218**: 563-565.

- Zinder SH (1993). Physiological ecology of methanogens. In: Ferry JG (ed). *Methanogenesis*. Chapman and Hall: New York. pp 128-206.
- Zumft WG (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.
- Zumft WG, Körner H (2007). Nitrous oxide reductases. In: Bothe H, Ferguson SJ und Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier: Amsterdam. pp 67-81.
- Zumft WG, Kroneck PMH (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. *Advances in Microbial Physiology* **52**: 107-227.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Harold L. Drake für die Überlassung des interessanten Themas, die zahlreichen Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Marcus A. Horn für die hervorragende Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Ökologische Mikrobiologie in Bayreuth und des Instituts für Molekulare Biowissenschaften in Palmerston North sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Prof. Dr. Bernd Rehm von der Massey Universität in Palmerston North möchte ich herzlich für seine Gastfreundschaft und Unterstützung danken. Weiterhin danke ich Dr. Masha Minor von der Massey University für die Standortinformationen sowie Dr. Gemma Henderson und Dr. Peter Janssen der AgResearch Ltd. für die Durchführung der HPLC-Analysen in Palmerston North. Oliver Schmidt sei für die tatkräftige Unterstützung bei den Probenahmen gedankt.

Dr. Frank Schreiber vom Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen danke ich für die Bereitstellung der NO-Mikrosensoren und die Einweisung in die Mikrosensoranalytik.

Prof. Dr. Matthias W. Lorenz des Lehrstuhls für Tierökologie I in Bayreuth danke ich für die Bereitstellung der HPLC-PAD und die Einweisung in die Saccharid-Analyse. Dem Team der Zentralen Analytik in Bayreuth sei herzlich für die Durchführung vieler chemischer Analysen gedankt. Mein Dank gilt weiterhin den Technischen Angestellten Anita Gößner, Ralf Mertel und Daria Schulz für die Auskunft und Hilfestellung im Labor sowie Daria Schulz für die Unterstützung bei einigen Versuchen zu Beginn meiner Promotionszeit. Peter Depkat-Jakob danke ich für seine große Hilfsbereitschaft bei Probenahmen und Regenwurmsektionen.

Melanie Jonak, Andreas Kaul, Stefanie Schellenberger und Annika Wüst möchte ich für das sorgfältige Korrekturlesen danken. Ganz herzlich danke ich Andreas Kaul für die Hilfe bei der Bewältigung von „Formatierungsproblemen“ und den Rückhalt während der Erstellung dieser Arbeit. Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die jahrelange Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegenbrachten.

Abschließend danke ich der Universität Bayreuth (insbesondere der Frauenbeauftragten), der Massey Universität und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Promotionsprojekts.

9 PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf Tagungen vorgestellt und in drei Publikationen und einem Mini-Review veröffentlicht. Ein weiteres Manuskript ist in Vorbereitung.

9.1 Tagungsbeiträge

9.1.1 Vorträge

Vorträge über Ergebnisse dieser Arbeit:

Wüst PK, Horn, MA, Drake, HL (2009). Earthworms contribute to the terrestrial cycling of carbon and nitrogen via fermentation and denitrification in the alimentary canal. BayCeer Workshop 2009, Abstract Book. Abstract O1.6, p. 8.

Wüst PK, Drake, HL, Horn, MA (2009). Concomitant fermentation and denitrification along the earthworm alimentary canal. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract KG05, p. 62.

9.1.2 Poster

Poster über Ergebnisse dieser Arbeit:

Wüst PK, Horn, MA, Drake, HL (2010). *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in gut contents of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Abstracts of the 13th International Symposium on Microbial Ecology. Abstract PS.25.O16 (auf Datenträger).

Wüst PK, Horn, MA, Drake, HL (2010). Active fermenters in the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract HMP43, p. 151.

Depkat-Jakob, PS, Wüst PK, Horn, MA, Drake, HL (2010). Denitrifiers differ in the alimentary canals of the earthworms *Octochaetus multiporus* (*Megascolecidae*) and *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*). Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract HMP19, p. 145.

Wüst PK, Horn, MA, Drake, HL (2008). Competition between denitrifiers and fermenters during gut passage in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Abstracts of the 12th International Symposium on Microbial Ecology. Abstract 0346 (auf Datenträger).

Wüst PK, Drake, HL, Horn, MA (2008). Anaerobic activities and in situ N₂O concentrations along the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract PG38, p. 131.

Weitere Poster:

Wüst PK, Drake, HL, Horn, MA (2007). Structure-function relationship of anaerobic prokaryotes in an acidic fen. International Symposium on Soil Processes under Extreme Meteorological Conditions, Abstract Book. Abstract 3, p. 55.

Wüst PK, Drake, HL, Horn, MA (2007). Structure function relationships of acid tolerant fermenters in a temperate acidic fen. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract PF52, p. 127.

Wüst, P, Drake, HL, Horn, MA (2006). Anaerobic food chain in an acidic low bog peat: fermentation activities and their relevance for methanogenesis. Abstracts of the 11th International Symposium on Microbial Ecology, Abstract 1654, p. 305.

Wüst, P, Horn, MA, Drake, HL (2006). Fermentation activities and their relevance for methanogenesis in an acidic low peat bog. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, *Biospektrum*. Abstract E41, p. 142.

9.2 Primärliteratur und Übersichtsartikel

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System veröffentlicht:

Schmidt, O, Wüst, PK, Hellmuth, S, Borst, K, Horn, MA, Drake, HL (2011). Novel [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenase gene transcripts indicative of active facultative aerobes and obligate anaerobes in earthworm gut contents. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 5842-5850.

Wüst, PK, Horn, MA, Drake, HL (2011). *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in earthworm gut content. *ISME Journal* **5**: 92-106.

Horn, MA, Wüst, PK, Drake, HL (2009). Der Regenwurmdarm - ein mobiles Schlaraffenland für Bodenanaerobier. *Biospektrum* **4**: 377-379.

Wüst, PK, Horn, MA, Henderson, G, Janssen, PH, Rehm, BHA, and Drake, HL (2009). Gut-associated denitrification and *in vivo* emission of nitrous oxide by the earthworm families *Megascolecidae* and *Lumbricidae* in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3430-3436.

Wüst, PK, Horn, MA, and Drake, HL (2009). *In situ* hydrogen and nitrous oxide as indicators of concomitant fermentation and denitrification in the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1852-1859.

Eine weitere Veröffentlichung zu Ergebnissen dieser Arbeit befindet sich in Vorbereitung:

Depkat-Jakob, PS, Wüst, PK, Horn, MA, Drake, HL (2011). Denitrifier communities in the alimentary canals of the earthworms *Octochaetus multiporus* (*Megascolecidae*) and *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*) are dissimilar. *Applied and Environmental Microbiology*. In Preparation.

Weitere Veröffentlichungen:

Drake, HL, Horn, MA, Wüst, PK (2009). Intermediary ecosystem metabolism as a main driver of methanogenesis in acidic wetland soil. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 307-318.

Wüst, PK, Horn, MA, and Drake, HL (2009). Trophic links between fermenters and methanogens in a moderately acidic fen soil. *Environmental Microbiology* **11**: 1395-1409.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Weiterhin versichere ich, dass ich bei keiner anderen Universität ein Promotionsgesuch eingereicht oder eine Dissertation begonnen habe.

Bayreuth, den 23.12.2010