

Mikrobiologie der Stickstoffentfernung in den Biofiltern einer marinen Aquakultur mit geschlossenem Wasserkreislauf

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Bärbel U. Fösel,
geb. Krieger

Bayreuth, August 2007

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2003 bis August 2007 am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Harold L. Drake angefertigt. Ein Teil der experimentellen Arbeit wurde am Department of Microbiology der Universität Århus durchgeführt.

Ermöglicht wurde die Arbeit mit Mitteln der German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development (GIF Grant. No. I-732 –165.8/2001) sowie Geldern der Universitäten Bayreuth und Århus.

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

Promotionsgesuch eingereicht am: 22.08.2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 18.07.2008

Prüfungsausschuss:

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

Prof. Dr. O. Meyer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. S. Peiffer (Vorsitzender)

Prof. Dr. G. Rambold

Prof. Dr. K. Dettner

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Aquakultur.....	1
1.1.1 Derzeitige und zukünftige Bedeutung	1
1.1.2 Ökologische Auswirkungen.....	1
1.1.3 Möglichkeiten und Erfordernisse geschlossener Systeme	2
1.2 Der Stickstoffkreislauf und seine Bedeutung.....	5
1.2.1 Nitrifikation	6
1.2.1.1. Reaktionen	6
1.2.1.2 Verantwortliche Organismengruppen	7
1.2.1.3 Untersuchung von Nitrifikantengemeinschaften in der Umwelt	9
1.2.2 Nitratreduzierende Prozesse	10
1.2.2.1 Assimilatorische Nitratreduktion	10
1.2.2.2 Dissimilatorische Nitratreduktion	11
1.2.2.2.1 Denitrifikation	11
1.2.2.2.2 DNRA.....	21
1.2.2.2.3 Molekularbiologische Untersuchung von Nitratreduzierern und Denitrifikanten	22
1.2.3 Anammox	23
1.3 Stickstoffentfernung in (marinen) Aquakultursystemen.....	24
1.3.1 Pilot-System in Rehovot.....	24
1.3.2 Nitrifikation	25
1.3.2.1 Anforderungen an die Nitrifikantengemeinschaft	25
1.3.2.2 Wissen über Nitrifikanten in Biofiltern zur Abwasserbehandlung.....	26
1.3.3 Denitrifikation	27
1.3.3.1 Notwendigkeit der Nitratentfernung in geschlossenen Systemen.....	27
1.3.3.2 Wissen über Denitrifikanten in Biofiltern zur Abwasserbehandlung.....	28
1.3.4 Wechselwirkungen zwischen N- und S-Kreislauf unter anaeroben Bedingungen.....	30
1.4 Zielsetzungen.....	32
1.4.1 Nitrifikation	32
1.4.2 Nitratreduzierende Prozesse	33

2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 Pilot-System mit vollständigem Wasserrecycling	34
2.1.1 TF	35
2.1.2 DB	36
2.1.3 FBR.....	38
2.2 Probennahme und -aufbereitung	38
2.2.2 Material für DNA-Extraktion und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	38
2.2.2.1 TF	38
2.2.2.2 DB und FBR	39
2.2.3 Kultivierung von nitratreduzierenden und denitrifizierenden Mikroorganismen.....	39
2.2.4 Wasserproben.....	39
2.2.5 ¹⁵ N-Tracerexperimente	40
2.3 Analytische Methoden	40
2.3.1 Gase	40
2.3.2 Organische Säuren, Zucker, Aminosucker und Alkohole	42
2.3.3 Anorganische Ionen	43
2.3.3.1 Nitrat	43
2.3.3.2 Nitrit	43
2.3.3.3 Ammonium	43
2.3.3.4 Lösliches Eisen(II).....	44
2.3.3.5 Sulfat	44
2.3.3.6 Sulfid	44
2.4 Mikrosensormessungen	45
2.4.1 Inkubationsbedingungen	45
2.4.2 Messung und Berechnung	45
2.5 Inkubationsversuche mit ¹⁵N-markierten Substraten	46
2.5.1 Probennahme und Inkubation	46
2.5.2 Messung und Berechnung	47
2.5.3 Weitere Experimente	47
2.6 Mikrobiologische Methoden	48
2.6.1 Nährmedien und Kultivierungstechniken	48
2.6.1.1 Medien für die von der DSMZ bezogenen Bakterienstämme.....	48

2.6.1.2 Medien zur Isolierung und Charakterisierung von Organismen aus der Aquakultur	49
2.6.1.2.1 Medium M1 - 6	51
2.6.1.2.2 Medium M _{FGH}	52
2.6.1.2.3 <i>Rhodospirillaceae</i> -Medium (DSMZ-Medium 27)	52
2.6.1.2.4 Medium 27, modifiziert (M27mod)	53
2.6.1.3 Weitere Medien	53
2.6.1.3.1 LB-Medium	54
2.6.1.3.2 LB-Medium mit Ampicillin	54
2.6.1.3.3 LB-Platten mit Ampicillin oder mit Ampicillin, IPTG und X-Gal	54
2.6.1.3.4 SOC-Medium	54
2.6.2 Isolierung nitratreduzierender und denitrifizierender Mikroorganismen aus der Aquakultur	55
2.6.3 Wachstumsmessungen	57
2.6.4 Charakterisierung neuer Bakterienstämme	58
2.6.4.1 Kolonie- und Zellmorphologie	58
2.6.4.2 Physiologische Tests	58
2.6.4.2.1 Gram-Färbung	58
2.6.4.2.2 Katalase-Test	59
2.6.4.2.3 Cytochrom <i>c</i> -Oxidasetest	59
2.6.4.2.4 Temperatur- und pH-Optimum sowie Salztoleranz	59
2.6.4.2.5 Weitere physiologische Charakteristika (API20E-Teststreifen)	60
2.6.4.2.6 Alternative Elektronenakzeptoren	60
2.6.4.2.7 Substrat- und Fermentationsproduktprofile	60
2.6.4.2.8 Anaerobes phototrophes Wachstum	61
2.6.4.3 Membranspektren	62
2.6.4.4 Pigmentanalyse	62
2.6.4.5 Elektronenmikroskopie	63
2.6.4.6 G+C-Gehaltsbestimmung	63
2.6.4.7 Hinterlegung in Stammsammlungen	63
2.6.5 Reaktion ausgewählter Isolate auf Sulfid („Sulfidtoleranztest“)	64
2.6.5.1 Vorversuch	64
2.6.5.2 Wachstum unter dem Einfluss von Sulfid („Langzeiteffekt“)	64
2.6.5.3 Zugabe von Sulfid zu wachsenden Kulturen („akuter Effekt“)	65
2.7 Molekularbiologische Methoden	65

2.7.1 DNA-Extraktion	65
2.7.1.1 Methode A	65
2.7.1.2 Methode B	66
2.7.1.3 Weitere Methoden	67
2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese	67
2.7.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	68
2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	68
2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	69
2.7.5.1 Verwendete Geräte und Reagenzien	69
2.7.5.2 Verwendete Primer und Programme	70
2.7.5.2.1 16S rRNA.....	70
2.7.5.2.2 Funktionelle Gene (<i>amoA</i> , <i>narG</i> , <i>nosZ</i> , <i>rbcL</i> und <i>pop</i>)	71
2.7.5.2.3 Klon-Inserts.....	73
2.7.6 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	77
2.7.6.1 Prinzip und Anwendung	77
2.7.6.2 Lösungen und Reagenzien	77
2.7.6.3 Durchführung	78
2.7.7 Klonierung	79
2.7.7.1 Ligation	80
2.7.7.2 Transformation	81
2.7.7.3 Klonscreening	81
2.7.7.4 Plasmidisolierung	82
2.7.8 RFLP-Analyse	83
2.7.9 Sequenzierung von Plasmidextrakten und PCR-Produkten	84
2.7.10 Sequenzanalyse, Stammbaumberechnung und Sondendesign	84
2.7.11 In situ-Techniken	86
2.7.11.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	86
2.7.11.1.1 Objektträger, Reagenzien und Sonden.....	86
2.7.11.1.2 Probenfixierung.....	91
2.7.11.1.3 Herstellung und Immobilisierung von Biofilmdünnschnitten	91
2.7.11.1.4 Immobilisierung von Probensuspensionen	91
2.7.11.1.5 Hybridisierung	92
2.7.11.1.6 DAPI-Färbung.....	94
2.7.11.2 Clone-FISH	94

2.7.11.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	94
2.7.11.2.2 Umklonierung	95
2.7.11.2.3 Induktion der Transkription	96
2.7.11.2.4 Fixierung	96
2.7.11.2.5 Hybridisierung	96
2.7.11.3 CARD-FISH	96
2.7.11.3.1 Probenvorbereitung	97
2.7.11.3.2 Inaktivierung endogener Peroxidasen	97
2.7.11.3.3 Permeabilisierung	97
2.7.11.3.4 Hybridisierung	98
2.7.11.3.5 CARD-Schritt	99
2.7.11.4 MAR-FISH	99
2.7.11.4.1 Inkubation und Fixierung	99
2.7.11.4.2 Herstellung von Biofilmdünnschnitten	100
2.7.11.4.3 FISH	100
2.7.11.4.5 Beschichtung mit Fotoemulsion („Coating“)	100
2.7.11.4.6 Entwicklung	101
2.7.11.5 Quantifizierung der wichtigsten AOB- und NOB-Populationen	101
2.7.11.6 Mikroskopie und Bildanalyse	102
2.8 Extrapolationsmethoden und statistische Verfahren	103
2.8.1 Auswertung der Genbibliotheken	103
2.8.1.1 Extrapolationsmethoden	103
2.8.1.2 Rarefaction-Methoden	104
2.8.1.3 Quantitativer Genbibliotheks-Vergleich	105
2.8.2 Weitere statistische Verfahren	106
2.8.2.1 Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler	106
2.8.2.2 Regression	107
2.9 Verwendete Chemikalien und Gase	107
3 ERGEBNISSE	108
3.1 Nitrifikation	108
3.1.1 Biofilmstruktur	108
3.1.2 Zusammensetzung der Nitrifikantengemeinschaft	108
3.1.2.1 DGGE-Monitoring	108

3.1.2.2 Klonierungsansatz	110
3.1.2.2.1 Klonierung von 16S rRNA-Genfragmenten	110
3.1.2.2.2 Klonierung von <i>amoA</i> -Genfragmenten	111
3.1.2.2.3 Qualität der Genbibliotheken	114
3.1.2.3 FISH	115
3.1.2.3.1 Optimierung des Sonden-Sets	115
3.1.2.3.2 Zusammensetzung der Nitrifikantengemeinschaft.....	117
3.1.3 Aktivität	119
3.1.3.1 Mikrosensormessungen	119
3.1.3.1.1 Sauerstoff und NO _x ⁻ -Profile	119
3.1.3.1.2 In situ-Kinetik	120
3.1.3.2 MAR-FISH	121
3.2 Nitratreduktion und Denitrifikation	124
3.2.1 Relevanz verschiedener nitratreduzierender Prozesse	124
3.2.2 Isolierung nitratreduzierender und denitrifizierender Spezies	125
3.2.2.1 Auswahl von Substraten für das Kultivierungsexperiment	125
3.2.2.2 Isolierung und phylogenetische Analyse	126
3.2.2.3 Fähigkeit zur Nitratreduktion/Denitrifikation	134
3.2.2.4 Beschreibung von D2-3 sowie der <i>Rhodobacter</i>-verwandten Spezies D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58	137
3.2.2.4.1 Herkunft der Isolate	137
3.2.2.4.2 Morphologische und cytologische Charakteristika	137
3.2.2.4.3 Phylogenetische Analyse	140
3.2.2.4.4 Wachstumsparameter Temperatur, pH und Salzgehalt.....	142
3.2.2.4.5 Substrat- und Fermentationsproduktprofil	145
3.2.2.4.6 Alternative Elektronenakzeptoren.....	146
3.2.2.4.7 Anaerobes phototrophes Wachstum.....	147
3.2.2.4.8 Cytochrome	147
3.2.2.4.9 Carotenoide und Bakteriochlorophyll <i>a</i>	148
3.2.2.4.10 Weitere taxonomisch relevante Eigenschaften	149
3.2.2.4.11 G+C-Gehalt.....	150
3.2.2.4.12 Taxonomie	150
3.2.3 Untersuchung der Diversität nitratreduzierender und denitrifizierender Spezies anhand der funktionellen Gene <i>narG</i> und <i>nosZ</i>	151
3.2.3.1 Nitratreduzierende und denitrifizierende Kulturen	151

3.2.3.1.1 DSMZ-Kulturen	151
3.2.3.1.2 Isolate aus der Aquakultur.....	151
3.2.3.2 Umweltproben aus der marinen Aquakultur	154
3.2.3.2.1 <i>narG</i>	154
3.2.3.2.1.1 Aufbau und Screening der Genbibliotheken	154
3.2.3.2.1.2 Abschätzung der Zahl der OTUs.....	155
3.2.3.2.1.3 Rarefaction-Analyse.....	156
3.2.3.2.1.4 Libshuff-Vergleich	157
3.2.3.2.1.5 Phylogenetische Analyse.....	159
3.2.3.2.2 <i>nosZ</i>	163
3.2.3.2.2.1 Abschätzung der Zahl der OTUs.....	163
3.2.3.2.2.2 Rarefaction-Analyse.....	165
3.2.3.2.2.3 Phylogenetische Analyse.....	166
3.2.4 Vergleich kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden	168
3.2.5 Einfluss von Sulfid.....	169
3.2.5.1 ¹⁵N-Inkubationsexperiment mit DB-Proben.....	169
3.2.5.2 Isolate.....	171
3.2.5.2.1 Vorversuche	171
3.2.5.2.2 Wachstum und Nitratumsatz unter sulfidischen Bedingungen	174
3.2.5.2.3 Effekt von Sulfidpeaks	180
4 DISKUSSION	184
4.1 Nitrifikation	184
4.1.1 Diskrepanz zwischen Klonierungsansatz, DGGE und FISH	184
4.1.2 Populationsstruktur der Nitrifikantengemeinschaft.....	185
4.1.3 Aktivität der Nitrifikantengemeinschaft.....	189
4.1.3.1 In situ-Kinetik.....	189
4.1.3.2 Aktivität einzelner Populationen	191
4.1.4 Zusammenfassung und Ausblick	192
4.2 Nitratreduzierende Prozesse	194
4.2.1 Bedeutung der verschiedenen Prozesse.....	194
4.2.2 Verantwortliche Organismen.....	196
4.2.2.1 Kultivierungsabhängige Analyse	196
4.2.2.1.1 Erfolg des Kultivierungsexperiments.....	196

4.2.2.1.2 Verteilung auf verschiedene Teilsysteme, Medien und Verdünnungsstufen.....	198
4.2.2.1.3 Vergleich der Aquakultur-Isolate mit dem Artenspektrum anderer Biofilter.....	200
4.2.2.1.3.1 Denitrifizierende Isolate.....	200
4.2.2.1.3.2 Nitratreduzierende Isolate.....	202
4.2.2.1.3.3 Isolate mit Fähigkeit zur DNRA.....	203
4.2.2.1.4 Charakterisierung neuer Bakterienarten aus der Aquakultur.....	203
4.2.2.1.4.1 <i>Geminococcus roseus</i> Stamm D2-3 ^T	204
4.2.2.1.4.1.1 Vergleich mit verwandten Arten.....	204
4.2.2.1.4.1.2 Beschreibung von <i>Geminococcus roseus</i> gen. nov., sp. nov.	207
4.2.2.1.4.2 <i>Rhodobacter</i> -verwandte Spezies.....	208
4.2.2.1.4.2.1 Vergleich mit verwandten Arten.....	208
4.2.2.1.4.2.2 Beschreibung von <i>Rhodobacter aggregans</i> sp. nov.....	212
4.2.2.1.4.2.3 Beschreibung von <i>Rhodobacter maritimus</i> sp. nov.	212
4.2.2.1.4.2.4 Beschreibung von <i>Rhodobacter denitrificans</i> sp. nov.	213
4.2.2.2 Kultivierungsunabhängige Analyse anhand funktioneller Gene	214
4.2.2.3 Vergleich kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden	217
4.2.3 Einfluss von Sulfid	220
4.2.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	223
5 ZUSAMMENFASSUNG	227
6 SUMMARY	231
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	235
8 DANKSAGUNG.....	284
9 PUBLIKATIONEN.....	286
9.1 Tagungsbeiträge.....	286
9.1.1 Poster.....	286
9.1.2 Kurzvorträge	287
9.2 Artikel in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System	287
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	289

Abbildungen, Tabellen und Gleichungen

Abbildungen:

Abb. 1: Ammonium(NH ₄ ⁺)-Ammoniak(NH ₃)-Diagramm.	3
Abb. 2: Stickstoffkreislauf.	5
Abb. 3: Überblick über die Phylogenie der nitrifizierenden Bakterien und Archaeen.	8
Abb. 4: Von der Nitratreduktion ausgehende Stoffwechselwege.	10
Abb. 5: Phylogenetische Position der 16S rRNA-Gensequenzen (Boxen) verschiedener Anammox-Bakterien.	23
Abb. 6: Schematisches Diagramm der Pilot-Anlage mit geschlossenem Wasserkreislauf in Rehovot, Israel.	24
Abb. 7: Ammoniumkonzentrationen im Wasser der Pilotanlage in Rehovot eine Stunde nach dem Füttern vor und nach Passage des Tropfkörpers.	25
Abb. 8: Pilot-Anlage mit geschlossenem Wasserkreislauf in Rehovot, Israel.	35
Abb. 9: Schematische Zeichnung des Sedimentationsbeckens.	36
Abb. 10: Chemische Parameter in Sedimentationsbecken (DB) an ausgewählten Probenahmepunkten.	37
Abb. 11: Agarosegel des mit den Primern narG1960F/narG2650R bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, Primer- und Magnesiumkonzentrationen amplifizierten <i>narG</i> -Genfragments von <i>E. coli</i> (~ 690 bp).	72
Abb. 12: Agarosegel der mit nosZ661F/nosZ1773R bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen amplifizierten <i>nosZ</i> -Genfragmente (~ 1100 bp) von 3 verschiedenen <i>Pseudomonas</i> -Spezies.	73
Abb. 13: <i>amoA</i> -DGGE-Monitoring der AOB-Gemeinschaft nach Wiederinbetriebnahme des Systems.	109
Abb. 14: DGGE-Gel (<i>amoA</i>) zum Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden.	109
Abb. 15: Vergleich von 16S rRNA- und <i>amoA</i> -Genbibliotheken, die nach DNA-Extraktion mit verschiedenen Methoden angelegt wurden.	112
Abb. 16: Stammbäume partieller 16S rRNA- und <i>amoA</i> -Gensequenzen.	113
Abb. 17: „Collector’s Curves“ der beiden AOB-16S rRNA-Genbibliotheken.	114
Abb. 18: Alignment von Sonde NEU23a + CTE, der Sequenz des Zielorganismus (<i>Nitrosomonas europaea</i>) und der Sequenz der <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143-ähnlichen Klon-Inserts.	116
Abb. 19: Doppelhybridisierung von <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143-ähnlichen Zellclustern mit Sonde NEU23a-CY5 und Nm143-446-1+2-CY3.	116
Abb. 20: <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143-ähnliche Zellcluster.	116
Abb. 21: In situ-Detektion β -proteobakterieller AOB, AOA aus der Gruppe der <i>Crenarchaeota</i> , sowie <i>Nitrospira</i> -verwandter NOB mittels FISH.	118

Abb. 22: Durchschnittliche Sauerstoff- und NO _x ⁻ (Nitrat + Nitrit)-Mikroprofile in TF-Biofilmen bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen.	120
Abb. 23: In situ-Ammoniumoxidationsraten bei verschiedenen lokalen Ammoniumkonzentrationen an der Biofilmoberfläche.	121
Abb. 24: Aktivität der in situ relevanten AOB-Populationen bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen.	122
Abb. 25: Aktivität der potentiellen AOB.	123
Abb. 26: Verteilung der Isolate auf verschiedene phylogenetische Gruppen.	129
Abb. 27: Herkunft der Isolate aus den verschiedenen Teilsystemen.	131
Abb. 28: Herkunft der Isolate von verschiedenen Medien.	132
Abb. 29: Herkunft der Isolate aus verschiedenen Verdünnungsstufen.	133
Abb. 30: Zellen des Isolats D2-3.	138
Abb. 31: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der 4 <i>Rhodobacter</i> -verwandten Spezies.	140
Abb. 32: Phylogenetische Position des Isolats D2-3.	141
Abb. 33: Phylogenetische Position der <i>Rhodobacter</i> -verwandten Spezies.	142
Abb. 34: Einfluss von Temperatur und pH und das Wachstum von D2-3 sowie Wachstumssteigerung durch Erhöhung der verfügbaren festen Oberfläche und Beleuchtung.	143
Abb. 35: Einfluss von Temperatur und pH auf das Wachstum von D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58.	144
Abb. 36: Redox-Differenzspektren der Membranfraktion und des zellfreien Extrakts von Isolat D2-3.	148
Abb. 37: Absorptionsspektrum der mit Methanol/Aceton extrahierten Pigmente von Isolat D2-3.	149
Abb. 38: Beispiel für die RFLP-Analyse insertpositiver <i>narG</i> -Klone aus dem FBR.	155
Abb. 39: Anzahl der in den <i>narG</i> -Genbibliotheken detektierten OTUs in Abhängigkeit von der Zahl der gescreenten Klone.	156
Abb. 40: Rarefaction-Kurven für die <i>narG</i> -Genbibliotheken aus TF, DB und FBR.	157
Abb. 41: Libshuff-Vergleich der <i>narG</i> -Genbibliotheken aus TF, DB und FBR.	158
Abb. 42: Konsensusbaum vollständiger und partieller <i>narG</i> -Gensequenzen.	163
Abb. 43: Anzahl der in der <i>nosZ</i> -Genbibliotheken detektierten OTUs in Abhängigkeit von der Zahl der gescreenten Klone.	164
Abb. 44: Rarefaction-Analyse der <i>nosZ</i> -Genbibliothek aus dem DB bei unterschiedlicher OTU-Definition.	165
Abb. 45: <i>nosZ</i> -Stammbaum.	168
Abb. 46: Nitratumsatz in Batch-Inkubationen (DB-Schlamm) mit ¹⁵ N-NO ₃ ⁻ und steigenden Sulfidkonzentrationen über die Zeit.	170

Abb. 47: Beispiele für Wachstum und Nitratumsatz denitrifizierender Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen.	175
Abb. 48: Beispiele für die Reaktion von Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase auf die Sulfidzugabe.	181

Tabellen:

Tab. 1: An der Denitrifikation beteiligte Enzyme, deren Eigenschaften und codierende Gene sowie Organismen, aus denen sie zuerst charakterisiert wurden.	12
Tab. 2: Auflistung mikrobieller Genera, die Denitrifikanten enthalten.	16
Tab. 3: Analysemethoden zur Gasbestimmung.....	40
Tab. 4: Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für verschiedene Gase in Wasser bei 20 und 25 °C.	42
Tab. 5: Kultivierungsbedingungen der von der DSMZ bezogenen Bakterienstämme.	49
Tab. 6: Zusammensetzung der Spurenelementstammlösung.....	50
Tab. 7: Zusammensetzung der Vitaminstammlösung.	50
Tab. 8: Na-Phosphatpuffer-Stammlösungen.	51
Tab. 9: Übersicht über die von Ansatz 1A u. 1B weiterbearbeitete Verdünnungsstufen.	56
Tab. 10: DNA-Extraktionspuffer für Extraktionsmethode B.	66
Tab. 11: Enzym-Mix I für Extraktionsmethode B.	67
Tab. 12: Enzym-Mix II für Extraktionsmethode B.	67
Tab. 13: Sequenz, Schmelztemperatur, Zielgen und Bindungsstelle der verwendeten Primer. ..	74
Tab. 14: PCR-Programme zur Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten und Klon-Inserts.....	75
Tab. 15: PCR-Programme zur Amplifikation von Teilstücken funktioneller Gene.	76
Tab. 16: Zusammensetzung der Acrylamid-Lösungen zur Herstellung verschiedener denaturierender Gradienten.	79
Tab. 17: Zusammensetzung des Ligationsmixes.....	80
Tab. 18: Zur RFLP-Analyse verwendete Restriktionsendonukleasen.	84
Tab. 19: Sonden zur in situ-Detektion von AOB, NOB und Crenaechaetoten.	89
Tab. 20: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers bei verschiedenen Formamidkonzentrationen.	93
Tab. 21: Zusammensetzung des Waschpuffers entsprechend der verschiedenen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer.	93
Tab. 22: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für CARD-FISH bei verschiedenen Formamidkonzentrationen.	98
Tab. 23: Reinheit der verwendeten Gase.	107

Tab. 24: 16S rRNA- und <i>amoA</i> -Genbibliotheken nach DNA-Extraktion mit zwei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden.	114
Tab. 25: Bedeutung des Denitrifikationsprozesses in DB und FBR.	124
Tab. 26: Mittels HPLC-Analyse im DB detektierte C-Quellen.	125
Tab. 27: Phylogenetische Einordnung und nächste Verwandte nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien aus der Aquakultur.	126
Tab. 28: Test auf Nitratverbrauch, Nitrit-, N ₂ O- und N ₂ -Bildung.	134
Tab. 29: Wachstum von D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 bei verschiedenen Salzgehalten.	145
Tab. 30: Substratspektren der Isolate D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58.	145
Tab. 31: Weitere Charakteristika der Isolate D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58.	149
Tab. 32: Aus eigenen Isolaten gewonnene <i>narG</i> - und <i>nosZ</i> -Genfragmente.	152
Tab. 33: Analyse der <i>narG</i> -Genbibliotheken aus den 3 Teilsystemen TF, DB und FBR.	155
Tab. 34: Mit DOTUR ermittelte OTUs, Coverages sowie verschiedene Schätzparameter der <i>nosZ</i> -Genbibliothek aus dem DB bei einem maximalen evolutivem Abstand (D) von 1 bzw. 10% auf Aminosäureebene.	164
Tab. 35: Vergleich von <i>narG</i> -Klonsequenzen mit Isolat- und Datenbanksequenzen.	169
Tab. 36: Ergebnisse der Vorversuche zur Sulfidtoleranz und Auswahl für die nachfolgenden Versuche.	172
Tab. 37: Wachstum der 20 getesteten Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen.	176
Tab. 38: Maximale N ₂ O- und N ₂ -Bildungsraten der 20 getesteten Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen sowie Konzentrationen an N ₂ O und N ₂ nach Beendigung des Wachstums.	178
Tab. 39: Reaktion (Wachstum) der 8 getesteten Isolate auf die Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase.	182
Tab. 40: Reaktion (N ₂ O- und N ₂ -Bildungsraten und N ₂ O- und N ₂ -Konzentrationen nach Beendigung des Wachstums) der 8 getesteten Isolate auf die Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen.	183
Tab. 41: Eigenschaften von D2-3 ^T und verwandten Genera der <i>Alphaproteobacteria</i>	206
Tab. 42: Eigenschaften von D1-19 ^T , D5-41 ^T , D9-3 ^T und D11-58 ^T und einiger phylogenetisch nahe verwandter Spezies.	210

Gleichungen:

Gleichung 1: Ammoniumoxidation.	6
Gleichung 2: Nitritoxidation.	7
Gleichung 3: Anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox).	23
Gleichung 4: Stoffmenge eines Gases.	41

Gleichung 5: Stoffmenge eines Gases in der Gasphase.	41
Gleichung 6: Allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase.	41
Gleichung 7: Physikalisch gelöster Anteil eines Gases.	42
Gleichung 8: Michaelis-Menten-Kinetik für den Umsatz von Ammonium.	46
Gleichung 9: Wachstumsrate μ	57
Gleichung 10: Verdopplungszeit t_d	57
Gleichung 11: Berechnung des optimalen Insert-Vektor-Verhältnisses.	81
Gleichung 12: Berechnung der Dissoziationstemperatur von Sonden.	92
Gleichung 13: Coverage.	104
Gleichung 14: Bias-corrected Chao1.	104
Gleichung 15: Deterministisches Modell.	104
Gleichung 16: Hurlbert-Formel.	105
Gleichung 17: Bonferroni Korrektur zur Bestimmung der experimentweisen Fehlerrate.	106
Gleichung 18: Mittelwert.	106
Gleichung 19: Standardabweichung.	106
Gleichung 20: Standardfehler.	107

Abkürzungen

AA	Acrylamid
AAnPs	aerobic anoxygenic phototrophs, aerobe anoxygen Phototrophe
Adj.	Adjektiv
AluI	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Arthrobacter luteus</i>
<i>Amo</i>	Ammoniummonooxygenasegen
Amo	Ammoniummonooxygenase
Amp	Ampicillin
Anammox	anaerobic ammonium oxidation, anaerobe Oxidation von Ammonium
AOA	ammonia-oxidizing archaea, ammoniumoxidierende Archaeen
AOB	ammonia-oxidizing bacteria, ammoniumoxidierende Bakterien
APS	Ammoniumpersulfat
Ar	Argon
Ba	Barium
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	bovine serum albumine, Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
β -AOB	betaproteobakterielle ammoniumoxidierende Bakterien
C	Kohlenstoff
c	Konzentration
ca.	circa
CARD	catalized reporter deposition
cfu	colony forming units, koloniebildende Einheiten
CO ₂	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
Cy3	Sulfoindocyanin-Farbstoff Cy3.29-Osu
Cy5	Cy5.18-Derivat (N-hydroxysuccinimidester)
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindolhydrochlorid
DB	digestion basin, in etwa: Sedimentationsbecken
DB, in	Probenahmepunkt am Einlass des Sedimentationsbeckens
DB, m	Probenahmepunkt in der Mitte des Sedimentationsbeckens
DB, out	Probenahmepunkt am Auslass des Sedimentationsbeckens

ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis, denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinäure
DNRA	dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrapolymeric substances, extrazelluläre polymere Substanzen
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
etc.	et cetera, und so weiter
FA	Formamid
FBR	fluidized bed reactor, Fließbettreaktor
Fe	Eisen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	hour, Stunde
H ₂	Wasserstoff
HaeIII	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Haemophilus aegypticus</i>
HhaI	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
He	Helium
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
H ₂ S	Dihydrogensulfid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure

i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
L.	Latein
LB	Luria Broth, Nährmedium
LC ₅₀	lethal concentration, lethale Konzentration (= Konzentration einer toxischen Substanz, bei der 50% der Versuchstiere in vorgegebener Zeit sterben)
M	molar (mol/l)
M1 - 6	Medien, die zur Kultivierung von Mikroorganismen aus der Aquakultur verwendet wurden
m	Meter
masc.	maskulin
MAR	microautoradiography, Mikroautradiographie
max.	maximal
MCS	multiple cloning site
min	Minute
Mo	Molybdän
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
μ	Wachstumsrate
μ S	Mikrosiemens, Leitfähigkeitseinheit
N	Stickstoff
n	Stichprobenanzahl
N ₂	molekularer Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natronlauge
<i>nap</i>	Nitratreduktasegen (periplasmatisches Enzym)
Nap	Nitratreduktase (periplasmatisches Enzym)
<i>nar</i>	Nitratreduktasegen (membrangebundene Form)
Nar	Nitratreduktase (membrangebundene Form)

Na ₂ S	Natriumsulfid
n. b.	nicht bestimmt
Ne	Neon
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
NH ₃	Ammoniak
<i>nir</i>	Nitritreduktasegen (cytoplasmatische Form)
Nir	Nitritreduktase (cytoplasmatische Form)
N. L.	Neulatein
N ₂ O	Lachgas, Distickstoffoxid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrition
NO ₃ ⁻	Nitration
NOB	nitrite-oxidizing bacteria, nitritoxidierende Bakterien
<i>nos</i>	N ₂ O-Reduktasegen
Nos	N ₂ O-Reduktase
<i>nor</i>	NO-Reduktasegen
Nor	NO-Reduktase
<i>nrf</i>	Nitritreduktasegen (membrangebundene Form)
Nrf	Nitritreduktase (membrangebundene Form)
o. ä.	oder ähnliches
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm
OT	Objekträger
OTU	operational taxonomic unit, künstlich festgelegte taxonomische Einheit
pAOB	potentielle ammoniumoxidierende Bakterien
Part.	Partizip
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK _A	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _A
<i>pop</i>	Proteorhodopsin-Gen
ppm	parts per million, Teile pro Million Teile
Präp.	Präposition

Präs.	Präsens, Gegenwart
psu	practical salinity units
r^2	Bestimmtheitsmaß
<i>rbcL</i>	Gen, das für die große Untereinheit (Formen 1A und 1C) der RubisCO codiert
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RK	Reinkultur
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RsaI	Restriktionsendonuklease mit tetramerer Erkennungssequenz aus <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase/oxygenase
S	Schwefel
s	Sekunde
SBR	sequencing batch reactor
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurat
SIP	stable isotope probing
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Subst.	Substantiv
^T	type strain, in einer Stammsammlung hinterlegter Referenzstamm einer Mikroorganismen-Spezies
t_d	Verdopplungszeit
T_m	Schmelztemperatur
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAN	total ammoniacal nitrogen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TF	trickling filter, Tropfkörper
Tris-HCl	α,α,α -Tris(hydroxymethyl)-methylamin-hydrochlorid
U	1. Units, Aktivitätseinheiten bei Enzymen, 2. Umdrehungen
u. a.	unter anderem
u. ä.	und ähnliches
UF	urea and formamide, Harnstoff und Formamid
ÜNK	Übernachtkultur

u./o.	und/oder
V	Volt
V.	Verb
v. a.	vor allem
v_{\max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms (Michaelis-Menten-Kinetik)
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
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Aquakultur

1.1.1 Derzeitige und zukünftige Bedeutung

Seit den späten 60er Jahren steigt der weltweite Bedarf an Fischereiprodukten kontinuierlich um 2,3% pro Jahr. Infolgedessen sind 28% der weltweiten marinen Fischbestände heute bereits erschöpft oder stark überfischt (FAO, 2004).

Als Alternative zum Fischfang gewinnen deshalb Aquakulturtechniken mehr und mehr an Bedeutung. Ihr Beitrag zur weltweiten Versorgung mit Fisch, Crustaceen und Mollusken stieg von einer Gesamtproduktion von 3,9% (nach Gewicht) im Jahr 1970 auf 29,9% im Jahr 2002 (FAO, 2004). Mit einer durchschnittlichen Rate von 8,9% pro Jahr wächst der Sektor der Aquakultur - gegenüber dem Fischfang (1,2%) und der Fleischproduktion (2,8%) - schneller als alle anderen Sektoren der Lebensmittelproduktion. Obwohl es sich bei einem Großteil der Produktion aus Aquakulturen nach wie vor um Süßwasserorganismen handelt (57,7% nach Menge im Jahr 2002), ist auch die marine Aquakultur innerhalb des letzten Jahrzehnts sehr stark gewachsen. Die weltweite Produktion von Lachs aus Fischfarmen hat sich seit den frühen 1990er Jahren beispielsweise etwa vervierfacht (Naylor & Burke, 2005). Mittlerweile wird begonnen, auch eine Vielzahl anderer mariner Fischarten wie Kabeljau (*Gadus morhua*), Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*), Fadenflosser (*Polydactylus sexfilis*), Hammelschnapper (*Lutjanus analis*) und Thunfisch (*Thunnus* spp.) in Farmen zu züchten, darunter auch einige Arten, deren Wildbestände bereits erschöpft sind (Naylor & Burke, 2005).

1.1.2 Ökologische Auswirkungen

Die meisten marinen Fischarten werden in schwimmenden Netzeinfriedungen oder -käfigen in Küstennähe gehalten (Naylor et al., 2000; Goldberg & Naylor, 2004). Eine weitere gängige Praxis ist die Zucht in entlang der Küste angelegten Teichen (Tovar et al., 2000; Milstein et al., 2001). Dies ist oft mit schädlichen Auswirkungen auf die umgebende Umwelt verbunden. Ein schwerwiegendes Problem ist die Freisetzung von gelösten Nährstoffen (Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat) und organischer Substanz in die marine Umgebung. Diese zusätzliche Nährstofffracht beeinträchtigt nachweislich den im Einzugsbereich von Fischfarmen gelegenen Mee-

resboden, indem die Sedimentbiogeochemie verändert wird (z. B. Wu, 1995; Christensen et al., 2000; Tovar et al., 2000; Holmer et al., 2002 und 2003a). Auswirkungen sind auch auf die benthische (Meio- und Makro)fauna (Wu et al., 1994; Mazzola et al., 2000; Mirto et al., 2000; La Rosa et al., 2001; Edgar et al., 2005; Gao et al. 2005) sowie auf Primärproduzenten (Holmer et al., 2003b) festzustellen. Darüber hinaus haben der Gebrauch von Chemikalien (Antibiotika und andere Therapeutika, Vitamine und Antifouling-Agenzien), das Einschleppen von Parasiten und Krankheiten sowie neuer genetischer Stämme und die daraus entstehende Bedrohung für wilde Bestände ökologische Bedenken hervorgerufen (z. B. Wu, 1995; Naylor & Burke, 2005).

1.1.3 Möglichkeiten und Erfordernisse geschlossener Systeme

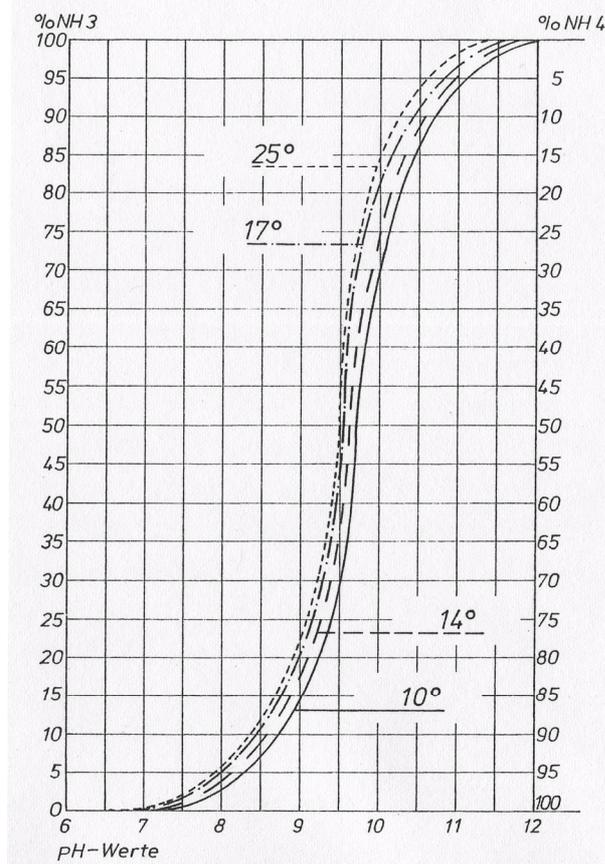
Als umweltfreundliche Alternative zu den üblichen Durchlaufsystemen steigt das Interesse an Systemen mit geschlossenem Wasserkreislauf. Neben den Auswirkungen auf die Umwelt sind es Faktoren wie Einschränkungen in der verfügbaren Wasserqualität und -quantität, Verfügbarkeit und Kosten von Land sowie strengere Auflagen zur Abwassereinleitung, die die Industrie zu intensiveren Praktiken zwingen (Guttierez-Wing & Malone, 2006).

Um eine ausreichende Wasserqualität zu garantieren, ist in geschlossenen Systemen eine effektive Wiederaufbereitung des Wassers erforderlich. Biofilter werden als ökonomisch am besten realisierbare Lösung für Aquakultursysteme angesehen (van Rijn, 1996). Es existieren verschiedene Biofilteranordnungen. Aber Daten zur Effizienz der Filtersysteme, insbesondere im marinen Bereich, sind bislang Mangelware.

Biofilter in Aquakultursystemen dienen in erster Linie der Stickstoffentfernung. Der Stickstoff (N) gelangt hauptsächlich über das Futter (in Form von Proteinen) in das System. Nur durchschnittlich 25% des mit dem Futter zugegebenen N werden von den Fischen jedoch auch aufgenommen (Hargreaves, 1998). Um eine N-Akkumulation zu verhindern, muss der überschüssige Stickstoff wieder aus dem System entfernt werden, zumal einige Formen des Stickstoffs für Fische toxisch sind. Vor allem die Ammonium- und Nitritkonzentrationen müssen gering gehalten werden. Aber auch die Nitratkonzentrationen sollten einen bestimmten Level nicht übersteigen.

Ammonium (NH_4^+) selbst ist relativ ungefährlich, es steht jedoch in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit der unprotonierten Form des Ammoniak (NH_3) (Baur, 1987; Hargreaves, 1998), der auf aquatische Organismen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen toxisch wirkt. Maximal akzeptable Konzentrationen für junge Goldbrasse (*Sparus aurata*) sind beispielsweise

0,3 - 0,5 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ (Wajsbroet et al., 1993). LC_{50} -Werte aus Kurzzeitexperimenten (48 - 96h) mit Fischen reichen in Abhängigkeit von Art und Altersstadium von ca. 0,2 - 3 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$. Um kein Risiko einzugehen, sollten in Aquakultursystemen deshalb Konzentrationen von 0,02 - 0,3 mg/l (10% des LC_{50} -Wertes) nicht überschritten werden (Boyd & Tucker, 1998).



Das Verhältnis von $\text{NH}_4^+\text{-N}$ und $\text{NH}_3\text{-N}$ ist pH- und temperaturabhängig, wobei der pH-Effekt den Temperatureffekt bei weitem übersteigt (Abb. 1). Höhere pH-Werte und höhere Temperaturen verschieben das Gleichgewicht auf Seiten des NH_3 . Bei 25 °C liegt der pKa-Wert bei 9,24 (Hargreaves, 1998). Bei pH 9,3 liegen folglich ungefähr 50% des $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3\text{-N}$ in der unprotonierten Form des Ammoniak vor, bei pH 8,3 sind es 10%, bei pH 7,3 nur noch 1%.

Abb. 1: Ammonium (NH_4^+)-Ammoniak (NH_3)-Diagramm. Aus Baur, 1987.

Nitrit (NO_2^-) kann für Fische ab Konzentrationen von wenigen mg/l toxisch sein. Bei 12 Tage alten Larven der Goldbrasse (*Sparus aurata*) wurde ein LC_{50} -Wert von 2 mg/l- NO_2^- -N (24 h-Test) ermittelt (Parra & Yúfera, 1999). 24 h- LC_{50} -Werte bei Larven von fünf weiteren marinen Fischarten reichten von 1 bis 2,7 mg/l- NO_2^- -N (Brownell, 1980). In anderen Studien wurden in Abhängigkeit von Fischart und Chloridkonzentration im Wasser jedoch auch weit höhere LC_{50} -Werte (24 - 96 h-Tests) von über 10 bis zu mehreren 100 mg/l ermittelt (z. B. Almendras, 1987; Weirich & Riche, 2006a und b).

Nitrat ist, im Gegensatz zu Ammoniak und Nitrit, für aquatische Organismen relativ wenig toxisch. Jedoch sind von einigen marinen Organismen und Süßwasserarten auch toxische Effekte hoher Nitratkonzentrationen bekannt. Die generell als sicher angesehene Grenze für Nitrat-N in der Fischzucht liegt bei 50 mg/l; bei marinen Arten reicht die Spanne von 2,2 - 5050 mg Nitrat-

N/l, wobei Larven und Gelege die empfindlichsten Stadien sind (Gutierrez-Wing & Malone, 2006). Eine Kontrolle der Nitratkonzentrationen ist auch deshalb erforderlich, weil bei hohen Nitratkonzentrationen die Gefahr einer übermäßigen Nitritbildung besteht (van Rijn et al., 2006).

Bei marinen Systemen spielt darüber hinaus die H₂S-Entfernung eine Rolle. Das in anaeroben Bereichen gebildete Sulfid ist schon in Konzentrationen im µM-Bereich toxisch für Fische und andere aquatische Organismen (Bagarinao & Vetter, 1989; Bagarinao, 1992; Grieshaber & Völkel, 1998) und darf deshalb nicht in den Fischtank gelangen.

1.2 Der Stickstoffkreislauf und seine Bedeutung

Stickstoff (N) ist ein essentieller Bestandteil aller Lebewesen. Er hat mit durchschnittlich 12% nach Kohlenstoff (C) den zweitgrößten Anteil an der Zellmasse (Trockengewicht) und ist Bestandteil von Aminosäuren, Nukleinsäuren und anderen wichtigen Zellkomponenten (Madigan et al., 2000).

In der Natur kommt er hauptsächlich in den Oxidationsstufen -III (NH_3), 0 (N_2), +I (N_2O), +II (NO), +III (NO_2^-), +IV (NO_2) und +V (NO_3^-) vor (Bock & Wagner, 2003). Das größte Stickstoffreservoir bildet die untere Erdatmosphäre, die zu 78% aus N_2 , der inertesten Form des Stickstoffs, besteht. Geologische Vorkommen, v. a. in Form von Kalisalpeter (KNO_3) und Chilesalpeter (NaNO_3), gibt es dagegen nur in geringem Umfang (Bliefert, 1997). Abgesehen vom N_2 sind die meisten Stickstoffspezies aufgrund ihrer chemischen Instabilität und der Aktivität von Lebewesen beständiger Umformung unterworfen und stellen häufig nur Übergangsformen im biogeochemischen Stickstoffkreislauf dar (Abb. 2).

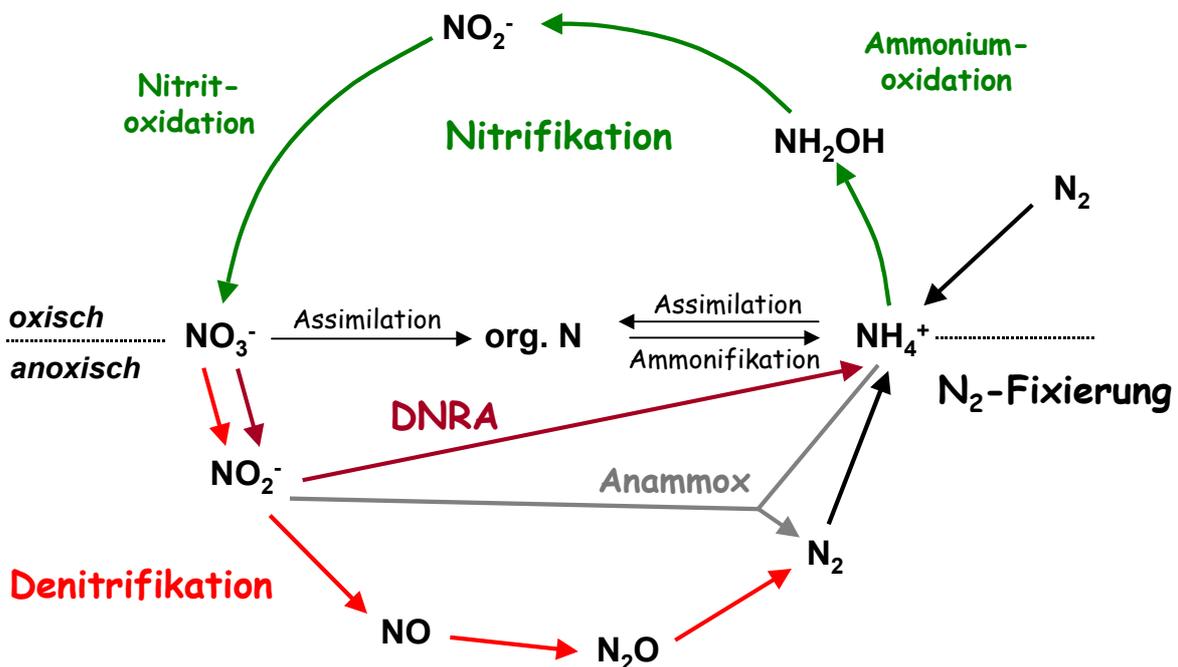


Abb. 2: Stickstoffkreislauf. Die verschiedenen aeroben und anaeroben Prozesse sind farblich gekennzeichnet. DNRA = Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium, Anammox = Anaerobe Ammoniumoxidation. Modifiziert nach Schramm, 2003.

Abgesehen von den Assimilationsreaktionen werden die Prozesse des Stickstoffkreislaufs fast ausschließlich von Prokaryoten durchgeführt.

Teilprozesse des N-Kreislaufs spielen in vielen Bereichen des menschlichen Lebens eine wichtige Rolle. Der N-Kreislauf und die an ihm beteiligten Organismen werden deshalb seit langem erforscht (Zumft, 1992; Shapleigh, 2003). Abgesehen von der Bedeutung für die Landwirtschaft (N₂-Fixierung durch symbiontisch und freilebende Rhizobien; N-Verlust durch Denitrifikation) gilt die Aufmerksamkeit vor allem der Abwasserreinigung, wo Nitrifikation und Denitrifikation inzwischen standardmäßig zur Entfernung von Stickstoff eingesetzt werden (Henze, 1991; Jetten et al., 1997; Wagner et al., 2002; Wagner & Loy, 2002).

In jüngster Zeit in den Vordergrund gerückt sind die unter anderem durch Denitrifikationsprozesse verursachten N₂O-Emissionen (Bange, 2000). Denn N₂O leistet als klimarelevantes Gas einen Beitrag zum Treibhauseffekt (Lashof & Ahuja, 1990) und ist an der Zerstörung der Ozonschicht beteiligt (Waibel et al., 1999).

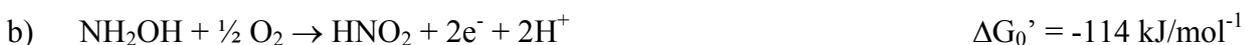
1.2.1 Nitrifikation

Nitrifikation ist die Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat. Sie läuft in zwei getrennten Schritten ab, die von verschiedenen Organismengruppen ausgeführt werden (Prosser, 1989; Bock et al., 1992; Bock & Wagner, 2003).

1.2.1.1. Reaktionen

Ammoniumoxidierer (**Ammonia-Oxidizing Bacteria**, AOB) wandeln Ammonium über Hydroxylamin zu Nitrit um (Gleichung 1). Beteiligte Enzyme sind im ersten Schritt die Ammoniummonooxygenase (AMO), im zweiten Schritt die Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO). Das Ausgangssubstrat für die Ammoniummonooxygenase ist Ammoniak (Suzuki, 1974).

Gleichung 1: Ammoniumoxidation. Aus Bock & Wagner, 2003.



Nitritoxidierer (**N**itrite-**O**xidizing **B**acteria, NOB) katalysieren die Reaktion von Nitrit zu Nitrat (Gleichung 2). Das beteiligte Enzym ist die Nitritoxidoreduktase (NO₂-OR).

Gleichung 2: Nitritoxidation. Aus Bock & Wagner, 2003.



Die Existenz von Organismen, die beide Reaktionen in sich vereinen („comammox“) ist zwar als möglich postuliert (Costa et al., 2006), bisher ist aber kein Beispiel bekannt.

1.2.1.2 Verantwortliche Organismengruppen

Seit der Isolation der ersten Nitrifikanten (Frankland & Frankland, 1890; Winogradsky, 1890) wurde eine Vielzahl von ammoniumoxidierenden Isolaten aus verschiedenen Umweltbereichen gewonnen. Dies führte zu der Beschreibung von 16 verschiedenen AOB-Spezies (Koops et al., 2003). Die beiden marinen Isolate *Nitrosococcus halophilus* und *Nc. oceani* gehören zur Klasse der Gammaproteobakterien. Die übrigen 14 bilden mit den beiden eng verwandten Genera *Nitrosomonas* (inklusive *Nitrosococcus mobilis*) und *Nitrospira* ein monophyletisches Cluster innerhalb der *Betaproteobacteria* (Abb.3). Die Nitrosomonaden lassen sich weiter in verschiedene „Lineages“ unterteilen und auch für das Genus *Nitrospira* wurde eine Einteilung in verschiedene Cluster vorgenommen (Koops et al., 2003; Purkhold et al., 2003).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Fähigkeit zur Ammoniumoxidation auf diese wenigen Gruppen innerhalb der *Gamma*- und *Betaproteobacteria* beschränkt ist. Kürzlich jedoch wurde entdeckt, dass auch Vertreter der zu den Archaeen gehörenden *Crenarchaeota* zur Oxidation von Ammonium befähigt sind (Könnecke et al., 2005; Schleper et al., 2005; Treusch et al., 2005). Es wird angenommen, dass die ammoniumoxidierenden *Archaea* (AOA) teilweise eine bedeutende Rolle im marinen und terrestrischen N-Kreislauf spielen (Francis et al., 2005; Könnecke et al., 2005; Schleper et al., 2005; Treusch et al., 2005; Hallam et al., 2006; Nicol & Schleper, 2006). Bisher einziger kultivierter Vertreter ist das marine Isolat „*Cand. Nitrosopumilus maritimus*“ (Könnecke et al., 2005).

Bei den nitritoxidierenden Bakterien (NOB) gibt es derzeit 8 beschriebene Spezies (Koops & Pommering-Röser, 2001) und eine Art mit Kandidatenstatus (Spieck et al., 2006). Sie wurden aufgrund morphologischer Charakteristika in vier Genera eingeteilt, wobei diese Einteilung auch ihre phylogenetische Diversität widerspiegelt (Spieck et al., 2006). Die Genera *Nitrobacter*

(4 beschriebene Spezies) und *Nitrococcus* (1 Spezies) gehören den *Alpha-* bzw. *Gammaproteobacteria* an. Die Gattung *Nitrospina* (1 Spezies) wurde ursprünglich den Deltaproteobakterien zugeordnet (Teske et al, 1994; Koops & Pommerening-Röser, 2001). Allerdings deuten neuere phylogenetische Analysen darauf hin, dass *Nitrospina* von den Deltaproteobakterien deutlich abgesetzt ist und möglicherweise eine eigene Gruppe in naher Verwandtschaft zum *Acidobacterium/Holophaga*-Phylum bildet (Schramm, 2003). Das Genus *Nitrospira* (2 beschriebene Spezies; 1 Candidatus) ist Teil des tiefabzweigenden Phylums *Nitrospira* innerhalb der *Bacteria* (Ehrich et al., 1995; Spieck et al., 2006). Für letztere Gruppe wurde mittlerweile eine weitere Unterteilung in insgesamt vier Subcluster vorgenommen (Daims et al., 2001a). Bis vor kurzem enthielten nur Cluster II mit *N. moscoviensis* (Ehrich et al., 1995) und Cluster IV mit *N. marina* (Watson et al., 1986) einen in Kultur befindlichen Vertreter, während die anderen beiden Cluster sich ausschließlich aus Umweltklonen zusammensetzten. Inzwischen ist es mit einer Anreicherungskultur von „*Cand. N. defluvii*“ aus Belebtschlamm (Spieck et al., 2006) aber gelungen, auch einen Vertreter von Cluster I in Kultur zu bringen.

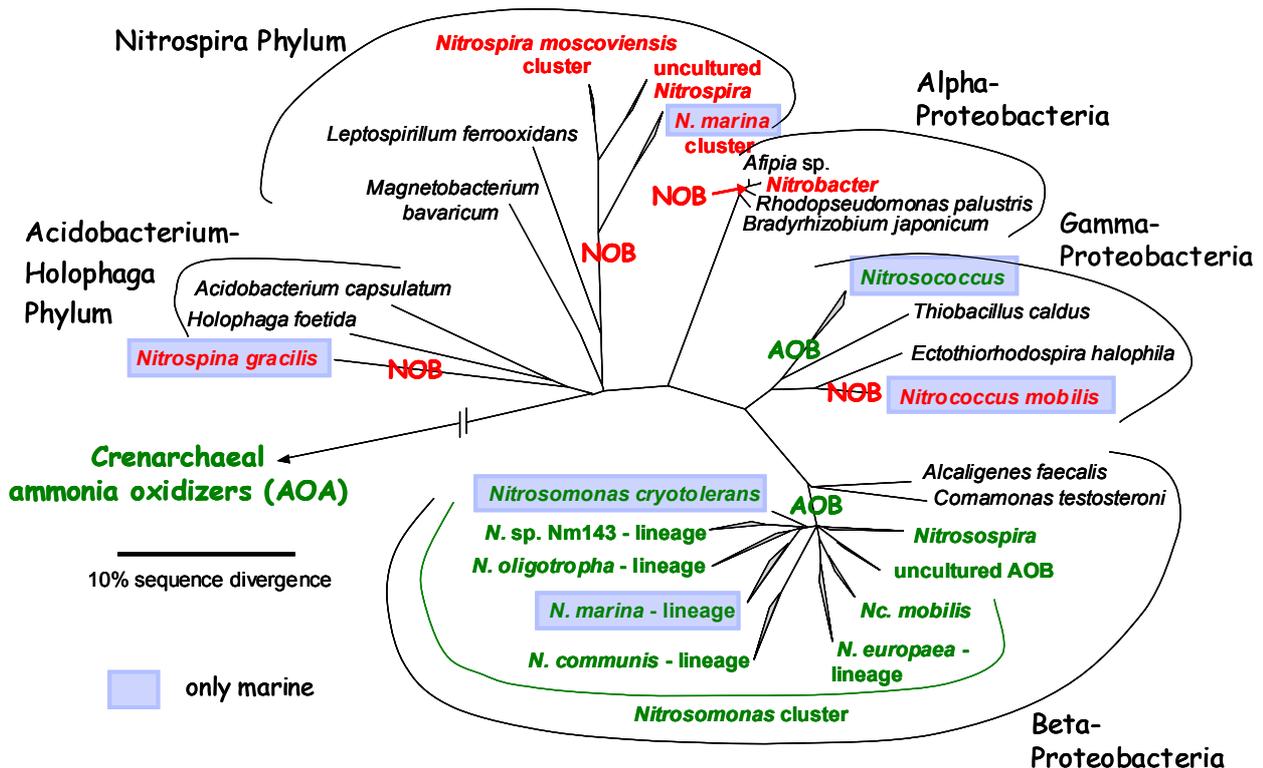


Abb. 3: Überblick über die Phylogenie der nitrifizierenden Bakterien und Archaeen. AOB = ammoniumoxidierende Bakterien, NOB = nitritoxidierende Bakterien. Nach Schramm, 2003.

1.2.1.3 Untersuchung von Nitrifikantengemeinschaften in der Umwelt

Nitrifikanten sind eine nahezu ideale Zielgruppe für die 16S rRNA-basierte Analyse (Klonierung & Sequenzierung, auf die 16S rRNA abzielende Sonden). Im Vergleich zu beispielsweise den Denitrifikanten handelt es sich bei den Nitrifikanten um eine überschaubare Anzahl phylogenetischer Gruppen. Darüber hinaus sind bisher alle Spezies, die einer der 6 ausgewiesenen AOB- bzw. NOB-Gruppen angehören, Nitrifikanten. Die phylogenetische Zugehörigkeit korrespondiert in diesem Fall also bisher sehr gut mit der metabolischen Funktion. Deshalb wird angenommen, dass auch nicht kultivierte Bakterien, die mittels Sequenzanalyse oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Mitglieder einer dieser Gruppen identifiziert werden, ebenfalls Nitrifikanten sind (Schramm, 2003). Für die drei Gruppen β -AOB, *Nitrobacter* und *Nitrospira* besteht auch bereits ein relativ umfangreiches Sonden-set (siehe Kap. 2.7.11.1, Tab. 19).

Zur Untersuchung der Diversität von β -AOB in Umweltproben hat sich darüber hinaus die Verwendung einer Teilsequenz des *amoA*-Gens, das für die katalytische Untereinheit der Ammoniummonooxygenase codiert, als funktioneller Genmarker bewährt (Rotthauwe et al., 1997; Purkhold et al., 2003). Mittlerweile sind auch erste Primer entwickelt worden, die auf das *amoA*-Gen von ammoniumoxidierenden Crenarchaeoten abzielen (Francis et al., 2005; de la Torr  et al., unver ffentlicht).

1.2.2 Nitratreduzierende Prozesse

Die Nitratreduktion ist Ausgangspunkt dreier grundsätzlich verschiedener Stoffwechselwege: der assimilatorischen Nitratreduktion, der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) und der Denitrifikation (Zumft, 1997; Stolz & Basu, 2002; Bock & Wagner, 2003). Alle drei beginnen mit der Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Sie dienen jedoch unterschiedlichen Zwecken, werden teilweise von unterschiedlichen Enzymen katalysiert und führen zu unterschiedlichen Endprodukten (Abb. 4).

1) Assimilatorische Nitratreduktion

Prokaryotisch



Eukaryotisch



2) Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium



3) Denitrifikation



Abb. 4: Von der Nitratreduktion ausgehende Stoffwechselwege. Die Bezeichnungen für an der dissimilatorischen Nitratreduktion beteiligte Enzyme sind weitgehend standardisiert und stehen für: NarG = membrangebundene Nitratreduktase, NapA = periplasmatische Nitratreduktase, NirS = Cytochrom *cd*₁-abhängige Nitritreduktase, NirK = Cu-abhängige Nitritreduktase, NirB = Nichthäm-Nitritreduktase, NrfA = Penta-Häm-Cytochrom *c*-Nitritreduktase, NorB = NO-Reduktase, NosZ = N₂O-Reduktase. Die assimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktasen sind nicht standardisiert und umfassen die folgenden Enzyme: Euk-NR = eukaryotische Nitratreduktasen (Nia, NiaD, INR, Nit), Nas = cytoplasmatische Nitratreduktasen (NasA, NasB, NasBB, NasC, NarB), Nir = Nichthäm-Nitritreduktasen (Nir, NirB, NasA, NasC, NasD). Nach Stolz & Basu, 2002.

1.2.2.1 Assimilatorische Nitratreduktion

Die assimilatorische Nitratreduktion über Nitrit zu Ammonium dient der Inkorporation von Stickstoff in Biomasse und kommt in Prokaryoten (*Bacteria*, *Archaea*) und Eukaryoten (Pflan-

zen, Pilze) gleichermaßen vor (Stolz & Basu, 2002; Bock & Wagner, 2003). Das die Umwandlung von Nitrat in Nitrit katalysierende Enzym ist die im Cytoplasma lokalisierte, assimilatorische Nitratreduktase (Nas) (Richardson et al., 2001; Stolz & Basu, 2002).

1.2.2.2 Dissimilatorische Nitratreduktion

Die dissimilatorischen Prozesse sind bis auf wenige Ausnahmen auf Prokaryoten beschränkt und dienen dort in erster Linie der Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen (Zumft, 1992 u. 1997; Stolz & Basu, 2002; Shapleigh, 2003). Teilweise fungieren sie auch als Elektronensenke oder dienen - wie bei der Reduktion von Nitrit zu Ammonium - der Detoxifikation. Das im ersten Schritt gebildete Nitrit wird entweder ausgeschieden, was die am weitesten verbreitete Form der Nutzung von Stickstoffoxiden zu respiratorischen Zwecken darstellt (Zumft, 1992), anschließend zu Ammonium reduziert (DNRA) oder in gasförmige Stickstoffverbindungen überführt (Denitrifikation) (Zumft, 1997).

Obwohl sowohl DNRA als auch Denitrifikation mit der Reduktion von Nitrat zu Nitrit beginnen und dabei obendrein die gleichen Enzyme beteiligt sind, können Bakterien meist entweder denitrifizieren oder Nitrat zu Ammonium reduzieren (Zumft, 1997). Mit *Flexibacter canadensis* (Christensen, 1980), *Magnetospirillum magnetotacticum* (Bazylinsky & Blackmore, 1983), *Thioalkalivibrio denitrificans* (Sorokin et al., 2001) und *Caldithrix abyssis* (Miroshnikenko et al., 2003) sind aber auch Ausnahmen von dieser Regel bekannt.

1.2.2.2.1 Denitrifikation

Die vollständige Denitrifikation umfasst die sequentielle Reduktion von Nitrat zu Nitrit und dann über die Zwischenstufen NO und N₂O weiter zu N₂. Es sind jedoch nicht alle Organismen im Besitz der vollständigen Elektronentransportkette. Als Denitrifikanten können sie gelten, wenn sie fähig sind, Nitrit in eine gasförmige Verbindung des Stickstoffs umzusetzen (Zumft, 1992 und 1997). Die Einzelreaktionen werden von Enzymen katalysiert, die teils mit der Cytoplasmamembran assoziiert, teils im Periplasma lokalisiert sind (Tab. 1).

Tab. 1: An der Denitrifikation beteiligte Enzyme, deren Eigenschaften und codierende Gene sowie Organismen, aus denen sie zuerst charakterisiert wurden. Zusammengestellt nach Zumft, 1997.

Funktion	Codierende Gene	Lokalisation	Cofaktoren und prosthetische Gruppen	Organismus und Referenz (Erstbeschreibung)
Nitrat-reduktase	<i>narGHI</i>	Cytoplasma-membran	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid, Fe-S-Zentren, Häm <i>b</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Carlson et al., 1982)
Nitrat-reduktase	<i>napAB</i>	Periplasma	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid, Fe-S-Zentrum, Häm <i>c</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (Sato, 1981) ; <i>Ralstonia eutropha</i> (Siddiqui et al., 1993)
Nitrit-reduktase	<i>nirK</i>	Periplasma	Cu-Komplex	<i>Achromobacter cycloclastes</i> (Godden et al., 1991)
Nitrit-reduktase	<i>nirS</i>	Periplasma	Häm <i>c</i> und <i>d</i> ₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Horio et al., 1961)
NO-Reduktase	<i>norCB</i>	Cytoplasma-membran	Häm <i>b</i> und <i>c</i> Nichthäm-Fe	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Kastrau et al., 1994)
N ₂ O-Reduktase	<i>nosZ</i>	Periplasma	Cu-Komplex	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Zumft & Matsubara, 1982)

Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit kann von zwei verschiedenen Typen von Enzymen katalysiert werden, die sich in ihrer Lokalisation und ihren biochemischen Eigenschaften unterscheiden (Richardson et al., 2001; Stolz & Basu, 2002; Philippot, 2005). Die membrangebundene Nitratreduktase (Nar) besteht aus drei Untereinheiten. Sie besitzt einen Mo-Cofaktor (Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid), mehrere Fe-S-Zentren und eine Häm-Gruppe. Die γ -Untereinheit (NarI) ist integraler Membranbestandteil, α - und β -Untereinheit liegen auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite. Die meist aus der Oxidation organischer Elektronendonatoren stammenden Elektronen werden aus dem Ubichinon/Dihydroubichinon-Pool in der Membran auf den NarGHI-Komplex übertragen und letztendlich zur Reduktion von Nitrat verwendet, wobei pro Elektronenpaar netto zwei Protonen über die Membran ins Periplasma transloziert werden (Philippot & Højberg, 1999; Shapleigh, 2003). Die periplasmatische Nitratreduktase (Nap) ist ein Heterodimer und besitzt ähnliche prosthetischen Gruppen wie die membrangebundene Nitratreduktase. Ein Tetra-Häm-Cytochrom vom Typ *c* (NapC) fungiert als „Shuttle“, das Elektronen vom Membran-assoziierten Chinon-Pool auf den Nap-Komplex überträgt (Zumft, 1997; Moreno-Vivian et al., 1999; Shapleigh, 2003). Dabei wird jedoch vermutlich kein Beitrag zur Net-

totranslokation von Protonen und somit zur Energiekonservierung geleistet (Berks et al., 1995; Zumft, 1997; Moreno-Vivian et al., 1999).

Der Übergang von Nitrit zu NO als erster gasförmiger Verbindung wird entweder von einer Kupfer- oder einer Cytochrom *cd₁*-abhängigen Nitritreduktase (NirK bzw. NirS) katalysiert. Die Cu-abhängige Nitritreduktase ist ein Homotrimer, wobei jede Untereinheit zwei Cu-Atome enthält. Die Cytochrom *cd₁*-abhängige Nitritreduktase ist ein Homodimer mit je einer Häm-Gruppe vom Typ *c* und *d₁* pro Untereinheit (Zumft, 1997; Shapleigh, 2003). Beides sind periplasmatische Enzyme.

Die Reduktion von NO zu N₂O findet an der Außenseite der Cytoplasmamembran statt und wird von einem Komplex aus zwei integralen Membranproteinen (NorCB) durchgeführt (Kastrau et al., 1994). NorC ist ein Cytochrom vom Typ *c*, NorB enthält 2 Häm-Gruppen vom Typ *b* und ein Nichthäm-Fe (Zumft, 1997; Shapleigh, 2003).

Für die Umsetzung von N₂O zu N₂ ist die N₂O-Reduktase verantwortlich. Dabei handelt es sich um ein Cu-abhängiges, im Periplasma lokalisiertes Enzym, das wahrscheinlich als Homodimer mit vier Cu-Atomen pro Untereinheit vorliegt und vom *nosZ*-Gen codiert wird.

Die Übertragung von Elektronen auf Nir, Nor und Nos vom Ubiquinon/Dihydroubiquinon-Pool der Cytoplasmamembran erfolgt über Cytochrom *bcl*-Komplexe und andere Cytochrom *c*- oder Cu-haltige, periplasmatische Elektronencarrier (Zumft, 1997; Shapleigh, 2003). Dabei werden wie bei der membrangebundenen Nitratreduktase pro Elektronenpaar netto zwei Protonen vom Cytoplasma ins Periplasma verlagert. Am Aufbau eines Protonengradienten ist darüber hinaus ein membranintegraler NADH/H⁺-Dehydrogenase-Komplex beteiligt, der für die Regeneration des Dihydroubiquinon-Pools in der Membran sorgt.

Viele Bakterien besitzen mehr als einen der drei Typen von Nitratreduktasen Nar, Nap und Nas (Zumft, 1997; Richardson et al., 2001; Shapleigh, 2003). Von *E. coli* ist darüber hinaus eine zweite membrangebundene Nitratreduktase (NarZXY) bekannt (Iobbi et al., 1987; Iobbi-Nivol et al., 1990; Philippot & Højberg, 1999), die große Ähnlichkeit zum NarGHI-Komplex aufweist. Es wird nach wie vor angenommen, dass bei der dissimilatorischen Nitratreduktion in den meisten Fällen die membrangebundene Nitratreduktase (Nar) das für die Nitratreduktion verantwortliche Enzym ist. Der periplasmatische Nitratreduktase (Nap) wird dagegen eine mögliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Redox-Bilanz in der Zelle, beim Übergang von aerobem zu anaerobem Wachstum und bei der aeroben Denitrifikation (Bell et al. 1990; Robertson & Kuenen, 1990; Richardson & Ferguson, 1992; Berks et al., 1995; Carter et al., 1995a u. b; Castillo et al., 1996)

sowie beim Wachstum unter nitratlimitierten Bedingungen (Potter et al., 1999) zugeschrieben. Inzwischen gibt es allerdings mehrere Beispiele für Nitratrespiration bei Bakterien, die - wie etwa *Pseudomonas* sp. G-179 (Bedzyk et al., 1999), *Desulfuromusa desulfuricans* (Bursakov et al., 1995) oder *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Delgado et al., 2003) - nur eine periplasmatische Nitratreduktase besitzen oder die - wie *Rhodobacter sphaeroides* (Liu et al., 1999) - zwar beide Enzyme besitzen, bei denen jedoch die periplasmatische Nitratreduktase von essentieller Bedeutung für die Denitrifikation ist. Dies belegt, dass auch die periplasmatische Nitratreduktase (Nap) für den ersten Schritt der dissimilatorischen Nitratreduktion (sowohl bei Denitrifikation als auch bei DNRA) verantwortlich sein kann (Philippot & Højberg, 1999; Stolz & Basu, 2002). Allerdings bleibt noch zu klären, wie dieser Schritt zur Energiekonservierung beitragen kann (Stolz & Basu, 2002).

Obwohl ebenfalls zwei Typen von Nitritreduktasen existieren, besitzt nach bisherigem Wissensstand eine Spezies immer nur entweder das Cu-abhängige oder das Cytochrom *cd₁*-abhängige Enzym. Dabei besteht kein klarer Zusammenhang zwischen phylogenetischer Zugehörigkeit des Organismus und dem Typ der Nitritreduktase. Die eine oder die andere Form ist teilweise in Angehörigen der gleichen Gattung zu finden (Shapleigh, 2003). Insgesamt ist die Cytochrom *cd₁*-abhängige Nitritreduktase der häufiger vorkommende Typ (Coyne et al., 1989).

Denitrifikanten sind in terrestrischen und marinen Ökosystemen weit verbreitet (Tiedje, 1988). Sie gehören einer Vielzahl phylogenetischer Gruppen an und sind metabolisch sehr divers. Sie finden sich vor allem in der Domäne der *Bacteria* und hier innerhalb der *Proteobacteria* (α -, β -, γ -, und ϵ -) (Zumft 1992 und 1997; Shapleigh, 2003; Philippot, 2005). Aber auch unter den Gram-positiven Bakterien gibt es etliche denitrifizierende Vertreter. Darüber hinaus sind auch einige *Archaea* zur Denitrifikation befähigt (Tab. 2). Innerhalb der *Enterobacteriaceae* und bei den Fermentierern gibt es dagegen bis auf wenige Ausnahmen keine Denitrifikanten.

Mittlerweile ist bekannt, dass auch einige niedere Eukaryoten denitrifizieren können. Die Fähigkeit zur Denitrifikation wurde bei Pilzen aus den Gruppen der Fungi Imperfecti, der filamentösen Pilze und der Hefen nachgewiesen (Bollag & Tung, 1972; Bleakley & Tidje, 1982; Burth et al., 1982; Shoun et al., 1992). Allerdings ist die Denitrifikationsaktivität von Pilzkulturen im Vergleich zu der von Bakterienzellen sehr gering (Zumft, 1997). Das Endprodukt ist meist N₂O (Zumft, 1997; Shapleigh, 2003). Abgesehen von den Pilzen sind nur zwei Beispiele eukaryotischer Nitratrespiration bekannt: die Fähigkeit, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, bei anaeroben Süßwasserprotozoen der Gattung *Loxodes* (Finlay et al., 1983) und die kürzlich bei der Foraminife-

renart *Globulimina pseudospinescens* entdeckte Fähigkeit zur vollständigen Denitrifikation (Risgaard-Petersen et al., 2006).

Wesensmerkmal der Denitrifikation ist ihr Ablauf als fakultativer Prozess (Zumft, 1992). Die meisten Denitrifikanten sind aerobe heterotrophe Organismen, die unter anaeroben Bedingungen N-Oxide als alternative Elektronenakzeptoren verwenden können (Zumft, 1997; Shapleigh, 2003). In der Regel wird Expression und Aktivität der an der Denitrifikation beteiligten Enzyme in Gegenwart von O₂ gehemmt. Allerdings bestehen große Unterschiede, ab welchen O₂-Konzentrationen der Übergang von Sauerstoff- zu Nitratrespiration erfolgt. Dies reicht von Organismen wie *Paracoccus denitrificans*, der das klassische Konzept der Denitrifikation nur unter anaeroben Bedingungen repräsentiert (John, 1977), über Spezies mit einer intermediären Stellung wie z. B. einer *Alcaligenes*-Spezies, die schon bei ca. 50% Sauerstoffsättigung denitrifiziert (Krul & Veening, 1977), bis hin zu Arten, die geringe Mengen O₂ zur Denitrifikation benötigen (z. B. *Magnetospirillum magnetotacticum* (Bazylinski & Blakemore, 1983); Nitrifikanten (Zumft, 1992)) oder sogar bei voller Sauerstoffsättigung denitrifizieren. Letzterer Fall, bei dem Sauerstoff und N-Oxide simultan benutzt werden, wird als aerobe Denitrifikation bezeichnet (Zumft, 1992) und ist neben der ursprünglichen Beschreibung in *Paracoccus denitrificans* GB17 (früher *Thiosphaera pantotropha*; Robertson et al., 1988) aus einigen weiteren Studien bekannt (Bonin & Gilewicz, 1991; van Niel et al., 1992; Patureau et al., 1994; Frette et al., 1997; Ka-Jong et al., 1997). Auf der anderen Seite gibt es mit *Sulfurimonas* (bis kürzlich *Thiomicrospira*) *denitrificans* (Timmer-ten Hoor, 1975; Takai et al., 2006), *Azoarcus anaerobius* (Springer et al., 1998), *Ferroglobus placidus* (Hafenbradl et al., 1996) und *Sedimenticola selenatireducens* (Narasimharao & Häggblom, 2006) auch ein paar Beispiele von microaerophilen bzw. strikt anaeroben Denitrifikanten. Autotrophe Denitrifikanten können anorganische Schwefelverbindungen, Wasserstoff, Ammonium, Nitrit oder Eisen(II) als Elektronendonatoren verwenden (Zumft, 1997).

Vor gut 20 Jahren wurde entdeckt, dass auch Nitrifikanten zur Denitrifikation befähigt sind. Für die typischen Ammoniumoxidierer *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosomonas eutropha* wurde bei geringen Sauerstoffkonzentrationen Bildung von N₂O und N₂ mit Nitrit als Elektronenakzeptor gezeigt (Poth & Focht, 1985; Poth, 1986; Bock et al., 1995; Schmidt & Bock, 1997). Unter anaeroben Bedingungen können Wasserstoff und Ammonium (Bock et al., 1995) oder auch organische Verbindungen (Abeliovich & Vonshak, 1992; Stüven et al., 1992) als

Elektronendonatoren fungieren. Darüber hinaus ist auch von dem Nitritoxidierer *Nitrobacter winogradskyi* die Fähigkeit zur Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen bekannt (Freitag et al., 1987). Hier ist N_2O das Endprodukt.

Tab. 2: Auflistung mikrobieller Genera, die Denitrifikanten enthalten. Nach Shapleigh, 2003, verändert und ergänzt. Angaben älteren Datums zu Habitaten, metabolischen Charakteristika und Referenzen für Beispielorganismen entstammen meist Zumft, 1992 und Zumft, 1997. Angaben zu neueren Funden wurden direkt den angegebenen Quellen entnommen.

Taxon oder Gruppe	Habitat	Metabolische Charakteristika	Endprodukt (falls bekannt)	Referenz*
Archaea				
<i>Haloarcula</i>	Salzgewinnungsanlage, Salzwasser	organotroph	N_2 (so weit bekannt)	Elazari-Volcani, 1957, Gonzales et al., 1978, Juez et al., 1986
<i>Halobacterium</i>	Salzgewinnungsanlage	organotroph	N_2	Rodriguez-Valera et al., 1983
<i>Haloferarax</i>	Salzgewinnungsanlage	organotroph		Tomlinson et al., 1986
<i>Ferroglobus</i>	heiße marine Quelle	lithoautotroph, Fe(II)-Oxidation	N_2O	Hafenbradl et al., 1996
<i>Pyrobaculum</i>	heiße marine Quelle	organo- oder lithoautotroph, H_2 -Oxidation	N_2	Völkl et al., 1993
Bacteria				
Alphaproteobacteria				
<i>Agrobacterium</i>	Boden, Pflanzen	organotroph	N_2 (einigen Stämme)	Pichinoty, 1977
<i>Aquaspirillum</i>	Süßwasser	organotroph, N_2 -Fixierung	N_2O	Krieg, 1976
<i>Azospirillum</i>	Boden, Rhizospäre	organotroph, N_2 -Fixierung	N_2O , N_2	Tarrand et al., 1978, Reinhold et al., 1987, Neyra et al., 1977
<i>Blastobacter</i>	Süßwasser	organotroph	N_2	Hirsch & Müller, 1985
<i>Bradyrhizobium</i>	Boden, Pflanzen	organotroph, N_2 -Fixierung	N_2	Zablotowicz et al., 1978
<i>Gluconobacter</i>	Boden, Kläranlagen	vermutl. organotroph	vermutl. N_2	Focht & Joseph, 1974
<i>Hyphomicrobium</i>	Süßwasser, Kläranlagen	organotroph, N_2 -Fixierung	N_2	Hirsch, 1974, Urakami et al., 1995, Fesefeldt et al., 1998
<i>Magnetospirillum</i>	Sediment, Wasser	organotroph	NO , N_2O , N_2 + auch NH_4^+	Bazylinsky & Blackmore, 1983
<i>Nitrobacter</i>	Boden	chemolithotroph, mixotroph	N_2O	Freitag et al., 1987

<i>Paracoccus</i>	Boden, (Meer)wasser	chemolitho- und/ oder organotroph, H ₂ -, S-Oxidation	N ₂ O, N ₂	Verhoeven et al., 1954, Robertson & Kuenen, 1983, Harrison, 1983
<i>Pseudovibrio</i>	Meerwasser	organotroph, Fermentation	N ₂	Shieh et al., 2004
<i>Rhizobium</i>	Boden	organotroph, N ₂ -Fixierung	N ₂ O, N ₂	Daniel et al., 1982, Casella et al., 1986
<i>Rhodobacter</i>	Wasser	phototroph, N ₂ -Fixierung	N ₂ möglich	Satoh et al., 1976
<i>Rhodoplanes</i>	Belebtschlamm	phototroph	N ₂	Hiraishi & Ueda, 1994
<i>Rhodopseudomonas</i>	Wasser	phototroph, N ₂ -Fixierung	vermutl. N ₂	Klemme et al., 1980, Preuss & Klemme, 1983
<i>Roseobacter</i>	Meerwasser	aerob phototroph	N ₂ O	Shioi et al., 1988
<i>Silicibacter</i>	Meerwasser	lithoheterotroph	<i>NirS- und nosZ-Gen</i> vorhanden	González et al., 2003, Moran et al., 2004
<i>Sinorhizobium</i>	Boden	organotroph, N ₂ -Fixierung	N ₂	Daniel et al., 1982
<i>Betaproteobacteria</i>				
<i>Achromobacter</i>	Wasser, Mensch	organotroph	N ₂	Rüger & Tan, 1983, Kerstens & de Ley, 1984, Coenye et al., 2003
<i>Acidovorax</i>	Pflanzen, Belebtschlamm	organotroph	vermutl. N ₂ , <i>nirK/S-</i> und <i>nosZ</i> vorh.	Azegami et al., 1987, Heylen et al., 2006b, Copeland et al., unver.
<i>Alcaligenes</i>	Boden, Wasser, Mensch	organotroph	N ₂	Davis et al., 1969, Hendrie et al., 1974, Yabuuchi & Yano, 1981
<i>Alicyclophilus</i>	Kläranlage	organotroph	N ₂	Mechichi et al., 2003
<i>Azoarcus</i>	Boden, Sediment, Kompost, Belebtschlamm	organotroph, N ₂ -Fixierung	N ₂ O, N ₂	Zhou et al., 1995, Anders et al., 1995, Springer et al., 1998, Song et al., 1999, Mechichi et al., 2002
<i>Azonexus</i>	Klärschlamm	organotroph	N ₂	Ouan et al., 2006
<i>Bergeriella</i>	Säugetiere	organotroph	vermutl. N ₂	Berger, 1962, Xie & Yokota, 2005
<i>Brachymonas</i>	Belebtschlamm	chemoorganotroph	N ₂	Hiraishi et al., 1995
<i>Burkholderia</i>	Rhizosphäre, Mensch	organotroph	<i>NirK/S-</i> und <i>nosZ</i> -Gene vorh.	u. a. Matsuzaka et al., 2003, Nierman et al., 2004, Kim et al., 2005
<i>Brucella</i>	Säugetiere, Belebtschlamm	organotroph	<i>NirK/S-</i> und <i>nosZ</i> -Gene vorh.	Paulsen et al., 2002, del Vecchio et al., 2002, Heylen et al., 2006b

<i>Castellaniella</i>	Klärschlamm	organotroph	N ₂	Denger et al. 1997, Kämpfer et al., 2006
<i>Chromobacterium</i>	Boden, Wasser	organotroph	N ₂ O	Sneath, 1956
<i>Comamonas</i>	Belebtschlamm	organotroph	N ₂	Gumaelius et al., 2001, Etchebehere et al., 2001a
<i>Cupriavidus</i>	Boden, Wasser	chemolitho- o. chemoorganotroph, H ₂ -Oxidation	vermutl. N ₂	Davis et al., 1969, Vandamme & Coenye, 2004
<i>Dechloromonas</i>	Regenwurmdarm	organotroph	N ₂	Horn et al., 2005
<i>Denitratisoma</i>	Belebtschlamm	organotroph	N ₂	Fahrbach et al., 2006
<i>Diaphorobacter</i>	Belebtschlamm	organotroph	N ₂	Khan & Hiraishi, 2002
<i>Eikenella</i>	Mensch	organotroph	N ₂ O	Tanner et al., 1981
<i>Hydrogenophaga</i>	Boden, Schlamm, Wasser	fakultativ chemolitotroph, H ₂ -Oxidation	N ₂	Auling et al., 1978, Willems et al., 1989
<i>Janthinobacterium</i>	Boden, Wasser Pflanzen	organotroph	vermutl. N ₂	Sneath, 1984
<i>Kingella</i>	Mensch	organotroph	N ₂	Snell & Lapage, 1976
<i>Microvirgula</i>	Belebtschlamm	organotroph	N ₂	Patureau et al., 1998
<i>Neisseria</i>	Säugetiere, Mensch	organotroph	vermutl. N ₂	u. a. Véron et al., 1959, Berger, 1961
<i>Nitrosomonas</i>	Boden, Wasser, Abwasser	chemolitotroph	N ₂ O, N ₂	Poth & Focht, 1985, Poth, 1986
<i>Ochrobactrum</i>	Mensch	organotroph	vermutl. N ₂	Holmes et al., 1988a
<i>Oligella</i>	Mensch	organotroph	N ₂ O u. N ₂ ?	Rossau et al., 1987
<i>Ottowia</i>	Belebtschlamm	chemolithohetero- troph	N ₂ O	Spring et al., 2004
<i>Ralstonia</i>	Pflanzen	organotroph	vermutl. N ₂	Palleroni et al., 1970
<i>Simplicispira</i>	Süßwasser, Belebtschlamm	organotroph	vermutl. N ₂	Krieg, 1976, Grabovich et al., 2006, Lu et al., 2007
<i>Sterolibacterium</i>	Klärschlamm	organotroph	N ₂	Tarlera & Denner, 2003
<i>Thauera</i>	(Klär)schlamm	organotroph	N ₂ O, N ₂	Anders et al., 1995, Scholten et al., 1999, Mechichi et al., 2002
<i>Thermothrix</i>	heiße Quellen	fakultativ chemolithotroph	vermutl. N ₂	Caldwell et al., 1976
<i>Thiobacillus</i>		lithotroph, S-Oxidation	N ₂	Hutchinson et al., 1967, Harrison, 1983, Wood & Kelly, 1983, Kelly & Wood, 2000
<i>Vogesella</i>	Boden, Wasser, Sediment	organotroph	N ₂	McFadden & Howes, 1961, Grimes et al., 1997
<i>Zoogloea</i>	Abwasser	organotroph	N ₂	Unz, 1984

Gammaproteobacteria

<i>Beggiatoa</i>	Sediment	chemolitotroph, S-Oxidation	N ₂	Sweerts et al., 1990
<i>Bowmanella</i>	Meerwasser	organotroph	N ₂	Jean et al., 2006
<i>Halomonas</i>	Salzwasser	organotroph	N ₂ O, N ₂	Robinson & Gibbons, 1952, Franzmann et al., 1987
<i>Halospina</i>	Salzsee	organotroph	N ₂	Sorokin et al., 2006
<i>Halovibrio</i>	Salzsee	organotroph	N ₂	Sorokin et al., 2006
<i>Luteimoas</i>	Biofilter	organotroph	N ₂ O	Finkmann et al., 2000
<i>Marinobacter</i>	marine Sedimente	organotroph	N ₂	Gauthier et al., 1992, Gorshkova et al., 2003
<i>Moraxella</i>	Säugetiere, Mensch	organotroph	N ₂ O, N ₂ ?	Berger, 1961, Bøvre, 1979
<i>Pseudoalteromonas</i>	Marine Habitate	organotroph	N ₂	Enger et al., 1987
<i>Pseudomonas</i>	Boden, Wasser, Pflanzen, Mensch	organotroph	N ₂ O, N ₂	u. a. Stanier et al., 1966, Palleroni, 1984, Bonin et al., 1987
<i>Pseudoxanthomonas</i>	Biofilter, (Ab)wasser, heisse Quelle	organotroph	N ₂ O	Finkmann et al., 2000, Chen et al., 2002, Thierry et al., 2004
<i>Rugamonas</i>	Süßwasser	organotroph	N ₂	Austin & Moss, 1986
<i>Sedimenticola</i>	Sediment	organotroph	N ₂	Narasingarao & Hägglom, 2006
<i>Shewanella</i>	Meerwasser, Sediment, Belebtschlamm	organotroph	N ₂ O, N ₂ + bei <i>S.</i> <i>putrefaciens</i> auch NH ₄ ⁺	u. a. Samuelsson, 1985, Brettar et al., 2002, Xu et al., 2005, Zhao et al., 2006
<i>Stenotrophomonas</i>	Biofilter	organotroph	N ₂ O	Finkmann et al., 2000
<i>Thioalkalivibrio</i>	Salzsee	Chemolithoauto- troph, S-Oxidation	N ₂ + auch NH ₄ ⁺	Sorokin et al., 2001
<i>Zobellella</i>	Sediment	organotroph	N ₂	Lin & Shieh, 2006
Epsilonproteobacteria				
<i>Arcobacter</i>	Säugetiere	organotroph	vermutl. N ₂	Neill et al., 1985
<i>Campylobacter</i>	Mensch	organotroph	Reduktion von Nitrit	Lawson et al., 1981, Loesche et al., 1965
<i>Nitratiruptor</i>	Tiefsee	Chemolithoauto- troph, H ₂ -Oxidation	N ₂	Nakagawa et al., 2005
<i>Sulfurimonas</i> (früher <i>Thiomicrospira</i>)	Watt	Chemolithoauto- troph, S-Oxidation	N ₂	Timmer-ten Hoor, 1975, Takai et al., 2006
<i>Wolinella</i>	Rumen	mixotroph, H ₂ - Oxidation	N ₂ O → N ₂	Wolin et al., 1961, Yoshinari, 1980

Bacteroidetes				
<i>Chryseobacterium</i>	Boden, Mensch, Rohmilch, Klärschlamm	organotroph	N ₂	Holmes et al., 1984, Kämpfer et al., 2003a, Hogo et al., 2003
<i>Flavobacterium</i>	Boden, Kompost, Regenwurmdarm, Mensch	organotroph	N ₂	u. a. Holmes et al., 1988b, Bernardet et al., 1996, Horn et al., 2005
<i>Flexibacter</i>	Boden	organotroph	N ₂ + auch NH ₄ ⁺	Christensen, 1980, Jones et al., 1990
Firmicutes				
<i>Anoxybacillus</i>	Boden, Kompost	organotroph	N ₂	Yamamota et al., 2006
<i>Bacillus</i>	Boden, Wasser, Abwasser	organotroph	N ₂ O, N ₂	de Barjac & Bonnefoi, 1972, Pichinoty et al., 1983, Denariáz et al., 1989, u. a.
<i>Brevibacillus</i>	Boden	organotroph	N ₂	Baek et al., 2006
<i>Gemella</i>	Mensch	organotroph	N ₂ O, N ₂ ?	Berger & Pervanidis, 1986
<i>Paenibacillus</i>	Regenwurmdarm	organotroph	N ₂ O	Horn et al., 2005
Actinobacteria				
<i>Frankia</i>	Rhizosphäre	N ₂ -Fixierung	vermutl. N ₂	Lensi et al., 1990
<i>Dactylosporangium</i>	Boden, Labstreu	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Vobis, 2006
<i>Dermatophilus</i>	Säugetiere, Mensch	organotroph	N ₂ O	Masters et al. 1995, Shoun et al., 1998
<i>Jonesia</i>	gekochtes Ochsenblut	organotroph	vermutl. N ₂	Rocourt et al., 1987
<i>Kineosporia</i>	Pflanzen	organotroph	N ₂ O	Kudo et al., 1998, Shoun et al., 1998
<i>Micromonospora</i>	Boden, Wasser, marine Habitate	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Vobis, 2006
<i>Microtetraspora</i>	Boden	organotroph	N ₂ O	Thiemann et al., 1968, Shoun et al., 1998
<i>Nocardia</i>	Fisch	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Isik et al., 1999
<i>Pilimelia</i>	Boden, Labstreu	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Vobis, 2006
<i>Propionibacterium</i>	Rind, Abwasser	organotroph	N ₂	Swartzlander et al., 1993, Koussémon et al., 2001
<i>Saccharomonospora</i>	Boden, schimmeliges Heu	organotroph	N ₂ O	Greiner-Mai et al., 1987u. 1988, Shoun et al., 1998
<i>Saccharothrix</i>	Boden	organotroph	N ₂ O	Labeda et al., 1984, Shoun et al., 1998

<i>Spirillospora</i>	Boden	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Kroppenstedt & Goodfellow, 2006
<i>Streptomyces</i>	Boden	organotroph	N ₂ O	Shoun et al., 1998, Kämpfer, 2006
<i>Streptosporangium</i>	Boden	organotroph	N ₂ O	Couch, 1955, Shoun et al., 1998
<i>Tsakamurella</i>	Mensch	organotroph	Reduktion von Nitrit	Collins et al., 1988
Deferribacteres				
<i>Caldithrix</i>	Tiefsee	mixotroph, H ₂ -Oxidation, Fermentation	N ₂ + auch NH ₄ ⁺	Miroshnichenko et al., 2003
Tiefabzweigende				
<i>Aquifex</i>	marines Sediment	chemolithoauto- troph, H ₂ -Oxidation	N ₂	Huber et al., 1992

* teilweise spätere Umbenennung/Reklassifizierung

1.2.2.2.2 DNRA

Im Gegensatz zur Denitrifikation ist die Nitratreduktion über Nitrit zu Ammonium häufig bei Bakterien zu finden, die einen fermentativen Metabolismus haben (Tiedje, 1988; Zumft, 1997). Dazu zählen obligate Anaerobier wie *Clostridium perfringes*, *Woliniella succinogenes*, *Selenomonas ruminantium* und *Desulfovibrio desulfuricans*, aber auch fakultative Aerobier wie *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp., *Erwinia carotovora* und einige *Bacillus*-Arten (Tiedje, 1988).

Wie bei der Denitrifikation wird im ersten Schritt Nitrat zu Nitrit reduziert (siehe oben). Dabei können immerhin zwei Drittel der Energie konserviert werden, die die Oxidation organischer Substanz mit O₂ als terminalem Elektronenakzeptor liefern würde (Bonin, 1996). Das gebildete Nitrit wird anschließend zu Ammonium weiter reduziert. Dies geschieht entweder über eine cytoplasmatische Nicht-Häm-Nitritreduktase (NirB) oder eine membrangebundene Penta-Häm-Cytochrom *c*-Nitritreduktase (NrfA) (Cole, 1996; Simon, 2002; Stolz & Basu, 2002).

Nur über die von NrfA katalysierte Reaktion, die als respiratorische Ammonifikation bezeichnet wird (Simon, 2002), kann auch Energie konserviert werden. Im Zuge der Reduktion von Nitrit zu Ammonium wird ein nicht fermentierbares Substrat (meist Formiat oder H₂) oxidiert; die Elektronen zur Nitritreduktion stammen aus dem Quinol-Pool der Membran und werden über die membranintegrale Untereinheit des Nrf-Komplexes (NrfH) zu NrfA transferiert. Bei der fer-

mentativen Nitritreduktion (Simon, 2002) mittels NirB dient Nitrit dagegen als Senke für Elektronen, die sonst auf Zwischenprodukten der Fermentation übertragen würden.

Mikroorganismen, die zur respiratorischen Ammonifikation befähigt sind, kommen in den Gruppen der γ -, δ -, und ϵ -*Proteobacteria* vor. Beispiele sind *Escherichia coli*, *Desulfovibrio desulfuricans* bzw. *Woliniella succinogenes* (Simon, 2002).

Als Nebenprodukt der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium kann auch N₂O freigesetzt werden (Smith & Zimmerman, 1981; Bleakley & Tiedje; 1982; Smith, 1983), das vermutlich durch unspezifische Reaktion von Nitrit mit einer Nitratreduktase entsteht.

1.2.2.2.3 Molekularbiologische Untersuchung von Nitratreduzierern und Denitrifikanten

Da die Fähigkeit zur dissimilatorischen Nitratreduktion in einer Vielzahl taxonomischer Gruppen vorhanden ist (s. o.), sind 16S rRNA-basierte Methoden nicht geeignet, um die Verbreitung und Diversität von Nitratreduzierern und Denitrifikanten zu untersuchen. Um diese Gruppen mit molekularbiologischen Methoden in der Umwelt aufzuspüren, werden deshalb funktionelle Gene herangezogen, die für verschiedene am Prozess der Nitratreduktion/Denitrifikation beteiligte Enzyme codieren (Bothe et al., 2000; Philippot, 2005).

Primer wurden für die Gene *narG* (Gregory et al., 2000; Philippot et al., 2002), *narH* (Petri & Imhoff, 2000), *napA* (Flanagan et al., 1999), *nirK/nirS* (Braker et al., 1998; Hallin & Lindgren, 1999), *nrfA* (Mohan et al., 2004), *norB* (Braker & Tiedje, 2003) und *nosZ* (Scala & Kerkhof, 1998) entwickelt.

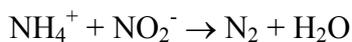
Anwendung zur Erfassung nitratreduzierender und/oder denitrifizierender Gemeinschaften in terrestrischen und marinen Systemen fanden bis jetzt v. a. *narG* (z. B. Chèneby et al., 2003; Gregory et al., 2003; Mounier et al., 2004; Deiglmayr et al., 2004; Enwall et al., 2005), *nirK/S* (Braker et al., 2001; Prieme et al., 2002; Castro-González et al., 2005; Hallin et al., 2006; Hannig et al., 2006) und *nosZ* (z. B. Scala & Kerkhof, 2000; Rösch et al., 2002; Stres et al., 2004; Enwall et al., 2005; Boyle et al., 2006; Horn et al., 2006).

1.2.3 Anammox

Vor gut 10 Jahren wurde mit der anaeroben Ammoniumoxidation (anaerobic ammonium oxidation = Anammox) (Mulder et al., 1995; van de Graaf et al., 1995; Jetten et al., 1998) ein weiterer Prozess entdeckt, der zur Bildung gasförmiger N-Verbindungen führt.

Bei der Anammox-Reaktion wird unter anaeroben Bedingungen Ammonium mit Nitrit als Elektronenakzeptor oxidiert, wobei N_2 entsteht (Gleichung 3) (van de Graaf et al., 1995 u.1997).

Gleichung 3: Anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox). Aus Op den Camp et al., 2007.



$$\Delta G_0' = - 357 \text{ kJ/mol}^{-1}$$

Die für diese Reaktion verantwortlichen Organismen wurden als Angehörige der Ordnung der Planctomycetales identifiziert (Strous et al., 1999). Da Anammox-Bakterien sehr schwer zu kultivieren sind (Egli et al., 2001; Kuenen & Jetten, 2001; Jetten et al., 2003), gibt es bisher nur wenige benannte Spezies mit Kandidatenstatus, die aus Anreicherungskulturen beschrieben wurden (Abb. 5).

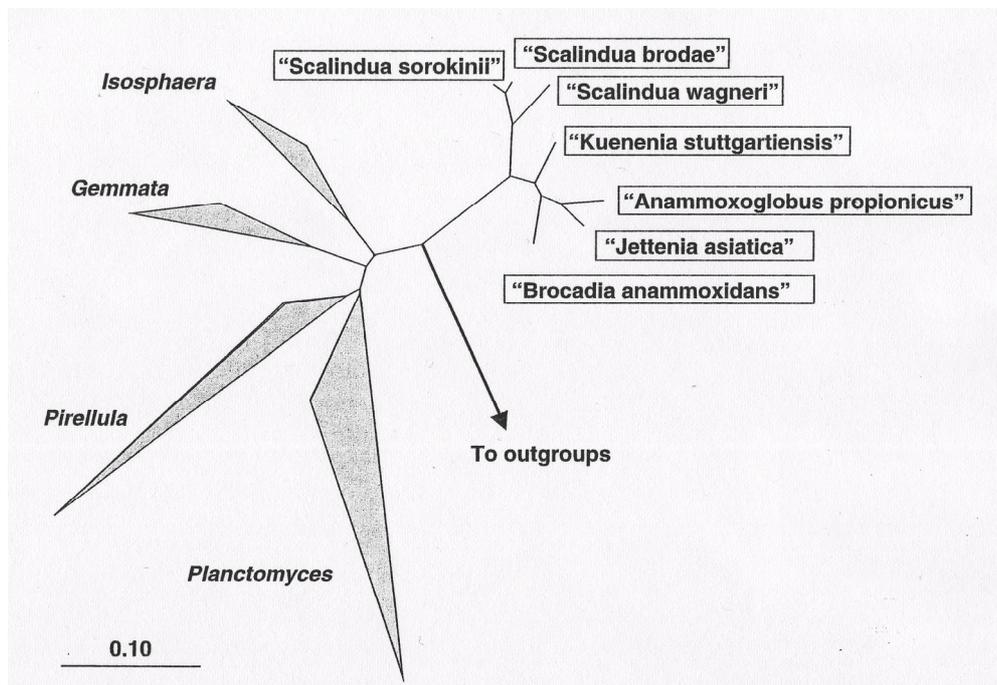


Abb. 5: Phylogenetische Position der 16S rRNA-Gensequenzen (Boxen) verschiedener Anammox-Bakterien. Skala: 10% Sequenzabweichung. Aus Op den Kamp et al., 2007.

1.3 Stickstoffentfernung in (marinen) Aquakultursystemen

Die Hauptanforderung an Biofilter in Aquakultursystemen mit Wasserrückführung ist die Entfernung von überschüssigem Stickstoff, um eine N-Akkumulation und die damit einhergehende Entstehung toxischer NH_3 - und NO_2^- -Konzentrationen (siehe Kap. 1.1.3) zu verhindern. Dies geschieht klassischerweise über die Prozesse der Nitrifikation und der Denitrifikation. In marinen Systemen sind dabei die unter anaeroben Bedingungen stattfindenden Interaktionen zwischen N- und S-Kreislauf zu berücksichtigen.

1.3.1 Pilot-System in Rehovot

Ein Beispiel für eine marine Aquakultur mit geschlossenem Wasserkreislauf ist die Pilot-Anlage in Rehovot, Israel (Abb. 6). Sie besteht aus einem Fischtank und zwei parallelen Schleifen zur Wasserwiederaufbereitung (Cytryn et al., 2003; Gelfand et al., 2003). Die aerobe Schleife vom Fischtank über einen Tropfkörper (Trickling Filter, TF) zurück in den Fischtank dient der Nitrifikation. In einer (weitgehend) anaeroben Schleife wird partikuläres Material (Futterreste, Fäzes, etc.) in einem Sedimentationsbecken (Digestion Basin, DB) gesammelt und mit der Zeit verdaut. Dabei spielen Fermentation, Denitrifikation und Sulfatreduktion eine wichtige Rolle. Das Wasser wird über einen Fließbettreaktor (Fluidized Bed Reactor, FBR), der der abschließenden Sulfidoxidation dient, in das Fischbecken zurückgeführt (für eine detailliertere Beschreibung siehe Kap. 2.1).

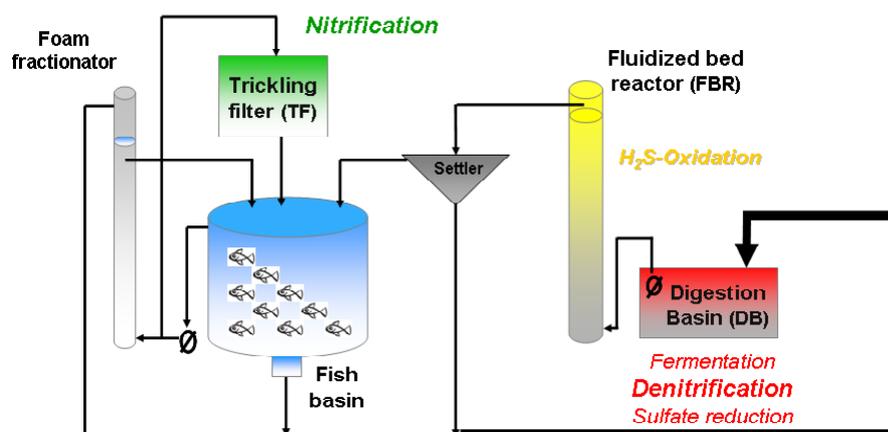


Abb. 6: Schematisches Diagramm der Pilot-Anlage mit geschlossenem Wasserkreislauf in Rehovot, Israel. Nach Cytryn et al., 2003, verändert.

1.3.2 Nitrifikation

1.3.2.1 Anforderungen an die Nitrifikantengemeinschaft

Die Entfernung von Ammonium-N über den Prozess der Nitrifikation spielt in Aquakultursystemen mit Wasserrückführung eine zentrale Rolle.

Der mit dem Ammonium im Gleichgewicht stehende Ammoniak (siehe Kap. 1.1.3) ist das Hauptendprodukt des Proteinstoffwechsels bei Fischen und wird beständig über die Kiemen ausgeschieden (Eddy, 2005). Dies führt zum periodischen Auftreten von Ammoniumpeaks nach dem Füttern (Abb. 7).

Andererseits ist NH_3 für aquatische Organismen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen toxisch (siehe Kap. 1.1.3). Um die Entstehung toxischer NH_3 -Konzentrationen zu vermeiden, muss die Akkumulation von Ammonium verhindert werden. Die Herausforderung für ein nitrifizierendes Konsortium ist deshalb, einerseits schon unter sehr niedrigen Substratkonzentrationen zu funktionieren, andererseits Ammoniumpeaks nach dem Füttern effizient zu entfernen.

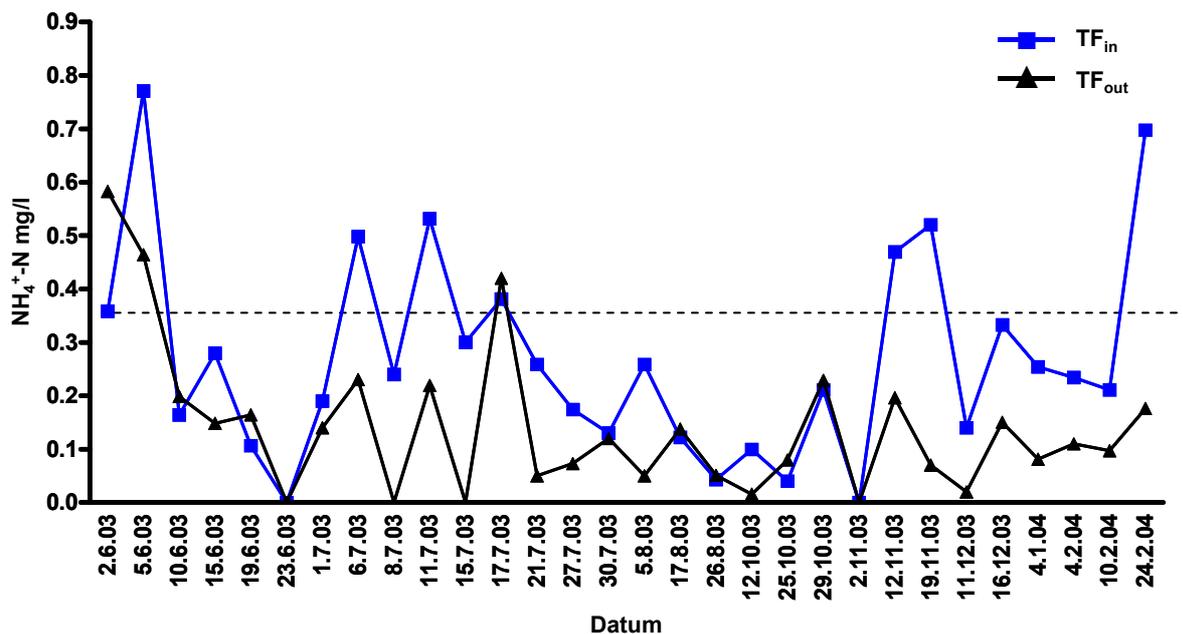


Abb. 7: Ammoniumkonzentrationen im Wasser der Pilotanlage in Rehovot eine Stunde nach dem Füttern vor (Quadrate) und nach (Dreiecke) Passage des Tropfkörpers. Die durchschnittlich im Fischtank vorherrschenden NH_4^+ -Konzentrationen liegen um $20 \mu\text{M}$ bzw. $0,36 \text{ mg/l}$ (gestrichelte Linie). Koch et al., unveröffentlichte Daten.

1.3.2.2 Wissen über Nitrifikanten in Biofiltern zur Abwasserbehandlung

Ammonium- und nitritoxidierende Bakterien in Süßwassersystemen (sowohl in Kläranlagen im Originalmaßstab als auch in Reaktoren im Labormaßstab) wurden innerhalb des letzten Jahrzehnts im Detail untersucht (Wagner & Loy, 2002 und Wagner et al., 2002). In den meisten Fällen waren Nitrosomonaden (inklusive *Nitrosococcus mobilis*) verantwortlich für die Ammoniumoxidation, während sich Mitglieder des Phylums *Nitrospira* als die in situ relevanten Nitritoxidierer entpuppten.

Ergebnisse aus Studien mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zeigten, dass nitrifizierende Biofilme und Belebtschlamm häufig von einer Ammoniumoxidiererart dominiert werden. Zum Beispiel wurden Populationen mit Verwandtschaft zu *N. europaea* (Okabe et al., 1999a; Schramm et al., 1996), *Nc. mobilis* (Juretschko et al., 1998; Juretschko et al., 2002) oder, in einem Fall, auch Mitglieder des Genus *Nitrospira* (Schramm et al., 1998) gefunden. Bei nitrifizierenden Biofilmen aus „Sequencing Batch“-Biofilmreaktoren (SBR) wurde dagegen die Koexistenz von mehreren Ammoniumoxidierer-Spezies festgestellt (Daims et al., 2001b; Gieseke et al., 2001). Dies kann teilweise mit der Heterogenität eines Biofilms selbst erklärt werden. Denn die zahlreichen Gradienten (z. B. Sauerstoff, Nährstoffe) und die komplexe räumliche Aufteilung innerhalb eines Biofilms führen zur Ausbildung zahlreicher ökologischer Nischen, die von Organismen mit verschiedenen Wachstumsansprüchen besetzt werden können (= räumliche Nischenbildung). Ein weiterer Faktor, der berücksichtigt werden muss, sind die durch periodisch wechselnde Betriebsbedingungen eines SBR über die Zeit variierenden Umweltbedingungen, die eine zeitliche Nischenbildung bewirken können.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit Nitrifikanten-Gemeinschaften in marinen Biofiltern befassen. Frühe Untersuchungen zeigten, dass sich die für die Ammoniumoxidation verantwortlichen Bakterien in Süßwasseraquarien von denen in Salzwasseraquarien unterscheiden (Hovanec & Delong, 1996). In Salzwasseraquarien schienen *Nitrosomonas europaea* und verwandte Phylotypen die aktiven AOB zu sein. Zu diesem Zeitpunkt konnten jedoch weder die Ammoniumoxidierer in den Süßwasseraquarien noch die Nitritoxidierer in beiden Aquarientypen identifiziert werden. Spätere Studien (Hovanec et al., 1998; Burrell et al., 2001) konzentrierten sich hauptsächlich auf die Identifikation der Nitrifikanten-Gemeinschaft in Süßwasseraquarien. Während der letzten Jahre wurde die Präsenz von *Nitrosomonas cryotolerans*-, *Nitrosomonas marina*-, *Nitrosomonas aestuarii*- und *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten AOB (Tal et al., 2003; Grommen et al., 2005; Itoi et al., 2006) und *Nitrospira marina*-verwandten NOB (Tal et

al., 2003) in Biofiltern mariner Aquakulturanlagen oder Aquarien nachgewiesen. Darüber hinaus wurde kürzlich der zu den Crenarchaeen gehörende Ammoniumoxidierer „*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*“ aus einem marinen Aquarium isoliert (Könnecke et al., 2005), worauf *amoA*-Gene von Archeen auch in marinen Sedimenten und Belebtschlamm entdeckt wurden (Francis et al., 2005; Park et al., 2006). Allerdings gibt es bisher keine quantitativen Daten zur Struktur von Nitrifikanten-Gemeinschaften in marinen Biofiltern. Teilweise wurde die Nitrifikanten-Diversität basierend auf einigen wenigen Klonsequenzen beschrieben und die in situ-Relevanz der genannten Spezies bleibt unklar.

Unter den kultivierten Ammoniumoxidierer-Spezies ist ein bestimmter Salzgehalt essentiell für *N. halophila*, *Nc. mobilis*, *N.marina*, *N. aestuarii*, *N. cryotolerans*, *Nc. oceani* und *Nc. halophilus*. Die anderen beschriebenen Spezies benötigen kein Salz zum Wachsen (Koops et al., 2003). Allerdings sind alle von ihnen bis zu einem gewissen Grade salztolerant, was von 0,6% (*Nitrosospira tenuis*) bis 10,5% NaCl (*Nitrosococcus halophilus*) reicht. Salzgehalte, wie sie im Pilotsystem von Rehovot (siehe Kap. 1.3.1 und 2.1) vorliegen (ungefähr 2%), scheinen deshalb für eine Vielzahl von Ammoniumoxidierern tolerabel zu sein. Von den wenigen beschriebenen Nitritoxidierern sind *Nitrococcus mobilis*, *Nitrospina gracilis* und *Nitrospira marina* obligat halotroph, während *Nitrospira moscoviensis* und die meisten *Nitrobacter*-Spezies kein Salz benötigen (Koops & Pommenering-Röser, 2001).

Erste Untersuchungen zu den Ammoniumoxidierern im Tropfkörper des Rehovot-Systems sprechen für eine stabile AOB-Population, die sich aus mehreren Spezies zusammensetzt (Koch et al., unveröffentlicht; siehe auch Kap. 3.1.2.1). Zu den Nitritoxidierern gibt es dagegen noch keine Erkenntnisse.

1.3.3 Denitrifikation

1.3.3.1 Notwendigkeit der Nitratentfernung in geschlossenen Systemen

Während die meisten Aquakultursysteme mit geschlossenem Wasserkreislauf mittlerweile nitrifizierende Filter nach gut etablierten Protokollen besitzen, sind denitrifizierende Filter noch im Entwicklungsstadium (van Rijn et al., 2006). Im Gegensatz zu Ammoniak und Nitrit ist Nitrat für aquatische Organismen relativ wenig toxisch (siehe Kap. 1.1.3), was eine effiziente Nitratentfernung nicht zwingend notwendig erscheinen lässt. In geschlossenen Systemen kann es jedoch zur Akkumulation relevanter Nitratkonzentrationen kommen (van Rijn et al., 2006).

Abgesehen von dem direkten toxischen Effekt hoher Nitratkonzentrationen wird Nitratentfernung in Systemen mit geschlossenem Wasserkreislauf aus folgenden Gründen durchgeführt: (1) Umweltauflagen in Verbindung mit der Einleitung von Abwässern, (2) Verhinderung der Bildung hoher Nitritkonzentrationen durch unvollständige „passive“ Nitratreduktion, (3) Stabilisierung der Pufferkapazität und (4) gleichzeitige Entfernung von organischem Kohlenstoff, Orthophosphat und Sulfid aus dem Wasser der Aquakultur im Verlauf der biologischen Denitrifikation (van Rijn, 1996; van Rijn et al., 2006).

1.3.3.2 Wissen über Denitrifikanten in Biofiltern zur Abwasserbehandlung

Die meisten Versuche, Denitrifikanten aus Belebtschlamm zu identifizieren, basieren auf kultivierungsabhängigen Studien (Wagner et al., 2002). Mitglieder der Genera *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus* und *Hyphomicrobium* wurden als Teil der denitrifizierenden, mikrobiellen Flora von Kläranlagen isoliert (Sperl & Hoare, 1971; Attwood & Harder, 1972; Knowles, 1982; Schmider & Ottow, 1986; Vedenina & Govorukhina, 1988). In Belebtschlamm aus verschiedenen Kläranlagen wurden denitrifizierende *Proteobacteria* der Familien *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae* und *Pseudomonadaceae* gefunden (Magnusson et al., 1998). Denitrifikanten, die aus einem Reaktor zur Behandlung von Deponiesickerwasser isoliert wurden (Etchebehere et al., 2001b u. 2002), gehörten den Genera *Thauera*, *Alcaligenes*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *Bradyrhizobium* und *Paracoccus* an.

Eine kürzlich veröffentlichte, groß angelegte Kultivierungsstudie (Heylen et al., 2006a) berichtet die Isolation denitrifizierender Bakterien aus den Gruppen der *Alphaproteobacteria* (Genera *Brucella*, *Ochrobactrum* (*Brucellaceae*); Genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Rhizobiaceae*); Genera *Paracoccus*, *Pannonibacter* (*Rhodobacteraceae*); Genus *Methylobacterium* (*Methylobacteraceae*)), *Betaproteobacteria* (Genera *Acidovorax*, *Alicyclophilus*, *Comamonas*, *Diaphorobacter* (*Comamonadaceae*); Genera *Azospira*, *Azovibrio*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Zoogloea* (*Rhodocyclaceae*); Genus *Aquaspirillum* (*Neisseriaceae*)), *Gamma*proteobacteria (Genus *Pseudomonas*), *Epsilon*proteobacteria (Genus *Arcobacter*), *Firmicutes* (Genera *Bacillus*, *Trichococcus*, *Enterococcus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*) und *Bacteroidetes* (Genus *Chryseobacterium* (*Flavobacteriaceae*)). Darüber hinaus werden immer wieder einzelne Denitrifikantenspezies aus Belebtschlamm isoliert und beschrieben (siehe Kap. 1.2.2.2.1, Tab. 2).

Die bloße Tatsache, dass eine Spezies aus einer Umweltprobe isoliert wurde, sagt jedoch nichts über ihre Abundanz und Aktivität in situ aus. Deshalb wurden in jüngerer Zeit Versuche

unternommen, zuvor isolierte Denitrifikanten mittels spezifischer Sonden in situ auszumachen (Neef et al., 1996; Yoshie et al., 2004a). Dies führte zur Identifikation von *Paracoccus* spp. und *Hyphomicrobium* spp. bzw. Spezies der Genera *Pseudomonas*, *Halomonas* und *Colwellia* als am Denitrifikationsprozess maßgeblich beteiligten Organismengruppen. Ferner wurde die Aktivität zuvor durch Stable Isotope Probing (Radajewski et al., 2000) oder Quantifizierung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH; siehe Kap. 2.7.11.1) als relevant erachteter Gruppen durch die Kombination von Mikroautoradiographie (MAR) und FISH nachgewiesen (Wagner et al., 2002; Juretschko et al., 2002; Ginige et al., 2005). Dabei wurden die Familien *Comamonadaceae* und *Rhodocyclaceae* (v. a. *Thauera*-*Azoarcus*-Gruppe) als Gruppen mit wichtiger Rolle bei der Denitrifikation in Belebtschlamm identifiziert.

Es existieren auch einige Studien zum Denitrifikationsprozess bei der Behandlung salzhaltiger Abwässer (Yang et al., 1995; Dahl et al., 1997; Vredenburg et al., 1997; Glass & Silverstein, 1999; Carerra et al., 2003) sowie bei Meerwasseraquarien (Grguric et al., 2000). In einigen Fällen ging die Denitrifikationsrate mit steigender Salinität zurück, Denitrifikation fand bei 2 bzw. 3% Salzgehalt aber noch statt (Yang et al., 1995, Glass & Silverstein, 1999); in einem Fall war die Denitrifikation bis zu Chloridkonzentrationen von 45 mg/l (= 4,5%) stabil (Vredenburg et al., 1997). In einem mit Methanol gespeisten Denitrifikationsreaktor zur Behandlung von Aquariumswasser wurde mit molekularbiologischen Methoden *Methylophaga*-verwandte Spezies als dominante Gruppe identifiziert (Labbé et al., 2003); isoliert wurden Vertreter der Genera *Hyphomicrobium* und *Paracoccus* und der Familie der *Phyllobacteriaceae*. Die Genera *Pseudomonas*, *Halomonas* und *Colwellia* spielen vermutlich eine Rolle bei der Behandlung saliner industrieller Abwässer (Yoshie et al., 2004a; siehe oben). Kürzlich (Yoshie et al., 2006a) wurden aus Reaktoren, die bei einer Salinität von 2% betrieben wurden, Denitrifikanten der Genera *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Pseudomonas* und *Halomonas* isoliert; in Reaktoren, die bei einer Salinität von 10% betrieben wurden, wurden Vertreter der Genera *Marinobacter* und *Halomonas* gefunden. Darüber hinaus wurde von der gleichen Arbeitsgruppe festgestellt, dass die Diversität von Nitritreduktasegenen denitrifizierender Bakterien in den denitrifizierenden Reaktoren geringer ist als in Böden (Yoshie et al., 2004b), wofür u. a. die erhöhte Salinität verantwortlich gemacht wird.

Aus marinen Aquakulturen gibt es einige wenige Studien, die mittels 16S rRNA-basierter Analyse (Klonierung, DGGE) einen Gesamteindruck der vorhandenen bakteriellen Population zu gewinnen versuchten, was auch Denitrifikanten mit einschließt (Cytryn et al., 2003; Tal et al.,

2003; Itoi et al., 2006). Speziell zu Denitrifikanten in marinen Aquakultursystemen gibt es jedoch bisher keine Untersuchungen.

1.3.4 Wechselwirkungen zwischen N- und S-Kreislauf unter anaeroben Bedingungen

Ein Problem bei der Behandlung von Abwässern aus marinen Systemen ist der hohe Sulfatgehalt. Unter anaeroben Bedingungen findet Sulfatreduktion statt und es entsteht Sulfid (H_2S) (Cytryn et al., 2003 und 2005a). Sulfid ist schon in sehr geringen Konzentrationen toxisch für Fische und andere aquatische Organismen (siehe Kap. 1.1.3), aber auch für viele Mikroorganismen (Reyes-Avila et al., 2004).

Bei Denitrifikanten hemmt Sulfid die Reduktion von NO zu N_2O , v. a. aber von N_2O zu N_2 , was in Böden, Sedimenten und denitrifizierenden Reaktoren beobachtet (Sørensen, 1978; Tam & Knowles, 1979; Percheron et al., 1998; Manconi et al., 2006a; Senga et al., 2006) und an Reinkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* (Tam & Knowles, 1979) und *P. fluorescens* (Sørensen et al., 1980) bestätigt wurde. Darüber hinaus kann durch den Einfluss von Sulfid eine Verschiebung der Denitrifikation hin zum Prozess der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) verursacht werden (Brunet & Garcia-Gil, 1996; Christensen et al., 2000 u. 2003; An & Gardner, 2002). Andererseits kann durch die Gegenwart von Nitrat eine unerwünschte Sulfidbildung weitgehend unterdrückt werden.

Der inhibitorische Effekt von Nitrat auf die H_2S -Bildung durch sulfatreduzierende Bakterien in der Abwasserbehandlung wurde bereits 1929 erkannt (Fales, 1929). Seither wurde die vorübergehende oder langfristige Hemmung der Sulfidbildung durch Nitratzugabe bei Abwässern verschiedener Herkunft (Allen, 1949; Beardsley et al., 1958; Carpenter, 1932; Heukelekian, 1943; Poduska & Andersdon, 1981) und in Reisfeldern (Takai & Kamura, 1966) festgestellt. In jüngerer Zeit wurden etliche Studien zur Kontrolle der Sulfidbildung durch Nitratzugabe in Ölservois durchgeführt (z. B. Jenneman et al., 1986 und 1999; Hitzman et al., 1995; McInerney et al., 1992 und 1996; Reinsel et al., 1996; Nemati et al., 2001; Davidova et al., 2001; Myhr et al., 2002). Einige Arbeiten waren auch auf die Abwasserbehandlung ausgelegt (Jobbagy et al., 1994; Bentzen et al., 1995; Okabe et al., 1999b und 2003). Die eingesetzten Nitratkonzentrationen reichten von unter 1mM (Myhr et al., 2002; Okabe et al., 2003) bis knapp 60 mM (Jenneman et

al., 1986) und hatten in Abhängigkeit von Nitratdosierung, Sulfatkonzentration, zugesetzten C-Quellen, etc. einen unterschiedlich starken und langanhaltenden Effekt.

Als Erklärung für die biogene Unterdrückung der H₂S-Bildung durch Nitrat wurden mehrere Mechanismen angeführt, die nach wie vor kontrovers diskutiert werden (de Lomas et al., 2006). Vorgeschlagen wurden: (1) verstärkte Oxidation von Sulfid zu Sulfat mit Nitrat als Elektronenakzeptor durch chemolithotrophe Bakterien wie *Thiobacillus*-Spezies oder *Thiomicrospira* sp. Stamm CVO, (2) Interspezies-Konkurrenz um Elektronendonatoren wie Acetat u. ä. zwischen Denitrifikanten und Sulfatreduzierern, (3) bevorzugte Nutzung von Nitrat durch Sulfatreduzierer und (4) Hemmung der Sulfidproduktion durch Intermediate der Nitratreduktion wie NO₂⁻, NO und N₂O, die das Redoxpotential anheben (Nemati et al., 2001; Okabe et al., 2003). An künstlichen Biofilmen aus Belebtschlamm wurde gezeigt, dass die Hauptursachen für eine verminderte H₂S-Produktion in Gegenwart von Nitrat (oder Nitrit) die Konkurrenz zwischen heterotrophen Nitratreduzierern und Sulfatreduzierern um eine gemeinsame C-Quelle sowie die verstärkte Oxidation des produzierten Sulfids mit NO₃⁻ und NO₂⁻ als Elektronenakzeptoren sind (Okabe et al., 2003). Passend dazu wurde in mehreren Ölreservoir-Studien nach Nitratzugabe ein Populationsanstieg bei den autotrophen sulfidoxidierenden und/oder den heterotrophen Denitrifikanten (Telang et al., 1997; Jenneman et al., 1999; Eckford & Fedorak 2002a und 2002b) beobachtet. Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Sulfatreduzierern (*Desulfovibrio*-Stämme, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfobacterium autotrophicum* und *Desulfobacter postgatei*) und einem sulfidoxidierenden Denitrifikanten (*Thiomicrospira* sp. Stamm CVO) zeigten, dass darüber hinaus eine direkte Hemmung der Sulfatreduzierer durch das im Zuge der Nitratreduktion gebildete Nitrit möglich ist (Greene et al., 2003; Haveman et al., 2005). In letzter Zeit durchgeführte Bioreaktor-Studien demonstrierten, dass die simultane Entfernung von Sulfid und Nitrat unter Beteiligung sulfidoxidierender Denitrifikanten möglich ist (Kim & Son, 2000; Reyes-Avila et al., 2004; de Lomas et al., 2006; Manconi et al., 2006b).

Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass zu starke Nitratakkumulation in einer marinen Aquakultur zwar verhindert werden sollte (siehe Kap. 1.1.3), ein relativ hoher Nitratlevel im Wasser jedoch günstige Auswirkungen auf die Systemstabilität hat, da er hilft, H₂S-Bildung zu vermeiden.

1.4 Zielsetzungen

Aufgrund des steigenden Fischbedarfs bei gleichzeitigem Rückgang der Wildfischbestände wird mehr und mehr dazu übergegangen, auch marine Fischarten in Aquakultur zu züchten. Wirtschaftliche und ökologische Gründe machen eine Entwicklung von der extensiven Nutzung von Küstengewässern hin zu intensiveren Praktiken nötig. Den Idealfall stellt die Zucht in Aquakultursystemen mit vollständigem Wasserrecycling dar. Als kostengünstigste Lösung zur Wasserwiederaufbereitung bieten sich Biofilter an. Funktionierende Systeme auch für den marinen Bereich existieren bereits seit etlichen Jahren, sind bisher jedoch v. a. von der organismischen Seite her nur wenig erforscht. Für die Optimierung von Filtersystemen ist jedoch ein tieferes Verständnis der Biologie und Ökologie der beteiligten mikrobiellen Populationen unerlässlich.

Deshalb widmet sich diese Arbeit dem Stickstoffkreislauf in einer marinen Aquakultur mit vollständigem Wasserrecycling. Die Aufmerksamkeit gilt dabei in erster Linie den an den Prozessen der Nitrifikation und der Nitratreduktion/Denitrifikation beteiligten Organismengruppen.

1.4.1 Nitrifikation

Basierend auf dem Wissen über Nitrifikanten in Süßwassersystemen und aus den bereits vorliegenden ersten Ergebnissen vom Tropfkörper des Rehovot-Systems (s. o.) lässt sich folgende Hypothese aufstellen:

Die AOB-Population im Tropfkörper dieser marinen Aquakultur besteht aus mehreren koexistierenden Spezies. Die Koexistenz beruht möglicherweise auf der Heterogenität des nitrifizierenden Biofilms an sich (räumliche Einnischung) und/oder den periodischen Schwankungen in der Substratkonzentration. Diese Schwankungen können bewirken, dass sich eine Population mit hoher und eine Population mit geringerer Substrataffinität nebeneinander etablieren, wobei die eine schon bei den normalerweise vorherrschenden, sehr geringen Ammoniumkonzentrationen aktiv ist, die andere erst während der Ammoniumpeaks nach dem Füttern (zeitliche Einnischung).

Im Hinblick auf den Prozess der Nitrifikation sind die Ziele deshalb:

- (1) Die Identifikation und Quantifizierung der für den Prozess der Nitrifikation verantwortlichen Ammonium- und Nitritoxidierer im Tropfkörper der Anlage.
-

-
- (2) Die Untersuchung von Struktur und räumlicher Verteilung der Nitrifikantengemeinschaft innerhalb des Tropfkörperbiofilms.
 - (3) Die Ermittlung von Aktivität und Reaktionskinetik der Ammoniumoxidierer in situ.

1.4.2 Nitratreduzierende Prozesse

Da zu den nitratreduzierenden Prozessen in marinen Aquakultursystemen zu Beginn dieser Arbeit kaum Erkenntnisse vorlagen, war das Hauptziel dieses Teils eine umfassende Beschreibung der nitratreduzierenden Prozesse und Populationen, aus der sich Hypothesen und experimentelle Ansätze für weitergehende Studien ableiten lassen.

Zu erwarten ist ein Vorkommen von Denitrifikation und DNRA, während der Anammox-Prozess aufgrund der hohen Sulfidgehalte vermutlich keine große Rolle spielt. Darüber hinaus ist eine ausgeprägte Wechselwirkung zwischen N- und S-Kreislauf sehr wahrscheinlich: einerseits ist eine Beeinträchtigung nitratreduzierender Prozesse durch hohe Sulfidkonzentrationen, andererseits eine H₂S-Entfernung durch sulfidoxidierende Denitrifikanten zu erwarten.

Die Ziele im Hinblick auf Nitratreduktion und Denitrifikation sind:

- (1) Die Quantifizierung der nitratreduzierenden Prozesse DNRA, Denitrifikation und Anammox.
 - (2) Die Identifikation von nitratreduzierenden/denitrifizierenden Organismen durch
 - die Isolierung von Nitratreduzieren und Denitrifikanten aus dem System und
 - die kultivierungsunabhängige Analyse anhand funktioneller Gene.
 - (3) Die Untersuchung des Einflusses von Sulfid auf den Prozess der Nitratreduktion/Denitrifikation an DB-Schlamm und ausgewählten Isolaten.
-

2 Material und Methoden

Als Modellsystem für eine Aquakultur mit geschlossenem Wasserkreislauf diente eine kleine Pilotanlage, bei der das Wasser aus dem Fischtank zur Wiederaufbereitung kontinuierlich über mehrere Biofilter zirkulierte (siehe Kap. 1.3.1 und 2.1).

Um ein möglichst umfassendes Bild der Struktur und Funktion der untersuchten mikrobiellen Nitrifikanten- und Denitrifikantengemeinschaften zu bekommen, wurde ein breites Methodenspektrum angewandt. Zum Einsatz kamen physikalisch-chemische Analytik, in situ-Messungen mit Mikrosensoren, prozessorientierte Inkubationsversuche, klassische mikrobiologische Methoden sowie molekularbiologische und molekularökologische Methoden.

Ein Teil der Untersuchungen wurde von Projektpartnern aus Israel oder aus Bremen durchgeführt. Sofern für den Gesamtzusammenhang erforderlich, werden diese Ergebnisse hier mit aufgeführt.

2.1 Pilot-System mit vollständigem Wasserrecycling

Bei dem untersuchten Aquakultursystem handelt es sich um eine Pilotanlage mit geschlossenem Wasserkreislauf. Sie wurde in Rehovot, Israel betrieben und verband den Prozess der Nitrifikation mit der Behandlung von abgesetztem Schlamm (Cytryn et al., 2003; Gelfand et al., 2003).

Die Anlage bestand aus einem Fischtank (2,3 m³) und zwei parallelen Schleifen zur Wasseraufbereitung (Abb. 6 und Abb. 8). In einer aeroben Schleife wurde Wasser aus dem Fischtank über einen Tropfkörper (Trickling Filter, TF; 1m³) zurück in den Tank geleitet. Hier fand die Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat statt (= Nitrifikation). In einer zweiten, überwiegend anaeroben Schleife wurde der abgesetzte Schlamm aus dem Fischtank in einem Sedimentationsbecken (Digestion Basin, DB; 1 m³) gesammelt, wo der Abbau organischer Substanz durch Prozesse wie Fermentation, Denitrifikation und Sulfatreduktion stattfand. Das dabei gebildete Sulfid wurde anschließend in einem nachgeschalteten Fließbettreaktor (Fluidized Bed Reactor, FBR; 6,25 l) reoxidiert. Der Schaumabscheider (Foam Fractionator) diente dem Herausfiltern gelöster und suspendierter organischer Substanz im Fischpool, die ebenfalls dem Sedimentationsbecken zugeführt wurde. Im Settler wurde aus dem FBR mitgeführtes organisches Material abgefangen und ebenfalls in das Absetzbecken zurückgeführt.

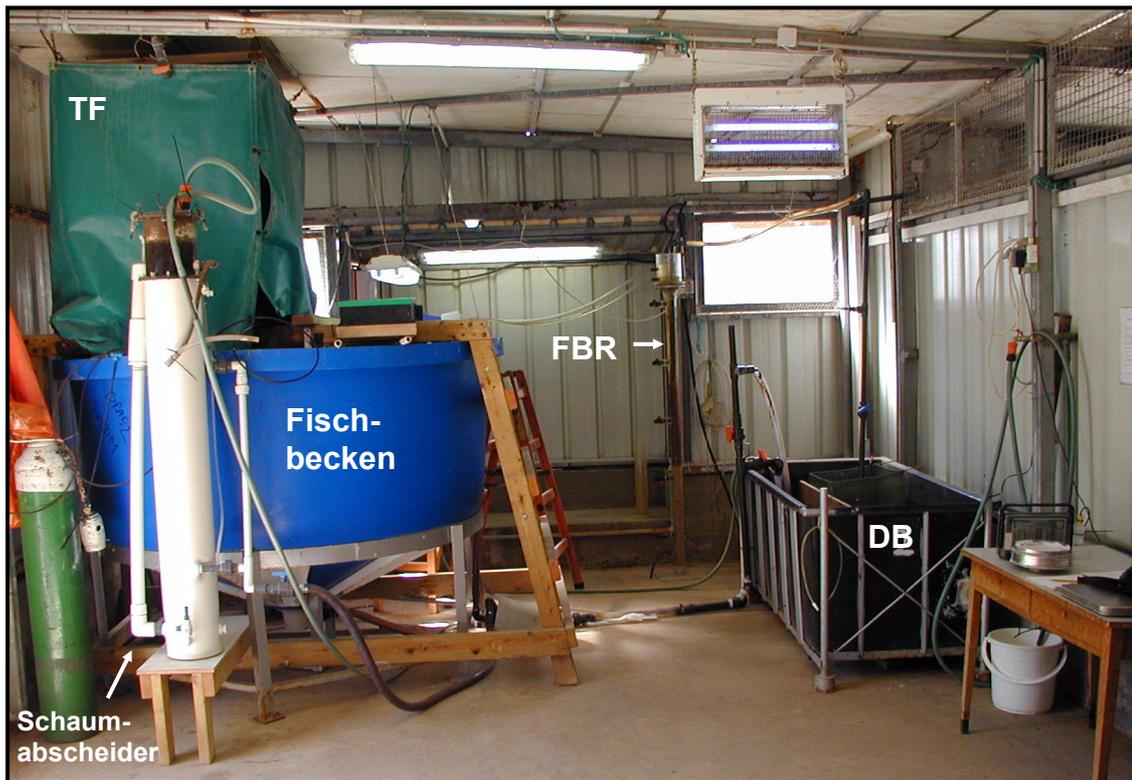


Abb. 8: Pilot-Anlage mit geschlossenem Wasserkreislauf in Rehovot, Israel. Foto: E. Cytryn.

Das System wurde mit künstlichem Seewasser betrieben. Dazu wurde Leitungswasser mit Rotes Meer Salz (Red Sea Pharm Ltd., Eilat, Israel) versetzt. Die Salinität wurde bei ca. 20 psu gehalten. Zeitweise war das System mit Goldbrasse (*Sparus aurata*) besetzt. Auch während sich keine Fische im System befanden (Start-up-Phase, etc.), wurden täglich 100 - 200 g Futter (Matmoor Ltd., Ashod, Israel) zugesetzt, das 45% Fett und 19% Protein enthielt.

2.1.1 TF

Der Tropfkörper bestand aus 1 m³ Querstrom-Material aus PVC mit einer spezifischen Oberfläche von 240 m²/m³ (Jerushalmi Ltd., Ashod, Israel). Der Filter wurde kontinuierlich von oben mit Wasser aus dem Fischtank berieselt (Flussrate: 60 ± 20 l/min). Normalerweise waren die am Zulauf gemessenen Ammoniumkonzentrationen sehr gering (~ 20 µM), während Peaks nach dem Füttern Konzentrationen von bis zu 100 µM erreichten (Gelfand et al., 2003). Nach der Filterpassage gemessene Werte reichten von 6 - 42 µM, was einer Reduktion um durchschnittlich 30 µM entspricht.

2.1.2 DB

Als Sedimentationsbecken diente eine Polyethylenwanne mit den Abmessungen 1,8 x 0,8 x 0,7 m und einem Arbeitsvolumen von 0,4 - 0,5 m³ (Cytryn et al., 2003; Gelfand et al., 2003). Vom Ablauf am Boden des Fischtanks wurde kontinuierlich stark mit organischem Material angereichertes Wasser abgezogen und in das Absetzbecken eingeleitet. An der gegenüberliegenden Seite wurde wieder Wasser von der Oberfläche abgepumpt und in den FBR übergeleitet (Abb.9).

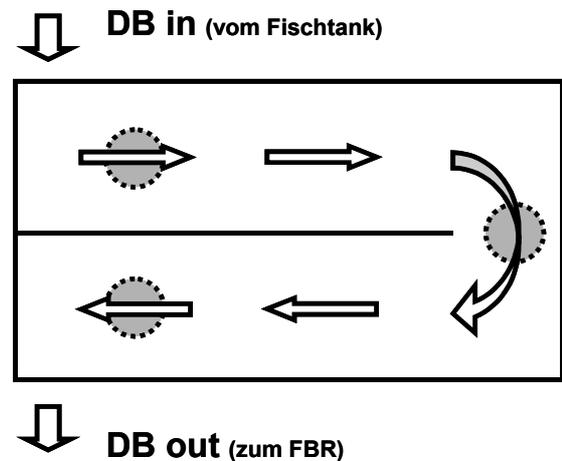


Abb. 9: Schematische Zeichnung des Sedimentationsbeckens. Die Pfeile geben die Fließrichtung des Wassers an. Die Kreise markieren die Probenahmepunkte nahe des Einlasses (DB, in), in der Mitte des Beckens (DB, m) und nahe des Auslasses (DB, out).

Bei den meisten chemischen Parametern wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Schlammschicht und darüberliegender Wasserphase festgestellt (Cytryn et al., 2003; Abb. 10). In der Wasserphase (T = top u. M = middle) waren alle Parameter an den 3 Messpunkten Einlass, Mitte und Auslass in etwa gleich. Sauerstoff-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen waren relativ hoch. Sulfid-, Ammonium- und Phosphatkonzentrationen waren vergleichsweise gering. Die Sulfatkonzentration lag bei ca. 14 mM, der pH-Wert bei 7,5. Die Schlammschicht (B = bottom) am Einlass und in der Mitte des DB zeichnete sich durch die im Vergleich zur Wasserphase hohen Sulfid-, Ammonium- und Phosphatkonzentrationen und die geringen Sauerstoff-, Nitrat-, Nitrit- und Sulfatwerte aus. Am Auslass waren die Unterschiede meist weniger ausgeprägt. Die Nitrat- und Sulfatkonzentrationen betragen dort ca. 6 bzw. 13 mM, Sulfid wurde kaum gebildet. Der pH-Wert war an den ersten beiden Messpunkten niedriger, am Auslass etwas höher als in der Wasserphase.

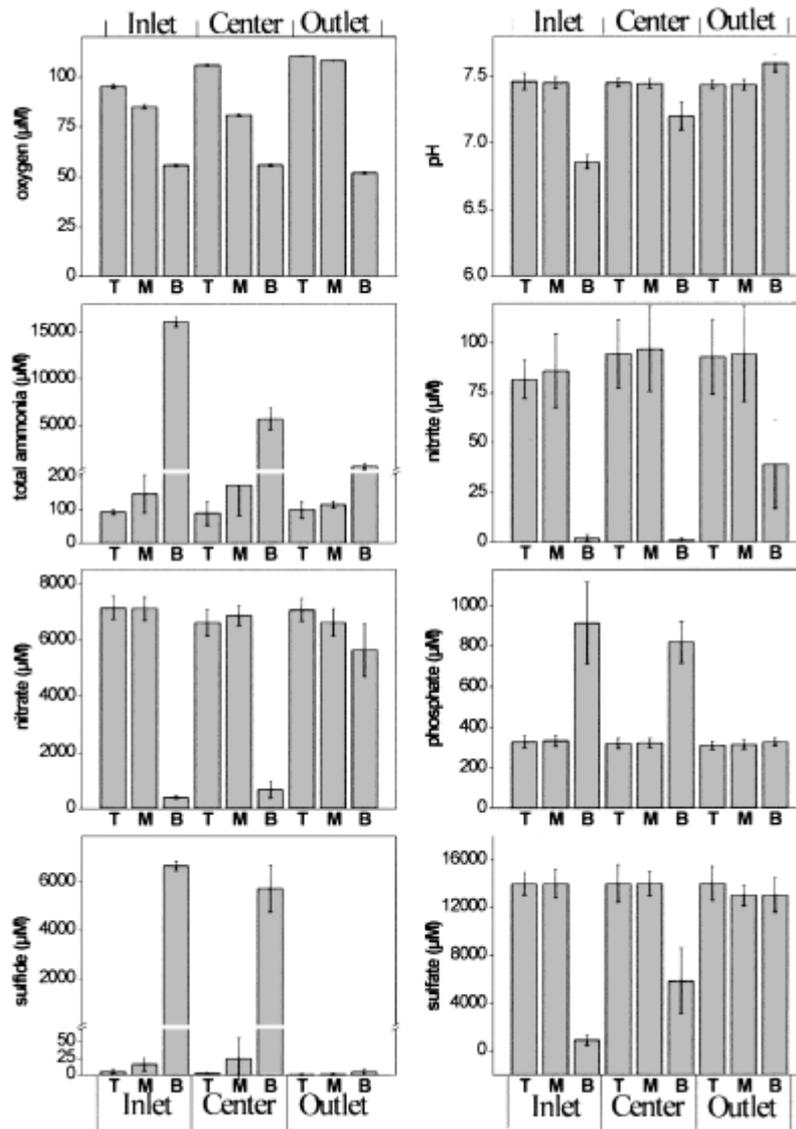


Abb. 10: Chemische Parameter (Sauerstoff, pH, Gesamtammonium, Nitrit, Nitrat, Phosphat, Sulfid und Sulfat) im Sedimentationsbecken (DB) an ausgewählten horizontalen (Einlass, Mitte und Auslass) und vertikalen (T=Top, M=Middle und B=Bottom) Probenahmepunkten. Dargestellt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen von jeweils 2 oder 3 Wiederholungen und 2 Probenahmeterminen (4. und 7. 1.2001). Aus Cytryn et al., 2003.

Der gesammelte Schlamm war sehr gut abbaubar. Am Ende einer ca. einjährigen Versuchsphase blieben nur 9,2% der als Futter zugegebenen organischen Substanz (Trockengewicht) im DB zurück (Gelfand et al., 2003).

2.1.3 FBR

Der Fließbettreaktor bestand aus einer Plexiglassäule (Höhe: 198 cm; Durchmesser: 6,1 cm, oberste 25 cm: 32 cm) mit einem Arbeitsvolumen von 6,25 l (Cytryn et al., 2003; Gelfand et al., 2003). Als Trägermaterial wurde Sand (1,5 kg; > 97% SiO₂) mit einer Korngrößensortierung von 0,8 - 1,5 mm verwendet (höchstens 15% mit Korngröße > 1,4 mm und 10% < 0,85 mm).

Die durchschnittlichen Sauerstoff-, Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentrationen aus regelmäßigen Messungen von Herbst 2003 bis März 2004 an DB-Auslass/FBR-Einlass und FBR-Auslass betragen 86 und 39, 1120 und 845, 25 und 10 bzw. 80 und 45 µM (Cytryn et al., 2005b). Die Sulfidkonzentrationen lagen bei durchschnittlich 43 und 17 µM, was einer durchschnittlichen Abbaurate von 0,9 mol Gesamtsulfid/d entspricht. Die maximale Standardabweichung betrug für alle Parameter 20%.

2.2 Probennahme und -aufbereitung

Das System wurde im Frühjahr 2003 neu gestartet, nachdem es zuvor über einen Zeitraum von 3 Jahren stabil betrieben worden war (Gelfand et al., 2003). Nach einer Anlaufphase von einigen Monaten erfolgten Probennahme und Datenerhebung vor Ort im Rahmen zweier Messkampagnen im Oktober 2003 und im April/Mai 2004.

Der Tropfkörper wurde schon während der Anlaufphase in regelmäßigen Abständen beprobt, um die Entwicklung der Nitrifikantenpopulation über die Zeit mittels DGGE-Screening zu verfolgen (Koch et al., unveröffentlicht; siehe Kap. 1.3.2.2 und 3.1.2.1).

2.2.2 Material für DNA-Extraktion und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.2.2.1 TF

Um die Beprobung des Tropfkörpers zu erleichtern, waren Kabelbinder in das Filtermaterial eingebracht worden, die bei Bedarf leicht heraus gezogen werden konnten, ohne den darauf gewachsenen Biofilm zu zerstören. Proben für die DNA-Extraktion (ganze „Strips“ oder davon abgeschabtes Material) wurde unmittelbar nach der Probennahme eingefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Analyse mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden suspendierte oder intakte Biofilmpollen für mindestens 1 Stunde in frisch hergestellter

Paraformaldehyd-Lösung (PFA; 4% in phosphate buffered saline (PBS)) fixiert, zweimal in 1 x PBS gewaschen und anschließend in PBS/Ethanol 1:1 bei -20 °C gelagert (Amann et al., 1990). Um sicherzugehen, dass zwischen dem TF-Biofilm und dem Biofilm auf den Kabelbindern kein Unterschied bestand, wurden auch Proben direkt vom Trägermaterial des Tropfkörpers entnommen und PFA-fixiert.

2.2.2.2 DB und FBR

Auch aus den beiden anderen Biofiltern wurde Probenmaterial zur DNA-Extraktion entnommen und wie unter 2.2.2.1 beschrieben gelagert. Beim Sedimentationsbecken wurde dabei noch zwischen den drei Positionen Einlass (DB, in), Mitte (DB, m) und Auslass (DB, out) (siehe Abb. 9) unterschieden. Darüber hinaus wurden auch Proben für eine etwaige FISH-Analyse genommen, für 1 Stunde in 4% PFA fixiert und wie oben beschrieben gewaschen und gelagert.

2.2.3 Kultivierung von nitratreduzierenden und denitrifizierenden Mikroorganismen

Für die Kultivierung und Isolierung nitratreduzierender und denitrifizierender Organismen wurde biologisches Material aus allen drei Filtereinheiten (TF, DB und FBR) entnommen. Beim Sedimentationsbecken wurde dabei noch zwischen Einlass (DB, in), Mitte (DB, m) und Auslass (DB, out) unterschieden. Die Proben wurden möglichst kurz vor der Abreise im Oktober 2003 genommen und bis zur Weiterbearbeitung im Labor in Bayreuth (soweit möglich) kühl gelagert.

2.2.4 Wasserproben

Routinemäßige Probennahmen zur Bestimmung systemrelevanter Parameter wurden von den Projektpartnern in Israel durchgeführt. Darüber hinaus wurden im Oktober 2003 und im April/Mai 2004 aus allen relevanten Teilsystemen Proben zur Analyse mittels HPLC entnommen, um Hinweise auf im System (v. a. DB) enthaltene C-Quellen zu bekommen, die als Substrate für Nitratreduzierer und Denitrifikanten dienen könnten. Beprobte wurden der Fischtank, das Sedimentationsbecken (aufgesplittet nach verschiedene Positionen und Tiefen) sowie Auslass von TF und FBR. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme abzentrifugiert, der Überstand abge-

nommen, eingefroren und bis zur Messung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Direkt vor der Messung wurden die Proben wie unter 2.3.2 beschrieben weiter aufbereitet.

2.2.5 ^{15}N -Tracerexperimente

Proben für Inkubationsexperimente mit ^{15}N -markiertem Nitrat und Ammonium wurden im Zuge der Messkampagne im Frühjahr 2004 an verschiedenen Stellen von DB und FBR genommen (siehe Kap. 2.5). Die ^{15}N -Experimente zum Einfluss von Sulfid auf die nitratreduzierenden Prozesse (Schwermer et al., unveröffentlicht; siehe Kap. 2.5) wurden im Herbst 2004 mit DB-Schlamm aus dem Nachfolgesystem durchgeführt, da das ursprünglich untersuchte System nicht mehr bestand.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Gase

Zur Analyse der Gase N_2 und N_2O wurden Hewlett-Packard Co. (Palo Alto, CA, USA) 5980 Series II Gaschromatographen verwendet, die mit verschiedenen Detektoren (Tab. 3) ausgestattet waren. Die quantitative Auswertung erfolgte mit HP 3396 Series II Integratoren und externen Standards. Die genauen Parameter der verwendeten gaschromatographischen Analysemethoden sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Analysemethoden zur Gasbestimmung.

	N_2O ($\geq 0,3$ ppm)	N_2O (≥ 30 ppm)	N_2
Detektor	Elektroneneinfangdetektor (EED)	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)
Säule	Poropak Q 80/100, 4 m \times 1/8" (Supelco Bellefonte, PA, USA)	Chromosorb 102, 2 m \times 1/8" (Alltech, Unterhaching, Deutschland)	Molekularsieb, 2 m \times 1/8" (Alltech, Unterhaching, Deutschland)
Trägergas	95% Argon/ 5% Methan	Helium	Argon
Flussrate	20 ml/min	15 ml/min	33 ml/min
Ofentemperatur	60 $^{\circ}\text{C}$	40 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$
Injektortemperatur	150 $^{\circ}\text{C}$	150 $^{\circ}\text{C}$	150 $^{\circ}\text{C}$
Detektortemperatur	300 $^{\circ}\text{C}$	175 $^{\circ}\text{C}$	175 $^{\circ}\text{C}$

	N₂O (≥ 0,3 ppm)	N₂O (≥ 30 ppm)	N₂
Injektionsvolumen	200 µl	100 µl	100 µl
Retentionszeiten	4,3 min (N ₂ O)	2,4 min (N ₂ O)	1,8 min (N ₂)

Zur Berechnung der in einem geschlossenen Gefäß befindlichen Gasmenge wird der Gasdruck benötigt, der mit Hilfe eines Ballmoos (Horgen, Schweiz) DMG 2120 Druckaufnehmers zu jedem Messzeitpunkt gemessen wurde. Die Gesamtstoffmenge (n_{ges}) eines Gases setzt sich generell aus der in der Gasphase befindlichen Stoffmenge (n_{gas}), einem physikalisch gelösten Anteil ($n_{gel,p}$) und einem chemisch gelösten Anteil ($n_{gel,c}$) zusammen (Gleichung 4). Bei N₂ und N₂O ist ein chemisch gelöster Anteil allerdings nicht zu berücksichtigen.

Gleichung 4: Stoffmenge eines Gases.

$$n_{ges} = n_{gas} + n_{gel,p} + n_{gel,c} \quad [\mu\text{mol}]$$

Die Stoffmenge eines Gases in der Gasphase wurde über Gleichung 5 ermittelt. Das hierfür benötigte Molvolumen unter aktuellen Bedingungen ($V_{akt,mol}$) errechnete sich über die allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase (Gleichung 6).

Gleichung 5: Stoffmenge eines Gases in der Gasphase.

$$n_{gas} = V_{Gasphase} \cdot \frac{C}{V_{akt,mol}} \cdot \frac{p_{akt} + p_{\bar{u}}}{p_{akt}}, \text{ wobei}$$

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

Gleichung 6: Allgemeine Zustandsgleichung für ideale Gase.

$$V_{akt,mol} = \frac{p_l \cdot V_l \cdot T_{akt}}{T_l \cdot p_{akt}}, \text{ wobei}$$

p_l = Luftdruck [mbar],
 T_l = Temperatur [K],
 V_l = Molvolumen [ml] unter Standardbedingungen,
 T_{akt} = aktuelle Temperatur [K].

Der physikalisch gelöste Anteil eines Gases wurde über Gleichung 7 berechnet. Für Gase, deren Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α (Tab. 4) bei $20\text{ °C} < 0,05$ ist, ist dieser Term vernachlässigbar.

Gleichung 7: Physikalisch gelöster Anteil eines Gases.

$$n_{\text{gel},p} = V_{\text{flüssig}} \cdot \frac{C}{V_{\text{akt},\text{mol}}} \cdot \alpha \cdot \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{Ü}}}{p_{\text{akt}}}, \text{ wobei}$$

$V_{\text{flüssig}}$ = Volumen der flüssigen Phase [ml].

Tab. 4: Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für verschiedene Gase in Wasser bei 20 und 25 °C.

Gas	α		Referenz
	293 °K (20 °C)	298 °K (25 °C)	
N ₂	0,016	0,015	Gmelin, 1936
N ₂ O	0,674	0,602	Gmelin, 1936

2.3.2 Organische Säuren, Zucker, Aminozucker und Alkohole

Organische Säuren, Zucker, Aminozucker und Alkohole wurden - sofern sie in den Proben vorhanden waren - mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dazu wurde mindestens 1 ml Probe (Umweltprobe, Bakterienkultur) für 10 min bei 14000 U/min abzentrifugiert (5415C Microzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand noch durch Mikrofiltration (Porendurchmesser 0,2 μm) weiter aufgereinigt. Zur Analyse wurde ein Hewlett Packard 1090 Series II Hochdruckflüssigkeitschromatograph verwendet, der mit einem Autosampler, einer Aminex Ion Exclusion Säule HPX-87H 300 x 7,8 mm (Biorad, Richmond, CA, USA), einem HP 3396 Series II Integrator und einem HP 1047A-Refraktionsindexdetektor ausgestattet war. Das Probenvolumen betrug 20 μl . Als mobile Phase diente 0,01 M H₃PO₄. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min bei 60 °C Säulentemperatur. Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden externe Standards verwendet. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 0,1 mM.

2.3.3 Anorganische Ionen

Anorganische Ionen wurden mittels colorimetrischer Verfahren bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über mitgeführte Eichreihen. Wurden Seesalzhaltige Proben gemessen, so wurden auch die Standards mit salzhaltigem Wasser angesetzt, da durch das Seesalz die gemessene Extinktion merklich beeinflusst wurde. Die Messungen erfolgten an einem UVIKON 930 Photometer (Kontron Instruments, München, Deutschland) oder einem kleineren Tischphotometer (Novaspec II, Pharmacia, Freiburg, Germany). Um den Probendurchsatz zu erhöhen, wurden die Reaktionen teilweise auch in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden die Volumina der Proben und Reagenzien anteilig reduziert und die Mikrotiterplatten mit einem PowerWave X340 oder einen μ Quant Plate Reader (beide Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) ausgelesen.

2.3.3.1 Nitrat

Für die Nitratbestimmung (Cataldo et al., 1975; Gadkari, 1984) wurden zu 50 μ l Probe zunächst 10 μ l 10%-ige Amido-Schwefelsäure (w/v) gegeben. Nach 5 min wurden 200 μ l Salicyl-Schwefelsäure (5% w/v in H_2SO_4) zugegeben. Nach 30 min erfolgte die Zugabe von 5 ml NaOH (2N) als Farbverstärker. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion des entstandenen gelben Farbstoffs bei 410 nm gemessen.

2.3.3.2 Nitrit

Die Quantifizierung von Nitrit wurde leicht modifiziert nach Harrigan & Mc Cance (1966) durchgeführt. Zu 500 μ l Probe wurden 500 μ l einer frisch gemischten Lösung aus Grieß A (0,2 g 1-Naphtylamin-7-Sulfonsäure, 120 ml ddH₂O, 30 ml Eisessig) und Grieß B (0,5 g Sulfanilsäure, 120 ml ddH₂O, 30 ml Eisessig) gegeben. Die Lösung wurde mit Parafilm verschlossen, gemischt und bei 30 °C für 15 min im Dunkeln stehen gelassen. Die Extinktion der entwickelten roten Farbe wurde bei 550 nm gemessen.

2.3.3.3 Ammonium

Zur Bestimmung von Ammonium (Gadkari, 1984) wurden zu 1,0 ml Probe 0,5 ml Natrium-Phenolat (2% w/v) und jeweils 0,25 ml Natrium-Nitroprussid (0,005% w/v) und Natrium-Hypo-

chlorit-NaOH-Lösung (112,5 mM NaOH, 10% Chlorbleichlaug) gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 30 °C im Dunkeln erfolgte die Messung bei 630 nm.

2.3.3.4 Lösliches Eisen(II)

Fe²⁺ wurde mit der Phenanthrolin-Methode (Tamura et al., 1974) bestimmt. In einem Reagenzglas wurden 0,5 ml Acetatpuffer (200 g Ammoniumacetat, 250 ml Eisessig, ad 500 ml ddH₂O; pH 4,5) vorgelegt. Dann wurden 5 ml der ggf. 1:50 mit 0,5 M HCl verdünnten Probe und 0,5 ml Phenanthrolinlösung (0,5% w/v 1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat) zugegeben und zum Mischen gevortext. Anschließend wurde die Extinktion des sich entwickelnden orange-roten Fe-Phenanthrolin-Komplexes bei 512 nm im Photometer gemessen.

2.3.3.5 Sulfat

Zur Sulfatbestimmung wurde die Barium-Gelatine-Methode (Tabatabei, 1992) verwendet. 5 ml Probe (Verd. 1:20) wurden in einem Reagenzglas vorgelegt. Dann wurden 0,5 ml HCl (0,5N) und 0,5 ml Ba-Gelatine-Reagenz zugegeben. Anschließend wurde das Reagenzglas mit Parafilm verschlossen, die Lösung gemischt und 60 min stehen gelassen. Nach erneutem Mischen wurde die Lösung in eine 1 ml-Küvette umgefüllt und die Extinktion bei 420 nm gemessen. Zur Herstellung der BaCl₂-Gelatine wurden 0,6 g Gelatine in 200 ml heißem ddH₂O gelöst, ca. 16 h bei 4 °C stehen gelassen und dann 8 g BaCl₂ x 2 H₂O hinzugefügt.

2.3.3.6 Sulfid

Die Bestimmung von Sulfid erfolgte über die Methylenblaumethode (Frevort, 1983; modifiziert). Dazu wurden 2 ml Zinkacetatlösung (4% (w/v) Zinkacetat in 2% (v/v) Essigsäure) in einem 10 ml-Messkolben vorgelegt und dann die Probe (Menge ja nach erwarteter Sulfidkonzentration) zugegeben. Anschließend wurde 1 ml Lösung 1 (0,4% (w/v) Dimethyl-p-phenyldiaminsulfat in 40% H₂SO₄) zugegeben, durch Schütteln gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde mit anoxischem ddH₂O auf ca. 8 ml aufgefüllt, für die Farbbildung 50 µl Lösung 2 (2% (w/v) NH₄[Fe(SO₄)₂ x 12 H₂O] in 2% H₂SO₄) zugegeben und nach kräftigen Schütteln mit anoxischem ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion

bei 665 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Sulfidstandard im Konzentrationsbereich von 0 - 60 μM . Alle Lösungen wurden mit anoxischem ddH₂O angesetzt. Alternativ erfolgte die Messung nach dem leicht modifizierten Protokoll von Pachmayr (Pachmayr, 1960).

2.4 Mikrosensormessungen

Die Mikrosensormessungen an TF-Biofilmen wurden von A. Gieseke und P. Stief (MPI für marine Mikrobiologie, Bremen) durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten größtenteils durch A. Gieseke.

2.4.1 Inkubationsbedingungen

Biofilmproben (1 - 2 cm²) wurden auf ihrer Unterlage (Kabelbinder) in einer kleinen Durchflussskammer inkubiert. Durch die Kammer wurde künstliches Seewasser (20 psu Rotes Meer Salz, Red Sea Fish Pharm, Eilat, Israel) gepumpt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 cm/s. Der Fluss war laminar. Um Endkonzentrationen von 0 bis 1800 μM NH₄⁺ zu erzielen, wurden dem Seewassermedium verschiedene Mengen NH₄Cl hinzugefügt. Vor Beginn und nach Beendigung der Messungen mit der jeweiligen NH₄⁺-Konzentration wurden Wasserproben genommen und die exakte Ammoniumkonzentration im Medium photometrisch (Bower et al., 1980) bestimmt.

2.4.2 Messung und Berechnung

Vertikale Sauerstoff- und NO_x⁻(= Nitrat und Nitrit)-profile wurden mit amperometrischen Mikrosensoren (Revsbech, 1989) bzw. mit Mikrobiosensoren (Larsen et al., 1997) gemessen. Die lokalen NO_x⁻-Produktionsraten wurden in einem schrittweisen Verfahren berechnet (de Beer & Stoodley, 2000). Ammoniumkonzentrationen an der Biofilmoberfläche wurden aus den NH₄⁺-Konzentrationen im Medium, den lokalen NO_x⁻-Konzentrationen und dem Verhältnis der effektiven molekularen Diffusionskoeffizienten für Ammonium und Nitrat berechnet. Die Diffusionskoeffizienten (D_{eff}) für Ammonium und Nitrat bei 25 °C und einer Salinität von 20 psu betragen $1,78 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bzw. $1,71 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, woraus sich ein Verhältnis von 1,04 ergibt.

Zur Berechnung der in situ-Affinität (K_M) und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) für Ammonium wurde ein einfaches Michaelis-Menten-Modell angenommen, um die zugrundeliegende Kinetik zu beschreiben (Gleichung 8).

Gleichung 8: Michaelis-Menten-Kinetik für den Umsatz von Ammonium.

$$v = v_{max} \cdot c(NH_4^+) / (K_M + c(NH_4^+))$$

Transportlimitationen des Substrats wurden berücksichtigt, indem die lokalen Umsatzraten zu den lokalen Substratkonzentrationen (in diesem Fall Ammonium) in Bezug gesetzt wurden (basierend auf Pasciak & Garvis, 1974). In die Berechnungen gingen nur an der Biofilmoberfläche bestimmte lokale Konzentrationen und Raten ein, um durch Sauerstofflimitation bedingte Effekte auszuschließen. Daten von mehreren Messungen wurden gepoolt.

2.5 Inkubationsversuche mit ^{15}N -markierten Substraten

Zur Quantifizierung der nitratreduzierenden Prozesse Denitrifikation und DNRA sowie des Anammox-Prozesses in DB und FBR wurden Tracerexperimente mit $^{15}\text{NO}_3^-$ und $^{15}\text{NH}_4^+$ durchgeführt (z. B. Risgaard-Petersen & Risgaard, 1995; Nielsen, 1992; Thamdrup & Dalsgaard, 2002). Die Probennahme erfolgte in Zusammenarbeit mit A. Gieseke (MPI für marine Mikrobiologie, Bremen), Messung und Auswertung wurden in Århus (Department of Biological Sciences, Microbiology) durchgeführt (A. Schramm und L.-P. Nielsen).

2.5.1 Probennahme und Inkubation

$^{15}\text{NO}_3^-$ - und $^{15}\text{NH}_4^+$ -Experiment wurden im Frühjahr 2004 an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Für beide Versuche wurden aus dem DB Schlammproben an drei Positionen (Einlass, Mitte und Auslass) und in jeweils 2 Tiefen (nahe dem Übergang zur Wasserphase (= oben) und ganz am Boden des Beckens (= unten)) entnommen. Vom FBR wurde eine Probe nahe des Einlasses (= unten) und eine nahe des Auslasses (= oben) verwendet.

Nach der Entnahme wurden die Proben ins Labor gebracht und unter Rühren für 10 min mit N_2 begast. Anschließend wurden 10 ml-Aliquots in gasdichte 12 ml-Glasröhrchen (Exetainer, Labco, High Wycombe, UK) abgefüllt, durch einmaliges Schütteln gemischt und für 30 min in-

kubiert, um komplett anoxische Bedingungen zu erhalten. Für das $^{15}\text{NO}_3^-$ -Experiment erfolgte dann die Zugabe von 20 μl 50 mM $^{15}\text{NO}_3^-$ mittels einer 50 μl -Hamiltonspritze. Für das $^{15}\text{NH}_4^+$ -Experiment wurden alle Exetainer zunächst mit 100 μl 30 mM Thioharnstoff versetzt. Anschließend wurden 100 μl 100 mM $^{15}\text{NH}_4^+$ zugegeben. Beides geschah mit einer 500 μl -Hamiltonspritze. Nach der Zugabe des ^{15}N -markierten Substrats wurden die Proben sofort gut gemischt und dann liegend für 7 h bei 27 °C inkubiert. Die nachfolgende Fixierung erfolgte durch die Zugabe von jeweils 50 μl einer gesättigten ZnCl_2 -Lösung. Alle Inkubationen wurden in Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurden Blindproben ohne $^{15}\text{NO}_3^-$ - bzw. $^{15}\text{NH}_4^+$ -Zugabe mitgeführt. Zur späteren Bestimmung der Hintergrundkonzentrationen an Nitrat und Nitrit wurden parallel zu den Inkubationen Schlammproben abzentrifugiert, der Überstand filtriert (0,2 μm) und bei -20 °C eingefroren.

2.5.2 Messung und Berechnung

Die Menge an ^{15}N -markiertem N_2 ($^{29}\text{N}_2$ und $^{30}\text{N}_2$) wurde durch die Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie (RoboPrep+ und Tracermass, Europa Scientific, Crewe, UK) bestimmt (Risgaard-Petersen & Risgaard, 1995). Die Produktion von $^{15}\text{N}_2$ in Proben, die $^{15}\text{NH}_4^+$ enthielten, wurde als Hinweis auf Anammox-Aktivität gewertet (Thamdrup & Dalsgaard, 2002). Anammox, Denitrifikation und der Beitrag von Anammox zur N_2 -Produktion wurden aus der Produktion von $^{29}\text{N}_2$ und $^{30}\text{N}_2$ in mit $^{15}\text{NO}_3^-$ versetzten Proben nach Thamdrup & Dalsgaard (2002) berechnet.

2.5.3 Weitere Experimente

Analog zu obigen Inkubationen wurde im Herbst 2004 ein $^{15}\text{NO}_3^-$ -Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Sulfid auf die nitratreduzierenden Prozesse durchgeführt (Schwermer et al., unveröffentlicht) Dazu wurde DB-Schlamm (Mischprobe) mit verschiedenen Sulfidkonzentrationen inkubiert und das Schicksal des Nitrat-N über einen Zeitraum von 8 h beobachtet. Da das ursprünglich beprobte System zu diesem Zeitpunkt nicht mehr bestand, war hierzu ein Ausweichen auf das Nachfolgesystem erforderlich.

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Nährmedien und Kultivierungstechniken

Alle Medien und Lösungen wurden mit ddH₂O hergestellt, dessen Leitfähigkeit stets kleiner als 0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$ war. Abgesehen von hitzelabilen Verbindungen wurden alle Medien für 25 min bei 1 bar Überdruck und 121 °C in feuchter Hitze sterilisiert. Hitzelabile Verbindungen wurden sterilfiltriert (Cellulose-Acetatfilter, Porendurchmesser 0,2 μm ; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und dem Medium gegebenenfalls nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben.

Anoxische Flüssignährmedien wurden nach der modifizierten Hungate-Technik (Daniel & Drake, 1993) mit 100% Argon in der Gasphase in Bellco-Röhrchen (18 x 150 mm; Bellco Glass Inc., Vineland, Niederlande) hergestellt. Die in etwas Wasser gelösten Medienkomponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben für 5 - 10 min mit Argon begast. Dann wurde mit kochendem ddH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt und das Medium unter Argonbegasung im Eisbad abgekühlt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes wurde das Medium in Bellco-Röhrchen gefüllt und diese mit Butylgummistopfen und Aluminiumbördelkappen gasdicht verschlossen und anschließend autoklaviert. Alternativ wurde das Medium zunächst autoklaviert und erst nach Zugabe weiterer Komponenten unter Argonbegasung in sterile Röhrchen bzw. 100 ml-Serumflaschen abgefüllt.

Feste Medien wurden vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Agar (ApliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C in sterile Petrischalen aus Kunststoff (Durchmesser 8,5 cm; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) oder 100 ml-Serumflaschen gegossen.

Spezielle Medien, die zur physiologischen Charakterisierung von Isolaten aus der Aquakultur verwendet wurden, basieren auf den hier beschriebenen Grundmedien und sind unter 2.6.4.2.4 - 2.6.4.2.8 näher erläutert.

2.6.1.1 Medien für die von der DSMZ bezogenen Bakterienstämme

Von der DSMZ wurden verschiedene denitrifizierende Bakterienstämme bezogen, um deren *narG*- und *nosZ*-Gene zu amplifizieren und zu sequenzieren (Tab. 5). Sie wurden jeweils in ei-

nem der von der DSMZ empfohlenen Medien (<http://www.dsmz.de/>) kultiviert, deren Referenznummern Tabelle 5 zu entnehmen sind. Die Herstellung erfolgte wie dort angegeben.

Tab. 5: Kultivierungsbedingungen der von der DSMZ bezogenen Bakterienstämme.

DSM No.	Name	Gruppe	Art*	Medium	Temp.	Bed.
8595	<i>Agromyces cerinus</i>	Actinobacteria	vd	92	30 °C	aerob
12141	<i>Alcaligenes defragrans</i>	β -Proteobacteria	vd	1	30 °C	aerob
11603	<i>Aquamicrobium defluivii</i>	α -Proteobacteria	vd	98	30 °C	aerob
1416	<i>Beggiatoa alba</i>	γ -Proteobacteria	ag	155	25 - 30 °C	aerob, + Katalase!
13031	<i>Chlorobium ferrooxidans</i>	Chlorobi	ag	29a	25 °C	anaerob, im Licht
13191	<i>Comamonas nitratorans</i>	β -Proteobacteria	vd	1	30 - 37 °C	aerob
12446	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	ϵ -Proteobacteria	ag	833	25 °C	anaerob
642	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	δ -Proteobacteria	vd	63	30 °C	anaerob
7343	<i>Desulfuromusa kysingii</i>	δ -Proteobacteria	vd	195a	30 °C	anaerob
3403	<i>Flexibacter canadensis</i>	Bacterioidetes	ag	357	26 °C	aerob
1411	<i>Haloferax mediterranei</i>	Archaea	vd	97	37 °C	aerob
1522	<i>Janthinobacterium lividum</i>	β -Proteobacteria	vd	1	25 °C	aerob
44406	<i>Modestobacter multiseptatus</i>	Actinobacteria	ag	621	20 °C	aerob
14552	<i>Novosphingobium hassiacum</i>	α -Proteobacteria	vd	830	25 °C	aerob
11246	<i>Opitutus terrae</i>	Verrucomicrobia	ag	298g	28 °C	anaerob
4900	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Actinobacteria	vd	104	37 °C	anaerob
6059	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	γ -Proteobacteria	ag	123	10 °C	aerob
7001	<i>Roseobacter denitrificans</i>	α -Proteobacteria	vd	695	20 °C	aerob
1981	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	α -Proteobacteria	vd	98	26 °C	aerob
6984	<i>Thauera aromatica</i>	β -Proteobacteria	ag	830	30 °C	aerob
582	<i>Thiobacillus versutus</i>	β -Proteobacteria	vd	69	30 °C	aerob
1251	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	ϵ -Proteobacteria	ag	113	20 - 25 °C	anaerob

* Art der Lieferung: als vakuumgetrocknete (vd = vacuum dried) oder als wachsende Kultur (ag = actively growing)

2.6.1.2 Medien zur Isolierung und Charakterisierung von Organismen aus der Aquakultur

Zur Kultivierung von Mikroorganismen aus verschiedenen Anlagenteilen wurde ein Grundmedium verwendet, das mit verschiedenen C-Quellen/e⁻-Donatoren supplementiert wurde (M1 - 6). Zur Erhaltung und Charakterisierung der Isolate wurde später ein Medium (M_{FGH}) verwendet, das mehrere Komponenten der einzelnen Medien in sich vereinte. Der Test auf phototrophes

Wachstum einiger Isolate wurde mit dem von der DSMZ für *Rhodospirillaceae* empfohlenen Medium 27 (<http://www.dsmz.de/>) (modifiziert und nicht modifiziert) durchgeführt.

Wenn nicht anders angegeben wurden die Spurenelement- und Vitaminstammlösungen nach Karsten & Drake (1995) verwendet, deren Zusammensetzung Tab. 6 und 7 zu entnehmen ist. Die Herstellung der verwendeten Phosphatpuffer (Tab. 8) erfolgte nach Sambrook et al. (1989).

Tab. 6: Zusammensetzung der Spurenelementstammlösung (nach Karsten & Drake, 1995).

Substanz	Menge [mg/l]
Na-Nitrilotriacetat	1500
MnSO ₄ x H ₂ O	500
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	100
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	100
ZnCl ₂	100
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	50
H ₂ SeO ₃	50
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	10
AlK(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	10
H ₃ Bo ₃	10
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	10
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	10

Tab. 7: Zusammensetzung der Vitaminstammlösung (nach Karsten & Drake, 1995).

Substanz	Menge [mg/l]
Biotin	20
Folsäure	20
Pyridoxal-HCl	50
Liponsäure	50
Riboflavin	50
Thiamin-HCl	50
Ca-D-Pantothenat	50
Cyanocobalamin	50
p-Aminobenzoessäure	50
Nicotinsäure	50

Tab. 8: Na-Phosphatpuffer-Stammlösungen (Sambrook et al., 1989).

pH	1M Na ₂ HPO ₄ (ml)	1M NaH ₂ PO ₄ (ml)
5,8	7,9	92,1
6,0	12,0	88,0
6,2	17,8	82,2
6,4	25,5	74,5
6,6	35,2	64,8
6,8	46,3	53,7
7,0	57,7	42,3
7,2	68,4	31,6
7,4	77,4	22,6
7,6	84,5	15,5
7,8	89,6	10,4
8,0	93,2	6,8

2.6.1.2.1 Medium M1 - 6

Red Sea Salt	2,2 g
Natriumnitrat	425 mg
+ für:	
M1: Natriumacetat	680 mg bzw. 5 ml 1M Lösung
M2: Lactat-Lösung	0,431 ml bzw. 5 ml 1M Lösung
M3: Natriumpropionat	480 mg bzw. 5 ml 1M Lösung
M4: Butyrat/Isobutyrat	0,459 ml bzw. 5 ml 1M Lösung
M5: Thiosulfat	5 g
M6: Bacto Peptone	5 g
Hefeextrakt	1 g
ddH ₂ O	980 bzw. 990 ml für verfestigtes Medium

→ pH auf 7,6 einstellen, mit ddH₂O auf 988 bzw. 997 ml auffüllen, autoklavieren und nach dem Abkühlen Zugabe von:

Spurenelementlösung	1 ml
Vitaminlösung	1 ml
1M Na-Phosphatpuffer, pH 7,6	10 ml bzw. 1 ml für verfestigtes Medium

2.6.1.2.2 Medium M_{FGH}

Red Sea Salt	2,2 g
Natriumnitrat	425 mg
Hefeextrakt	0,5 g
Fettsäuremix	5 ml
(mit je 250 mM Acetat, Lactat, Propionat und Butyrat)	
ddH ₂ O	980 bzw. 990 ml für verfestigtes Medium

→ pH auf 7,2 einstellen, mit ddH₂O auf 984 bzw. 992 ml auffüllen, autoklavieren und nach dem Abkühlen Zugabe von:

0,5 M Glukoselösung	4 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Vitaminlösung	1 ml
1M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2	10 ml bzw. 1 ml für verfestigtes Medium

2.6.1.2.3 Rhodospirillaceae-Medium (DSMZ-Medium 27)

Hefeextrakt	0,3 g
Ethanol	0,5 ml
Na ₂ -Succinat	1,0 g
(NH ₄)-Acetat	0,5 g
Fe(III)-Citrat-Lösung (100 mg/l)	50 ml
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,4 g
NaCl	0,4 g
NH ₄ Cl	0,4 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
Vitamin B12-Lösung (10 mg in 100 ml H ₂ O)	0,4 ml
Spurenelementlösung SL-6	1,0 ml
ddH ₂ O	1000 ml

→ pH auf 6,8 einstellen, mit ddH₂O auf 1050 ml auffüllen, in Serumflaschen/Bellco-Röhrchen abfüllen und autoklavieren

Spurenelementlösung SL-6 (ad 1000 ml):

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
MnCl ₂ x H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g

2.6.1.2.4 Medium 27, modifiziert (M27mod)

Red Sea Salt	2,2 g
Hefeextrakt	0,3 g
Ethanol	0,5 ml
Na ₂ -Succinat	1,0 g
(NH ₄)-Acetat	0,5 g
Fe(III)-Citrat-Lösung (100 mg/l)	50 ml
ddH ₂ O	1000 ml

→ pH auf 6,8 einstellen, mit ddH₂O auf 1050 ml auffüllen, autoklavieren und nach dem Abkühlen Zugabe von:

Spurenelementlösung	1 ml
Vitaminlösung	1 ml

2.6.1.3 Weitere Medien

Für die Klonierung, Erhaltung und Anzucht von Klonen wurden die im Folgenden aufgeführten Standardmedien verwendet.

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

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	990 ml

→ pH auf pH 7,0 einstellen, mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren

2.6.1.3.2 LB-Medium mit Ampicillin (*LB_{+Amp}*)

Dem oben beschriebenen LB-Medium wurde nach dem Abkühlen Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 mg/l zugesetzt. Meist geschah dies direkt vor dem Animpfen von Übernachtskulturen durch die Zugabe von 5 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) pro Röhrchen mit 5 ml Medium.

2.6.1.3.3 LB-Platten mit Ampicillin oder mit Ampicillin, IPTG und X-Gal

(*LB_{+Amp} und LB_{+Amp+IPTG+X-Gal}*)

Zum Klonscreening wurden LB-Platten mit Ampicillin, Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG; Promega, Madison, WI, USA) und X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid in N,N'-Dimethylformamid, Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Dazu wurde dem unter 2.6.1.3.1 beschriebenen LB-Medium 1,5% (w/v) Agar beigegeben und nach dem Abkühlen auf 50 °C 1 ml Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml), 1 ml IPTG-Stammlösung (0,5M) und 1,6 ml X-Gal-Stammlösung (50 mg/ml in N,N'-Dimethylformamid) zugesetzt.

2.6.1.3.4 SOC-Medium

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	0,25 ml
ddH ₂ O	97 ml

→ autoklavieren und nach dem Abkühlen Zugabe von:

2M Mg_2^+	1 ml
2M Glukose	1 ml

→ pH auf 7,0 einstellen, mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren

2.6.2 Isolierung nitratreduzierender und denitrifizierender Mikroorganismen aus der Aquakultur

Für die Isolierung von nitratreduzierenden und denitrifizierenden Mikroorganismen wurden Proben aus dem Tropfkörper (TF), dem Sedimentationsbecken (DB, in, m, out) und dem Fließbettreaktor (FBR) genommen und nach Bayreuth transferiert (siehe Kap. 2.2.3). Dort wurden von dem Ausgangsmaterial Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis einschließlich 10^{-9} in den sechs Medien M1 - 6 (siehe Kap. 2.6.1.2.1) hergestellt. Die Medien wurden oxisch angesetzt, die Bellcöhrchen dann aber mit Butylgummistopfen und Aluminiumbördelkappen gasdicht verschlossen, um nach dem Einstellen sauerstofflimitierter Bedingungen nitratreduzierende/denitrifizierende Organismen zu begünstigen. Um auch Organismen zu erfassen, die feste Oberflächen zum Wachstum benötigen, wurden von jedem der 6 Ansätze (M1 - 6) jeweils 100 μ l der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-8} direkt in 250 ml-MK-Flaschen ausplattiert und diese anschließend luftdicht verschlossen (= Ansatz 0).

Die Verdünnungsreihen in Flüssigmedium wurden nach 2 Wochen auf Nitratverbrauch überprüft. Bei Medium 5 (Thiosulfatmedium) wurde die Messung nach 4 Wochen wiederholt. Anschließend wurden unter Berücksichtigung von Verdünnungsstufe und Nitratverbrauch pro Probe und Medium drei (bzw. 1 - 2 bei M5) Verdünnungen (siehe Tab. 9) ausplattiert (jeweils 100 μ l pro Platte/Flasche). Dies geschah einmal auf Platten (= Ansatz 1A) und einmal in 100 ml-Serumflaschen, die anschließend mit Argon begast wurden (= Ansatz 1B).

Danach wurde damit begonnen, von bewachsenen Platten und Flaschen aller 3 Ansätze Kolonien zu picken. Meist war zuvor noch mindestens ein Verdünnungsausstrich nötig, da die Platten oder Flaschen mit einem dichten Bakterienrasen bewachsen waren. Bei den direkt ausplattierten Ansätzen wurde gaschromatographisch auf N₂O-Bildung überprüft und nur die N₂O-positiven Flaschen weiterbearbeitet.

Tab. 9: Übersicht über die von Ansatz 1A u. 1B weiterbearbeitete Verdünnungsstufen.

Probe	Medium	Verdünnungsstufen								
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
TF	1					x	x	x		
	2					x	x			x
	3						x	x		x
	4							x	x	x
	5							x		x
	6							x	x	x
FBR	1						x	x	x	
	2					x	x		x	
	3					x		x	x	
	4						x	x		x
	5						x			x
	6							x	x	x
DB, in	1					x		x	x	
	2					x	x			x
	3							x	x	x
	4						x	x		x
	5							x		x
	6							x	x	x
DB, m	1							x	x	x
	2							x	x	x
	3							x	x	x
	4							x	x	x
	5						x		x	x
	6							x	x	x
DB, out	1						x		x	x
	2						x		x	x
	3						x	x		x
	4							x	x	x
	5								x	x
	6							x	x	x

Da sich die Vorgehensweise der Inkubation in Flaschen bei der Größe des Ansatzes als nicht praktikabel erwies, wurde nach und nach vollständig zu Platten übergegangen, die zunächst noch teilweise in Anaerobentöpfen unter Argon inkubiert wurden. Am Ende wurden alle Ansätze oxisch inkubiert.

Gepickte Einzelkolonien wurden noch zwei- bis dreimal auf Platte ausgestrichen, um sicherzugehen, dass es sich um Reinkulturen handelt. Anhand der einheitlichen Koloniemorphologie als rein beurteilte Isolate wurden wieder in Flüssigmedium transferiert und auf Nitratverbrauch (photometrische Messung, siehe Kap. 2.3.3.1) und Nitritbildung (Teststäbchen (Merck, Darmstadt, Deutschland)) hin untersucht.

Nitratverbrauchende Isolate wurden mittels RFLP-Analyse ihrer 16S rRNA-Gene (siehe Kap. 2.7.8) gescreent und in Gruppen eingeteilt. Da bei dem Thiosulfatmedium (M5) der Nitrattest nicht richtig funktionierte, wurden hier alle gewonnenen Isolate dem RFLP-Screening unterworfen. Zur Identifikation der Isolate wurde von ausgewählten Vertretern jeder RFLP-Gruppe das fast vollständige 16S rRNA-Genfragment amplifiziert und sequenziert. Darüber hinaus wurden die betreffenden Isolate mit Hilfe von Durham-Röhrchen (Durham, 1898) auf N₂-Bildung und mittels eines N₂O-Sensors (Andersen et al., 2001) oder gaschromatographisch (siehe Kap. 2.3.1) auf N₂O-Bildung gescreent.

2.6.3 Wachstumsmessungen

Das Wachstum von Mikroorganismen wurde in Bellco-Röhrchen anhand der Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 660 nm mit einem Milton Roy Spectronic 501 Photometer (Bausch & Lomb Inc., Rochester, NY, USA) verfolgt. Als Referenz diente unbeeimpftes Medium.

Exponentielle Wachstumsrate μ und Verdopplungszeit t_d wurden auf Basis der OD₆₆₀ berechnet (Gleichung 9 u. 10).

Gleichung 9: Wachstumsrate μ .

$$\mu = \frac{\ln(OD_{t_1}) - \ln(OD_{t_0})}{t_1 - t_0}, \text{ wobei}$$

t_0, t_1 : Beginn bzw. Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

Gleichung 10: Verdopplungszeit t_d .

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

2.6.4 Charakterisierung neuer Bakterienstämme

2.6.4.1 Kolonie- und Zellmorphologie

Die Beschreibung der Koloniemorphologie erfolgte nach den in Smibert & Krieg (1994) aufgeführten Kriterien. Teilweise wurde dazu ein Mikroskop (Leitz Biomed Lichtmikroskop, Wetzlar, Deutschland) herangezogen. Zellform und -größe wurden ebenfalls lichtmikroskopisch (Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Zur Ermittlung der Zellgröße wurden Bilder mit einer AxioCam MRm (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen und die Zellen anschließend mit Hilfe der zugehörigen Software (AxioVision LE, version 4.5) vermessen.

2.6.4.2 Physiologische Tests

Die Durchführung klassischer physiologischer Tests zur Charakterisierung neuer Bakterienstämme orientierte sich an den in Cowan (1975) und in Smibert & Krieg (1994) aufgeführten Methoden. Zur Vereinfachung wurden einige der Tests mit einem kommerziell erhältlichen Testsystem (API20E-Testsystem; Biomérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich) durchgeführt. Die Kulturen für Gramfärbung, Oxidase- und Katalasetest wurden in oxischem M_{FGH} -Flüssigmedium bzw. auf M_{FGH} -Platten (siehe Kap. 2.6.1.2.2) bei Raumtemperatur angezogen.

2.6.4.2.1 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung erfolgte, wie in Bast (2001) beschrieben, unter Verwendung der Ammoniumoxalat-Kristallviolett-Lösung nach Hucker sowie der Lugolschen Lösung, verdünnt nach Gram. Auf einem Objektträger hitzefixierte Zellen wurden mit Kristallviolett-Lösung (1,5 g Kristallviolett in 10 ml 96% EtOH; 0,4 g NH_4 -Oxalat $\times H_2O$; 40 ml ddH₂O) überschichtet und für 1 min gefärbt. Dann wurden sie mit Lugolscher Lösung (1 g Jod, 2g Kaliumiodid, ad 300 ml ddH₂O) abgespült und für 1 weitere min gefärbt. Anschließend wurde mit EtOH (96%) entfärbt und mit ddH₂O nachgespült. Nach Gegenfärbung mit Safranin (0,5 g Safranin in 10 ml 96% EtOH, 90 ml ddH₂O; 30 - 60 s) und Waschen mit ddH₂O wurden die Objektträger luftgetrocknet und anschließend mikroskopiert. Gram-positive Organismen mit eingelagertem Kristallviolett-

Jod-Komplex waren an der dunkel violetten Färbung zu erkennen, während Gram-negative Zellen durch die Gegenfärbung rosa bis rot erschienen.

2.6.4.2.2 Katalase-Test

Zum Test auf Katalase-Aktivität wurden auf Agarplatten gewachsene Kolonien mit 10%-iger H₂O₂-Lösung betropft (Smibert & Krieg, 1994, verändert). Bei positiver Reaktion war die Bildung von Gasbläschen (Schäumen) zu beobachten.

2.6.4.2.3 Cytochrom *c*-Oxidasetest

Für den Cytochrom *c*-Oxidasetest wurden frisch abgenommene Bakterienkolonien auf ein Filterpapier gestrichen, das zuvor mit einer Tetramethyl-p-phenylendiamin- (1% w/v) und Ascorbinsäure-haltigen Lösung (0,1% w/v) befeuchtet wurde (Methode nach Kovács (1956), aus Cowan, 1975). Bei positiver Reaktion trat eine Blaufärbung auf.

2.6.4.2.4 Temperatur- und pH-Optimum sowie Salztoleranz

Zur Bestimmung von Temperatur- und pH-Optimum sowie der Salztoleranz wurde oxisches M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2) verwendet. Die Bestimmung wurde jeweils in drei Parallelen vorgenommen.

Um das Temperaturoptimum zu ermitteln, wurden die Kulturen bei pH 7 und Temperaturen von 5 - 55 °C (in 5 °C-Schritten) inkubiert.

Da das Seesalz im Medium bei pH-Werten über 8,5 anfang auszufallen, wurde im Medium zur Bestimmung des pH-Bereichs das Seesalz, wo möglich (Isolate D1-19, D9-3 und D11-58), durch NaCl ersetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl bzw. NaOH (in Schritten von 0,5 pH-Einheiten) auf 4,0 - 12,0 eingestellt und nach dem Autoklavieren überprüft; inkubiert wurde bei 35 °C. Ab pH 8,0 wurde anstatt des Phosphatpuffers Tris-HCl (ebenfalls 10 mM) verwendet.

Die Salztoleranz wurde in einem Bereich von 0 - 5% überprüft. Dazu wurde das Grundmedium (ohne Seesalz) mit verschiedenen Mengen an NaCl versetzt; der pH-Wert lag bei 7, inkubiert wurde bei 35 °C. Da zwei der Stämme (D2-3 und D5-41) weder ohne Salz noch mit NaCl

wachsen konnten, wurde der Test auch noch mit Seesalz im Konzentrationsbereich von 0 - 5% durchgeführt.

2.6.4.2.5 Weitere physiologische Charakteristika (API20E-Teststreifen)

Zur Feststellung weiterer physiologischer Charakteristika wurde das API20E-Testsystem (Biomérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich) herangezogen, das neben verschiedenen enzymatischen Tests v. a. die Verwertung von Zuckern abdeckt. Die Teststreifen wurden nach den Angaben des Herstellers beimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Beobachtung über mehrere Tage erfolgte nach 5 Tagen die Endauswertung.

2.6.4.2.6 Alternative Elektronenakzeptoren

Die Tests auf Wachstum in Gegenwart von alternativen Elektronenakzeptoren wurden in anoxischem M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2) durchgeführt. Das Grundmedium enthielt in diesem Fall kein Nitrat und wurde jeweils mit einem der folgenden Elektronenakzeptoren supplementiert: $NaNO_3$ (10 mM), $NaNO_2$ (2 mM), Na_2SO_4 (10mM) oder Fe^{3+} -Pyrophosphat (10mM). Das Wachstum wurde durch Messen der OD_{660} beobachtet. Alle Versuchsreihen wurden in Triplikaten ausgeführt. Als Kontrolle diente nicht supplementiertes Medium. Elektronenakzeptoren, die das Wachstum auf eine mindestens 1,5-fache End- OD_{660} im Vergleich zu nicht supplementiertem Medium erlaubten, wurden als wachstumsunterstützend gewertet. Die Analyse der alternativen Elektronenakzeptoren bzw. deren reduzierter Produkte erfolgte mit colorimetrischen Methoden (siehe Kap. 2.3.3).

2.6.4.2.7 Substrat- und Fermentationsproduktprofile

Zusätzlich zu den mittels der API20E-Streifen (Biomérieux) getesteten Substraten (hauptsächlich Zucker) wurde die Fähigkeit zur Verwendung einer Reihe weiterer Substanzen getestet. Für den Test auf Acetat-, Lactat-, Propionat- und Butyratverbrauch wurden die Isolate in oxischem M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2; enthält die genannten Substrate) angezogen. Nach Erreichen der stationären Phase wurden Proben genommen, abzentrifugiert und filtriert. Anschließend wurden sie entweder direkt mittels HPLC analysiert oder bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Bei den denitrifizierenden Stämmen D9-3, D11-58 und D5-41 erfolgte die Analyse auch nach Wachstum unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat bzw. Nitrit als Elektronenakzeptor. Ansonsten diente M_{FGH} (ohne Fettsäuren und Glukose) als Grundmedium, dem die jeweiligen Substrate in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt wurden (ausgenommen Casamino acids, Pepton: 0,05% (w/v)). Hier erfolgte die Auswertung anhand des beobachteten Wachstums (Messung der OD_{660}). Als wachstumsunterstützend wurden Substrate gewertet, die das Wachstum auf eine mindestens 1,5-fache End- OD_{660} im Vergleich zum nicht supplementierten Medium erlaubten.

Unter fermentativen Bedingungen (anoxisches M_{FGH} , allerdings ohne Nitrat) war durch Verfolgen der OD_{660} kein Wachstum feststellbar. Sicherheitshalber wurden die Kulturen mittels HPLC-Analyse dennoch auf Substratverbrauch und etwaige Bildung von Fermentationsprodukten überprüft. Da das Ergebnis negativ war, wurde auf eine Gasmessung verzichtet. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass keines der Isolate die im Medium M_{FGH} als mögliches Substrat enthaltene Glukose verwerten konnte, wurde der Test mit anoxischem M_{FGH} (ohne Nitrat, mit 2 mM Fruktose) wiederholt, da alle Isolate aerob gut mit Fruktose wuchsen. Jedoch war auch hier kein Wachstum festzustellen. Deshalb wurde auf eine weitere Analyse verzichtet.

2.6.4.2.8 *Anaerobes phototrophes Wachstum*

Die Fähigkeit der Isolate zu phototrophem Wachstum unter anoxischen Bedingungen wurde in 50 ml-Serumflaschen und/oder Bellco-Röhrchen zunächst mit dem Medium M27 (siehe Kap. 2.6.1.2.3) untersucht. Da hier höchstens minimales Wachstum zu beobachten war, wurde der Versuch mit einer modifizierten Variante des Mediums (M27mod) wiederholt, das statt der angegebenen Salze 2‰ Seesalz enthielt. Darüber hinaus wurden Vitamine und Spurenelemente durch die im Medium M_{FGH} verwendeten Lösungen ersetzt. Die Gefäße wurden bei ca. 30 °C am Licht inkubiert. Als Kontrolle dienten im Dunkeln bebrütete Kulturen.

Darüber hinaus wurde mittels PCR auf das Vorhandensein von Proteorhodopsin und Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) getestet (siehe Kap. 2.7.5.2.2). Proteorhodopsin ist ein retinalhaltiges Protein, das in marinem Bakterioplankton entdeckt wurde (Beja et al., 2000). Wie das homologe Pigment Bacteriorhodopsin, das in einigen Archaeen vorkommt, besteht es aus einem Transmembranprotein und einem Retinalmolekül, das als lichtgetriebene Protonenpumpe funktioniert. RubisCO ist das Enzym, das die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus einleitet. Sein Vorkommen stellt somit einen Hinweis auf (Photo)Autotrophie dar.

2.6.4.3 Membranspektren

Ein Membranspektrum wurde nur von dem Isolat D2-3 aufgenommen. Durchgeführt wurde dieser Teil von A. Göbner (LS Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth).

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 4 x 1 l oxischem M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2), wobei die Glukose durch Fruktose ersetzt wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C in einer J2-21 Zentrifuge (Beckman Instruments, München) abgeerntet und anschließend mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7) gewaschen. Das Zellpellet wurde gewogen und pro g Frischgewicht mit 1,5 ml PMSF-Phosphatpuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7, 3 ml; 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in EtOH, 30 µl; DNase I, 1000 U) versetzt. Die resultierende Zellsuspension wurde auf Eis homogenisiert und die Zellen durch 5- bis 10-malige Passage durch eine French-Press-Zelle (American Instruments Company, Silver Spring, MD, USA) bei einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Zelltrümmer und ganze Zellen wurden durch Zentrifugation (30 min bei 18000 x g) vom Lysat getrennt. Der Überstand (zellfreier Extrakt) wurde durch Ultrazentrifugation (240000 x g, 60 min, 4°C, Beckman LE-70, Beckman Instruments, München) in Cytoplasma und Membranfraktion getrennt. Das Membranpellet wurde in 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7) resuspendiert und erneut für 30 min bei 200000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7) aufgenommen. Durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 11000 x g wurden schwer lösliche Bestandteile abgetrennt. Teile der so erhaltenen partikelfreien Membranfraktion, der cytoplasmatischen Fraktion und des zellfreien Extraktes wurden mit Na-Dithionit reduziert. Dann wurden an einem Zweistrahlphotometer (UVIKON 930, Kontron Instruments, München) reduziert-minus-oxidierte Spektren von 400 - 600 nm aufgenommen (Fröstl et al., 1996; Matthies et al., 2001).

2.6.4.4 Pigmentanalyse

Auch die Pigmentanalyse erfolgte nur für Isolat D2-3. Die Zellen wurden aerob auf M_{FGH} -Platten und in flüssigem M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2) mit 5 mM Fruktose angezogen. Die Anzucht erfolgte sowohl am Licht als auch im Dunkeln. Nach 3 - 4 Tagen wurden die Flüssigkulturen durch Zentrifugation (J2-21 Zentrifuge, Beckmann Instruments) abgeerntet und in etwas NaCl-Lösung (0,9%, w/v) resuspendiert. Die auf Platten angezogenen Kulturen wurden direkt in

NaCl-Lösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet mit Methanol/Aceton im Verhältnis 7:2 extrahiert (Kämpfer et al., 2003b), das Gemisch wiederum abzentrifugiert, der Überstand in eine Quarzküvette transferiert und ein Absorptionsspektrum von 190 bis 900 nm aufgenommen (UVIKON 930 Spektrophotometer, Kontron Instruments).

2.6.4.5 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Isolate unter oxidischen Bedingungen auf M_{FGH} -Platten und in einem Fall (D2-3) zusätzlich in flüssigem M_{FGH} (siehe Kap. 2.6.1.2.2) angezogen. Die Zellen aus der Flüssigkultur wurde zunächst durch Zentrifugation ($2000 \times g$, 10 min) abgeerntet, das Pellet anschließend in ddH₂O resuspendiert. Die auf Platte angezogenen Zellen wurden direkt in ddH₂O suspendiert. Anschließend wurden einige Zellen an einem Kohlenstofffilm adsorbiert und mit einer Uranyl-Acetat-Lösung (2% w/v, pH 4,8) negativ kontrastiert (Valentine et al., 1968). Untersucht wurden die Präparate an einem CEM 902A Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Präparation und Untersuchung wurden von R. Grotjahn (LS Elektronenmikroskopie, Universität Bayreuth) durchgeführt.

2.6.4.6 G+C-Gehaltsbestimmung

Die Analyse des G+C-Gehalts des Isolats D2-3 wurde von R. Rosselló-Mora und M. Urdiain (Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB), Esporles, Balearen, Spanien) durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte nach der in Peña et al. (2005) beschriebenen Methode. Dazu wurde zunächst die genomische DNA präpariert (Marmur, 1961), durch Kochen denaturiert und anschließend mit P1 Nuklease hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mittels HPLC analysiert und der G+C-Gehalt berechnet (Tamaoka & Komagata, 1984, modifiziert).

2.6.4.7 Hinterlegung in Stammsammlungen

Die fünf charakterisierten Bakterienstämme wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt. Sie erhielten die Stammnummern DSM18939 bzw. ATCC BAA-1446 (D1-19),

DSM18922 bzw. ATCC BAA-1445 (D2-3), DSM18849 bzw. ATCC BAA-1449 (D5-41), DSM18921 bzw. ATCC BAA-1447 (D9-3) und DSM19039 bzw. ATCC BAA-1448 (D11-58).

2.6.5 Reaktion ausgewählter Isolate auf Sulfid („Sulfidtoleranztest“)

Der Einfluss von Sulfid auf Wachstum und Nitratumsetzung von verschiedenen nitratreduzierenden und denitrifizierenden Organismen aus dem System wurde an ausgewählten Isolaten untersucht, die verschiedenen, systemrelevanten Sulfidkonzentrationen ausgesetzt wurden. Zum einen wurde das Wachstum von Kulturen unter sulfidischen Bedingungen, wie sie in tieferen Schichten des DB vorherrschen („Langzeiteffekt“), beobachtet. Zum anderen wurde der akute Effekt von Sulfidpeaks durch die Zugabe von Sulfid zu in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kulturen getestet. Die Hauptversuche wurde in Zusammenarbeit mit C. Schwermer (MPI für marine Mikrobiologie, Bremen) durchgeführt.

2.6.5.1 Vorversuch

Um geeignete Isolate und Sulfidkonzentrationen für den eigentlichen Versuch festzulegen, wurde im Vorfeld mindestens ein Vertreter jeder Isolatgruppe (RFLP-Muster; 16S rRNA-Ähnlichkeit) auf die Fähigkeit zu anaerobem Wachstum in Gegenwart von Sulfid getestet. Der Test wurde in anoxischem M_{FGH} durchgeführt, dem vor Versuchsbeginn Na_2S zugegeben worden war (angestrebte Endkonzentrationen: 0, 100, 500, 1000 und 5000 μM). Nach dem Animpfen wurde das Wachstum der Isolate durch Messen der OD_{660} beobachtet. Aufgrund der großen Zahl zu testender Isolate wurde nur eine Einfachbestimmung durchgeführt.

2.6.5.2 Wachstum unter dem Einfluss von Sulfid („Langzeiteffekt“)

Der längerfristige Effekt von Sulfid wurde durch Beobachten von Wachstum und Nitratumsatz verschiedener, ausgewählter Isolate in Gegenwart von Sulfid untersucht. Wie im Vortest wurden diese Inkubationsversuche in anoxischen M_{FGH} durchgeführt, das zuvor mit verschiedenen Mengen an Na_2S versetzt worden war. Die eingesetzten Konzentrationen richteten sich nach der im Vortest ermittelten Empfindlichkeit der jeweiligen Isolate und reichten meist von 0 - 1000 μM Endkonzentration im Medium. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Das

Wachstum wurde durch Messen der OD₆₆₀ (siehe Kap. 2.6.3), die Bildung gasförmiger Produkte (N₂O, N₂) mittels GC-Messungen (siehe Kap. 2.3.1) verfolgt. Zur Bestimmung von Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentrationen wurden zu jedem Messzeitpunkt Flüssigproben genommen, die sofort eingefroren und bis zur photometrischen Messung (siehe Kap. 2.3.3) bei -20 °C gelagert wurden. Bei der t_{end}-Messung wurden zusätzlich HPLC-Proben (siehe Kap. 2.3.2) zur Ermittlung des Verbrauchs anorganischer Substrate (Fettsäuren und Glukose) sowie Proben zur Sulfidbestimmung (siehe Kap. 2.3.3) entnommen. Der Messrhythmus richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Isolate. Die Messungen wurden beendet, wenn kein weiterer Anstieg der OD₆₆₀ mehr festzustellen war.

2.6.5.3 Zugabe von Sulfid zu wachsenden Kulturen („akuter Effekt“)

Der akute Effekt von Sulfidpeaks wurde durch Zugabe von Sulfid zu bereits wachsenden Kulturen simuliert. Ausgewählte Isolate wurden zunächst in anoxischem M_{FGH} angezogen und das Wachstum mittels OD₆₆₀-Messung verfolgt. Die Sulfidzugabe erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase in Form von Na₂S (Endkonzentrationen im Medium 100 µM und 500 bzw. 1000 µM). Wie oben wurden die Versuche in Triplikaten durchgeführt. Gasmessungen und Entnahme von Flüssigproben (siehe oben) erfolgten hier zu t₀, 1 h vor der Sulfidzugabe (= t₁), 1h nach der Sulfidzugabe (= t₂) und dann meist im 2-Stunden-Rhythmus bis zu Beendigung des Wachstums (= t_{end}). Zu t_{end} wurden wieder HPLC-Proben und Proben zur Sulfidbestimmung genommen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Extraktion

2.7.1.1 Methode A

Die Extraktion von DNA aus Proben von den verschiedenen Biofiltern erfolgte zunächst mit einer auf mechanischer Lyse beruhenden Extraktionsmethode (Oved et al., 2001; Cytryn et al., 2005a), die auf dem FastDNA® Spin Kit for Soil (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA) basierte. Dazu wurden 0,4 - 0,6 g Probe in „Lysing Matrix-Tubes“ eingewogen, mit 900 µl Extraktionspuffer (Qbiogene) und 100 µl 20% SDS versetzt, gemischt und durch „Bead-Beating“ für 45 s

bei Geschwindigkeit 5,5 aufgeschlossen. Statt der vom Hersteller mitgelieferten „Lysing Matrix“ wurden Glaskügelchen (Durchmesser: 106 µm und 2 - 3 mm) verwendet. Darüber hinaus wurde ein modifizierter Waschpuffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA, 50% (v/v) Ethanol) eingesetzt. Ansonsten wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.7.1.2 Methode B

Methode A erwies sich als unzureichend für die Extraktion von DNA aus Ammoniumoxidiererrzellen. Deshalb wurde zur DNA-Extraktion aus TF-Biofilm ein enzymatischer Verdau (Juretschko et al., 1998) mit dem FastDNA®Kit von Qbiogene kombiniert. Dazu wurde ein Biofilm-Pellet (0,25 g) in 300 µl DNA-Extraktionspuffer (Tab. 10) resuspendiert und in ein „Lysing Matrix-Tube“ (Qbiogene) überführt, das eine „¼ Sphere“ und „Garnet Matrix“ enthielt. Nach einem anfänglichen „Bead-Beating“-Schritt (2 x 15 s bei einer Geschwindigkeit von 4,0 und 1 x 15 s bei einer Geschwindigkeit von 4,5) in einem FastPrep®-Instrument (Qbiogene) wurden 50 µl Enzym-Mix I (Tab. 11) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Enzym-Mix II (Tab. 12) zugegeben und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl Dodecyl-Sulfat (SDS) und Inkubation für 2 h bei 65 °C wurden 800 µl Extraktionspuffer CLS-TC (Qbiogene) zugegeben. Nach einer zweiten „Bead-Beating“-Runde (2 x 15 s bei Geschwindigkeit 5,0, 1 x 15 s bei Geschwindigkeit 5,5) wurde die DNA-Extraktion mit dem FastDNA®Kit (Qbiogene) wie vom Hersteller angegeben fortgesetzt.

Tab. 10: DNA-Extraktionspuffer für Extraktionsmethode B (Juretschko et al., 1998).

Bestandteil	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
Na-EDTA, pH 8,0	100 mM
Na-Phosphat, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 M
Cetyl-tri-methyl-Ammoniumbromid (CTAB)	1% (w/v)

Tab. 11: Enzym-Mix I für Extraktionsmethode B (Juretschko et al., 1998).

Bestandteil*	Endkonzentration
Lysozym	10 mg/l
Lipase Typ7 aus <i>Candida rugosa</i>	10 mg/l
Pektinase aus <i>Aspergillus niger</i>	10 mg/l
β -Glucoronidase aus <i>Helix pomatia</i>	10 mg/l

* alle von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tab. 12: Enzym-Mix II für Extraktionsmethode B (Juretschko et al., 1998).

Bestandteil*	Endkonzentration
Proteinase K	10 mg/l
Protease Typ9 aus <i>Bacillus polymyxa</i>	10 mg/l
Pronase P aus <i>Streptomyces griseus</i>	10 mg/l

* Proteinase K von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Rest von Sigma

2.7.1.3 Weitere Methoden

Zum Vergleich der Ergebnisse wurde DNA aus TF-Proben auch nur unter Verwendung des FastDNA®Kits (Qbiogene) extrahiert. Darüber hinaus wurde noch ein weiteres DNA-Extraktionsprotokoll (Burrell et al., 2001) getestet, das einen enzymatischen Verdau mit Lysozym und Proteinase K beinhaltet.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe wurde Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Systemen (u. a. BioRad Mini-, Midi- und Maxi-Sub Cell, BioRad, Hercules, CA, USA) durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde 1 - 3 % Agarose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Eisessig, 1mM EDTA) aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in dem vorbereiteten Gießstand das Gel gewünschter Größe gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die mit Laufpuffer (1 x TAE) befüllte Apparatur eingesetzt. In einer Mikrotiterplatte oder auf einem Parafilmstreifen wurden jeweils 3 - 10 μ l Probe mit 2 μ l Ladepuffer (Blue/Orange 6 x Loading Dye

(Promega, Madison, WI, USA) oder selbst hergestellte Gemische) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte - je nach Größe und Agaroseanteil des Gels - bei einer angelegten Spannung von 80 - 160 V für 20 - 60 min. Als Längenstandards wurden PCR Markers, 1 kb Step DNA Ladder (beide von Promega), Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) oder MWM-1 (BILATEC AG, Viernheim, Deutschland) verwendet. Nach dem Lauf wurden die Gele für 30 min mit SYBR-Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 40 µl in 400 ml 1 x TAE bzw. 5 µl in 50 ml) gefärbt und anschließend für 15 min in ddH₂O gewaschen. Dann wurden die Gele an einem Fluoreszenz-Imager (STORM, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) im Modus „Blue Fluorescence“ gescannt und am PC dokumentiert. Alternativ wurden die angefärbten Banden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einer (Digital)Kamera dokumentiert. Neben der nachträglichen Färbung mit SYBR-Gold wurde auch mit Ethidiumbromid (Bio-rad; 10 mg/ml) gefärbt, das dem Gel gleich beim Gießen in einer Konzentration von 50 ng/ml zugesetzt wurde.

2.7.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde „Low Melting Point“-Agarose (Promega, Madison, WI, USA) oder NuSieve 1:3 Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) verwendet. Ansonsten wurde die Elektrophorese wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Nach dem Färben wurde die Gele auf einem UV-Tisch (UVT-20 M, Herolab, Wiesloch, Deutschland) betrachtet, die Banden der gewünschten Länge mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (Minielute, Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland oder Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von DNA-Proben bestimmen zu können, wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.7.2) DNA-Standards bekannter Konzentration mit aufgetragen. Durch densitometrischen Vergleich mit den DNA-Standards konnte dann die DNA-Konzentration in den Proben abgeschätzt werden.

2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Nukleinsäure-Gemischen. Das zu vervielfältigende Fragment wird dabei durch die die Zielsequenz flankierenden Primer definiert (Saiki et al., 1988).

2.7.5.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

Die PCR-Reaktionen wurden in einem T-Gradient Cycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) oder in einem Peltier Thermal Cycler, Modell PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) durchgeführt. Meist wurden die PCR-Reagenzien von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) oder Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Zur Amplifikation von *narG*- und *nosZ*-Genfragmenten sowie für die γ -AOB-spezifische PCR und die Ru-bisCO-PCR kam auch die Hot Star Taq von Qiagen (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Alle Reaktionen wurden mit DNase- und RNase-freiem Wasser (Sigma) oder mit steril-filtrierte und autoklaviertem PCR-ddH₂O angesetzt. Die Reaktionsansätze hatten je nach Bedarf ein Volumen von 25, 50 oder 100 μ l. Ein 50 μ l Ansatz enthielt in der Regel:

- Eppendorf-System: 50 mM KCl und 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mg/ml BSA (Rinderserum-Albumin = bovine serum albumine), 125 μ M jedes dNTP, je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1 ml Template (DNA-Extrakt oder Zellsuspension), sowie 1U Taq DNA-Polymerase,
- Sigma-System: 75 mM KCl und 10 mM Tris-HCl pH 8,8, alles andere wie oben,
- Qiagen-System: PCR-Puffer (Tris-HCl, KCl und (NH₄)₂SO₄ unbekannter Konzentration, 15 mM MgCl₂, pH 8,7 (20 °C)), Q-Solution (Enhancer unbekannter Zusammensetzung), 1U HotStarTaq DNA-Polymerase, alles andere wie oben.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Umweltproben wurde dem Eppendorfsystem oft noch ein Enhancer (5 x TaqMaster, 10 μ l pro 50 μ l-Ansatz) zugesetzt. Der Reaktionsmix für die *narG*-PCR enthielt abweichend von der oben angegebenen Standardmischung je 100 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (= 10-fache Konzentration) sowie 2 mM MgCl₂. Bei der *nosZ*-PCR wurde die Primerkonzentration auf das 2- bis 5-fache erhöht, die Magnesiumkonzentration auf 2 oder 3 mM MgCl₂. Die *amoA*-PCR wurde mit 2-facher Primerkonzentration und 3 mM

MgCl₂ durchgeführt. Bei allen Reaktionen wurden Negativkontrollen (Ansatz mit PCR-Wasser anstatt des Templates) und - sofern vorhanden - auch Positivkontrollen mitgeführt.

2.7.5.2 Verwendete Primer und Programme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer zur Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten und Teilstücken funktioneller Gene (*amoA*, *narG*, *nosZ*, *rbcL* und *pop*) sind in Tabelle 13 aufgelistet. Einen Überblick über die verwendeten PCR-Programme geben Tabelle 14 und 15. Wie und warum die aufgelisteten Primer und Programme zum Einsatz kamen ist im Folgenden kurz erläutert.

2.7.5.2.1 16S rRNA

Bakterielle 16S rRNA-Genfragmente aus TF-Proben wurden zunächst mit dem universellen Primerpaar GM3/GM4 (Tab. 13) mit dem gleichnamigen PCR-Programm (Tab. 14) amplifiziert, um die im System vorhandenen Ammonium- und Nitritoxidierer zu identifizieren. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als ungeeignet für die Erfassung von Ammoniumoxidierern. Deshalb wurde zur Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten dieser Gruppe eine semispezifische PCR mit dem universellen Primer 616V als Vorwärtsprimer und der für β -AOB spezifischen Sonde NSO1225 als Rückwärtsprimer verwendet. Um 16S rRNA-Genfragmente der *Nitrosomonas marina*-verwandten Gruppe, Cluster 2 (siehe Kap. 3.1.2.2) zu amplifizieren, war eine noch spezifischere PCR mit dem „Reverse Complement“ der Sonde NSMR76 als Vorwärtsprimer und NSO1225 als Rückwärtsprimer erforderlich. Um zu überprüfen, ob auch γ -AOB (*Nitrosococcus oceani*, *Nc. halophilus*) vorhanden waren, wurden die Primer NOC1a-127F und NOC2a-1268R verwendet. Zum Test auf das Vorkommen von *Nitrobacter* spp. wurde der Vorwärtsprimer 26F mit der *Nitrobacter*-spezifischen Sonde NIT3 kombiniert. Für alle Reaktionen wurde das PCR-Programm 16S-Standard, allerdings mit verschiedenen Annealing-Temperaturen, verwendet (Tab. 14).

Die 16S rRNA-Genfragmente der isolierten Nitratreduzierer und Denitrifikanten wurden ohne vorherige DNA-Extraktion direkt aus den Kulturen amplifiziert. Dazu wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers einige Zellen von der Platte in den PCR-Ansatz übertragen. Für die PCR wurde das Primerpaar 26F/1492R in Kombination mit dem Programm BK56 verwendet.

2.7.5.2.2 Funktionelle Gene (*amoA*, *narG*, *nosZ*, *rbcL* und *pop*)

Bakterielle *amoA*-Genfragmente wurden mittels der Primer *amoA*-1F und *amoA*-2R unter Verwendung des Programms GAK58-35 amplifiziert. Für die *amoA*-DGGE (siehe Kap. 2.7.6) wurde der Primer *amoA*-1F durch den mit einer GC-Klammer versehenen Primer *amoA*-1F-clamp ersetzt. Der Vollständigkeit halber ist in Tabelle 15 auch das in Israel verwendete *amoA*-PCR-Programm (*amoA*-LK; Koch et al., unveröffentlicht) mit aufgeführt. Zur Amplifikation Crenarchaeen-*amoA* wurde das Primerpaar *crenamoA*-F2 und *crenamoA*-R2 zusammen mit dem Programm Cren-*amoA* verwendet. Ferner wurden auch die Primer Arch-*amoA*-F und *amoA*-R mit dem zugehörigen Programm Arch-*amoA* getestet.

Zur Amplifikation von *narG*-Genfragmenten aus von der DSMZ bezogenen Reinkulturen, Proben aus TF, DB und FBR, sowie eigenen Isolaten wurden die Primer *narG*1960F und 2650R verwendet. Um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen, wurde eine so genannte „Touch Down“-PCR durchgeführt. Hierzu wird die Annealing-Temperatur anfangs deutlich höher gewählt als der ermittelte T_m der Primer. Dann wird die Annealing-Temperatur in jedem weiteren Zyklus abgesenkt (üblicherweise in 0,5 °C-Schritten), bis die für die PCR optimale Annealing-Temperatur erreicht ist. Zunächst wurde das zusammen mit den Primern veröffentlichte PCR-Programm (Philippot et al., 2002) - hier als *narG*-PH bezeichnet - an den Reinkulturen der DSMZ getestet. Da die Erfolgsquote nur gering war, wurde das Programm *narG*-BK entwickelt (Abb. 11) und mit variierenden Annealing-Temperaturen verwendet (minimal „Touch Down“ von 50 °C auf 46 °C, maximal „Touch Down“ von 60 °C auf 56 °C).

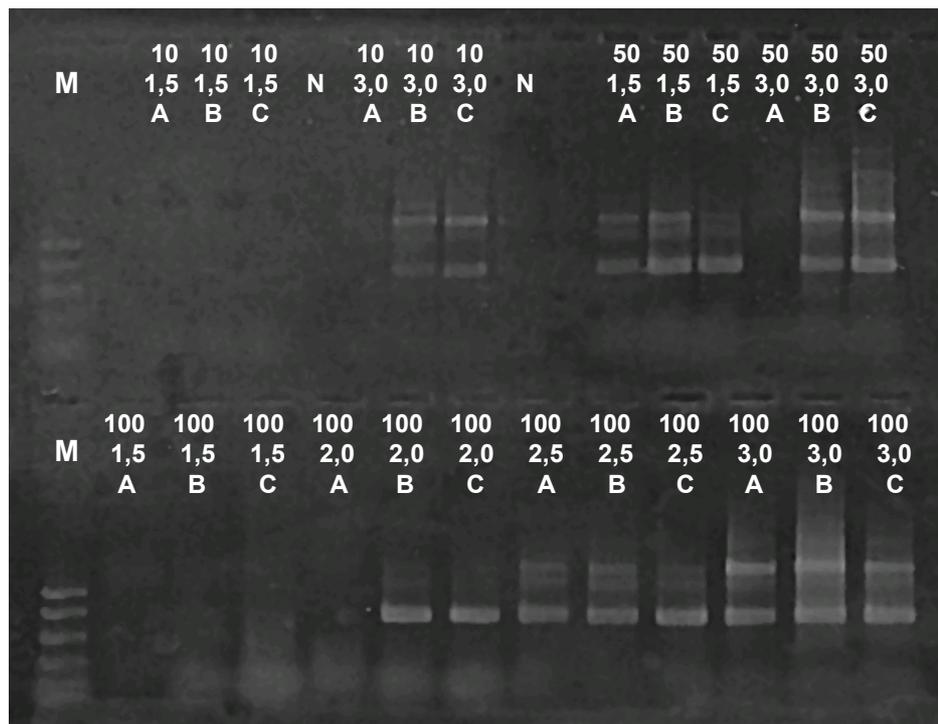


Abb. 11: Agarosegel des mit den Primern *narG1960F/narG2650R* bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, Primer- und Magnesiumkonzentrationen amplifizierten *narG*-Genfragments von *E. coli* (~ 690 bp). Beschriftung: M: Lauflängenmarker (1000, 750, 500, 300, 150 und 50 bp), Obere Reihe: Primerkonzentration[pmol], mittlere Reihe: Magnesiumkonzentration [mM], untere Reihe: Annealing-Temperatur: A: „Touch Down“ von 50 auf 46 °C, B: von 52 auf 48 °C, C: von 58 auf 54 °C.

NosZ-Genfragmente aus DB-Proben und Isolaten wurden mittels der Primer *nosZ661F* und *nosZ 1773R* amplifiziert. Wie bei *narG* wurden hier „Touch Down“-Programme (s. o.) eingesetzt. Für die DB-Proben wurde dazu das Programm *nosZ-NR* verwendet. Für die Isolate fand daneben auch das Programm *nosZ-BK* Anwendung, das wie das *narG*-Programm mit variierenden Annealing-Temperaturen eingesetzt wurde. Einen Test zur Spezifität dieses Programms bei verschiedenen Annealing-Temperaturen zeigt Abb. 12.

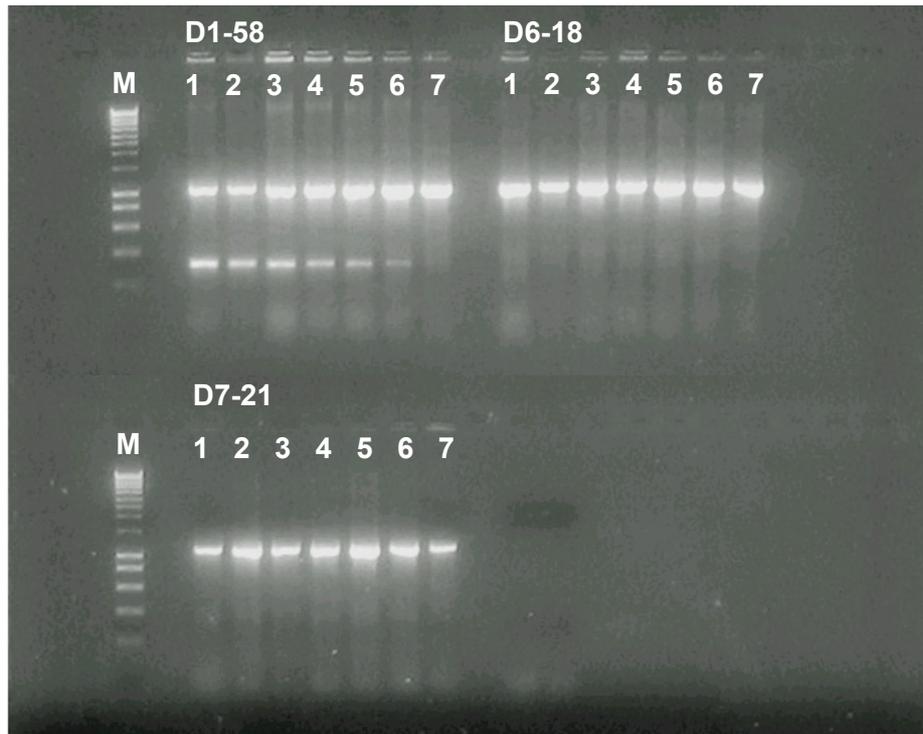


Abb. 12: Agarosegel der mit *nosZ661F/nosZ1773R* bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen amplifizierten *nosZ*-Genfragmente (~ 1100 bp) von 3 verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies (D1-58, D6-18 und D7-21). M: Marker (10, 8, 6, 5, 4, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,8, 0,6, 0,4 und 0,2 kb), 1-7: „Touch Down“ von 50 auf 46, von 52 auf 48, von 54,4 auf 50,4, von 55,6 auf 51,6, von 56,8 auf 52,8 °C, von 58 auf 54 und von 60 auf 56 °C.

Die fünf genauer charakterisierten Isolate (siehe Kap. 3.2.2.4) wurden mittels PCR auf das Vorkommen von Proteorhodopsin und Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) hin überprüft. Die verwendeten Primerpaare o-PR2/o-PR3 und K2f/V2r zielten auf die Gene *pop* (Proteorhodopsin-Gen) bzw. *rbcL* (große Untereinheit (Formen 1A und 1C) der RubisCO) ab. Die Amplifikation erfolgte mit den PCR-Protokollen PR bzw. RubisCO.

2.7.5.2.3 Klon-Inserts

Klon-Inserts wurden mittels der Primer M13uni und M13rev amplifiziert, deren Bindungsstellen die „Multiple Cloning Site“ des Vektors flankieren. Dazu wurde das Programm M13 oder auch das Programm BK56 verwendet. In der Regel wurden die Klon-Inserts direkt aus den *E. coli*-Zellen amplifiziert, die mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte in den PCR-Ansatz übertragen wurden.

Tab. 13: Sequenz, Schmelztemperatur, Zielgen und Bindungsstelle der verwendeten Primer. Vorwärts gerichtete Primer (forward) sind mit f/F gekennzeichnet, rückwärtsgerichtete (reverse) mit r/R.

Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C] ^a	Zielgen	Position	Referenz
GM3	AGA GTT TGA TCM TGG C	46/48	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	8 - 23 ^b	Muyzer et al., 1995
GM4	TAC CTT GTT ACG ACT T	44	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	1492 - 1507 ^b	Muyzer et al., 1995
616V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	56/60	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	8 - 27 ^b	Springer et al., 1993
26F	AGA GTT TGA TCMC TGG CTC A	56	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	8 - 26 ^b	Hicks et al., 1992
1492R	AC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	60/62	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	1492 - 1512 ^b	Lane, 1991
NSMR76F	CCC CCC TCT TCT GGA TAC	58	16S rRNA, spez. Klönggr.	132-149 ^b	Burrell et al., 2001
NSO1225R	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	58	16S rRNA, β- AOB	1225 - 1244 ^b	Mobarry et al., 1996
NIT3R	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	60	16S rRNA, <i>Nitrobacter sp.</i>	1035 - 1048 ^b	Wagner et al., 1996
NOC 1a-127F	GGA ATC TGG CCT CTA G	50	γ-AOB	127 - 143 ^b	Ward et al., 2000 ^h
NOC 2a- 1268R	AGA TTA GCT CCG CAT C	48	γ-AOB	1268 - 1283 ^b	Ward et al., 2000 ^h
<i>amoA</i> -1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	56	<i>amoA</i> , β-AOB	332 - 349 ^c	Rotthauwe et al., 1997
<i>amoA</i> -1F- clamp	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	56	<i>amoA</i> , β-AOB	332 - 349 ^c	Rotthauwe et al., 1997
<i>amoA</i> -2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	66/68	<i>amoA</i> , β-AOB	802 - 822 ^c	Rotthauwe et al., 1997
Arch- <i>amoA</i> F	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG	60	<i>amoA</i> , <i>Crenarchaeota</i>	o. A. ^d	Francis et al., 2005
Arch- <i>amoA</i> R	GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT	62	<i>amoA</i> , <i>Crenarchaeota</i>	o. A. ^d	Francis et al., 2005
CrenamoA-F2	TGG TCT GGY TWA GAC GMT GTA	60/64	<i>amoA</i> , <i>Crenarchaeota</i>	o. A. ^d	de la Torró et al., unpublished
CrenamoA-2R	CCC AYT TTG ACC ARG CGG CCA	66/70	<i>amoA</i> , <i>Crenarchaeota</i>	o. A. ^d	de la Torró et al., unpublished
<i>narG</i> 1960F	TAY GTS GGS CAR GAR AA	48/54	<i>narG</i> , universell	o. A. ^d	Philippot et al., 2002
<i>narG</i> 2650R	TTY TCR TAC CAB GTB GC	46/54	<i>narG</i> , universell	o. A. ^d	Philippot et al., 2002
<i>nosZ</i> 661F	CGG CTG GGG GCT GAC CAA	57	<i>nosZ</i> , universell	661 - 678 ^e	Scala & Kerkhof, 1998
<i>nosZ</i> 1773R	ATR TCG ATC ARC TGB TCG TT	46/52	<i>nosZ</i> , universell	1753 - 1773 ^e	Scala & Kerkhof, 1998
K2f	ACC AYC AAG CCS AAG CTS GG	66/68	<i>rbcl</i>	o. A. ^d	Nanba et al., 2004
V2r	GCC TTC SAG CTT GCC SAC CRC	70/72	<i>rbcl</i>	o. A. ^d	Nanba et al., 2004
o-PR2	WWN MGN TAY GTN GAY TGG	50/56	<i>pop</i>	o. A. ^d	Frigaard et al., 2006
o-PR3	GGR TAD ATN GCC CAN CC	50/56	<i>pop</i>	o. A. ^d	Frigaard et al., 2006
M13uniF	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	54	pGEM-T Multiple Cloning Site	n. a. ^f	Messing, 1983
M13revR	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	58	pGEM-T Multiple Cloning Site	n. a. ^f	Messing, 1983

^a Schmelztemperatur

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

^c bezogen auf das *amoA*-Gen von *Nitrosomonas europaea*

^d o. A., ohne Angabe, in der Quelle nicht angegeben

^e bezogen auf das *nosZ*-Gen von *Pseudomonas stutzeri*

^f n. a., nicht anwendbar

^g GC-Klammer: 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'

^h Originalprimer um 4 Nukleotide verkürzt, um alle bekannten γ -AOB zu erfassen

Tab. 14: PCR-Programme zur Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten und Klon-Inserts.

Programm	GM3-GM4	16S-Standard	γ -AOB	BK56	M13	
Primer (f/r)	GM3/GM4	verschiedene	NOC 1a/2a	26F/1492R	M13uni/rev	
Bedingungen	Temp [°C] / t [min]	Temp [°C] / t [min]	Temp [°C] / t [min]	Temp [°C] / t [min]	Temp [°C] / t [min]	
1	Anfangs-Denaturierung	94 / 2	94 / 5	94 / 5	94 / 10	94 / 2
2	Denaturierung	-	-	94 / 1	-	-
3	Annealing	-	-	52 ^b / 1	-	-
4	Elongation	-	-	72 / 2	-	-
5	Wiederholung: Schritt 2-4	-	-	10x	-	-
6	Denaturierung	94 / 1	94 / 1	94 / 1	94 / 1	94 / 1
7	Annealing	42 / 1	v ^a / 1	47 / 1	56 / 1	50 / 1
8	Elongation	72 / 2	72 / 2	72 / 2	72 / 2	72 / 2
9	Wiederholung: Schritt 6-8	34x	34x	25 bis 40x	34x	34x
10	End-Elongation	72 / 5	72 / 5	72 / 5	72 / 5	72 / 5
11	Ende	8 / ∞	14 / ∞	14 / ∞	14 / ∞	8 / ∞

^a v, variierend: 616V/NSO1225R: 52 °C, NSMR76F/NSO1225R: 54 °C, 26F/NIT3R: 60 °C

^b \downarrow , „Touch Down“: Verringerung der Annealing-Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus

Tab. 15: PCR-Programme zur Amplifikation von Teilstücken funktioneller Gene.

Programm	AmoA-LK	GAK 58-35	Cren-amoA	Arch-amoA	PR	
Primer (f/r)	AmoA-1F/2R	AmoA-1F/2R	Cren-amoA-2F/2R	Arch-amoA-F/R	o-PR2/o-PR3	
Bedingungen	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	
1	Anfangs-Denaturierung	95 / 180	94 / 120	94 / 600	95 / 300	94 / 240
2	Denaturierung	-	94 / 30	-	-	-
3	Annealing	-	58 / 60	-	-	-
4	Elongation	-	72 / 45 ^a	-	-	-
5	Wiederholung: Schritt 2-4	-	33x	-	-	-
6	Denaturierung	94 / 30	94 / 30	94 / 30	94 / 45	94 / 30
7	Annealing	58 / 30	58 / 60	58 / 30	53 / 60	50 / 30
8	Elongation	72 / 30	-	72 / 45 ^a	72 / 60	72 / 60
9	Wiederholung: Schritt 6-8	34x	-	39x	29x	30x
10	End-Elongation	72 / 120	72 / 300	72 / 600	72 / 900	72 / 600
11	Ende		14 / ∞	14 / ∞	14 / ∞	14 / ∞

Programm	narG-PH	narG-BK	nosZ-NR	nosZ-BK	RubisCO	
Primer (f/r)	narG1960F/narG2650R	narG1960F/narG2650R	nosZ661F/nosZ1773R	nosZ661F/nosZ1773R	K2f/V2r	
Bedingungen	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	Temp [°C] / t [s]	
1	Anfangs-Denaturierung	95 / 300	94 / 600 bzw. 95/ 900 ^c	95/ 900 ^c	94 / 180	
2	Denaturierung	94 / 30	94 / 60	94 / 60	-	
3	Annealing	60 ^b / 30	50-60 ^d / 60	57 ^b / 60	50-60 ^d / 60	-
4	Elongation	72 / 45	72 / 120	72 / 45	72 / 120	-
5	Wiederholung: Schritt 2-4	9x	7x	13 x	7x	-
6	Denaturierung	94 / 30	94 / 60	92 / 30	94 / 60	94 / 45
7	Annealing	55 / 30	46-56 / 60	50 / 60	46-56 / 60	62 / 60
8	Elongation	72 / 45	72 / 120	72 / 45	72 / 120	72 / 90
9	Wiederholung: Schritt 6-8	29x	26x	15x	26x	30x
10	End-Elongation	72 / 360	72 / 600	72 / 600	72 / 600	72 / 1200
11	Ende	8 / ∞	8 / ∞	14 / ∞	8 / ∞	14 / ∞

^a 45+: ausgehend von 45 s Verlängerung der Zeit für den Annealing-Schritt um eine Sekunde pro Zyklus

^b ↓, „Touch Down“: Verringerung der Annealing-Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus

^c nötig für Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase (Qiagen-Kit)

^d entweder ausgeführt als Gradienten-PCR mit einem Temperaturunterschied von 10 °C quer über den Heizblock mit Annealing-Temperaturen von minimal 50 °C → 46 °C bis maximal 60 °C → 56 °C oder einzeln mit „Touch Down“ 50 °C → 46 °C, 52 °C → 48 °C, 56 °C → 50 °C und 60 °C → 56 °C

2.7.6 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

2.7.6.1 Prinzip und Anwendung

DNA-Fragmente gleicher Länge mit unterschiedlicher Sequenz lassen sich anhand ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten-Gel auftrennen (Muyzer et al., 1998; Muyzer & Smalla, 1998). Das Trennungsprinzip beruht auf der stark verminderten elektrophoretischen Mobilität eines teilweise aufgeschmolzenen doppelsträngigen DNA-Moleküls in einem Polyacrylamid-Gel mit einem linearen Gradienten aus DNA-denaturierenden Agentien (Gemisch aus Harnstoff und Formamid).

Bei der vorausgehenden PCR wird auf einer Seite der zu amplifizierenden DNA-Fragmente eine sogenannte „GC-Klammer“ angebracht. Dabei handelt es sich um einen 30 - 50 bp langen Sequenzabschnitt, der nur aus Gs und Cs besteht und am 5'-Ende eines der beiden PCR-Primer angehängt ist (Sheffield et al., 1989; Sheffield et al., 1992). So erhalten alle DNA-Fragmente an einem Ende eine Domäne mit sehr hohem Schmelzpunkt, die die vollständige Ablösung der beiden Teilstränge voneinander verhindert. Bei ihrer Wanderung durch den Gradienten öffnen sich die DNA-Fragmente allmählich - an einem Ende durch die GC-Klammer fixiert - wie „Fallschirme“ und bleiben (je nach Schmelzverhalten) an verschiedener Position des Gels stecken.

Im Idealfall entspricht jede Bande auf dem Gel einer Basenpaarsequenz und damit näherungsweise einer Bakterienspezies in der Probe. Es entsteht ein charakteristischer „Fingerabdruck“ der mikrobiellen Gemeinschaft der analysierten Probe, anhand dessen sich die mikrobiellen Gemeinschaften verschiedener Proben vergleichen oder die Entwicklung einer Gemeinschaft über die Zeit beobachten lassen.

In diesem Fall sollte die Entwicklung der Ammoniumoxidierer-Population im TF-Biofilm nach dem Neustart des Systems beobachtet werden. Dies geschah anhand eines 451bp-Fragments des *amoA*-Gens, das mit dem Primerpaar *amoA*-1F-clamp/*amoA*-2R aus DNA-Extrakten von TF-Proben amplifiziert wurde (siehe Kap. 2.7.1 und 2.7.5).

2.7.6.2 Lösungen und Reagenzien

Zur Herstellung der Gradientengele wurden die unten angegebenen Acrylamid-Stammlösungen und Reagenzien verwendet. Die Acrylamid-Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen für

15 min im Vakuum entgast, sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,45 μm) und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert (Haltbarkeit max. 1 Monat).

• **0 % denaturierendes Acrylamid (0% UF, 8% AA)**

Bestandteil	Menge
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (BioRad)	20 ml
50 x TAE (2 M Tris-HCl, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA pH 8,8)	2 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

• **100% denaturierendes Acrylamid (100% UF, 8% AA)**

Bestandteil	Menge
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (BioRad)	20 ml
50 x TAE (2 M Tris-HCl, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA pH 8,8)	2 ml
Harnstoff (Urea, U)	42 g
Formamid (deionisiert, F)	40 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

• **N,N,N,N-tetramethylethylendiamin (TEMED; BioRad)**

• **10 % Ammoniumpersulfat (APS)**

(0,1 g APS/ml, gelöst in ddH₂O, in 1,5 ml ERGs portionsweise bei -20 °C gelagert)

2.7.6.3 Durchführung

Die Auftrennung der *amoA*-Fragmente erfolgte in einer Protean II Cell (BioRad, Richmond, CA, USA). Als Spannungsquelle diente ein Power-Pack 3000 (BioRad). Als Laufpuffer wurde 1 x TAE (siehe Kap. 2.7.2) verwendet. Die Glasplatten, Spacer und Kämme wurden erst mit Wasser und Seife gründlich gereinigt, dann mit ddH₂O und abschließend mit EtOH (80%) abgespült. Nach dem Trocknen wurde das Gelsandwich zusammgebaut und im Gießstand befestigt. Um das Auslaufen zu verhindern, wurden die Platten zuvor am unteren Rand mit etwas Agarose-Lösung (1,5% (w/v) in 1 x TAE) abgedichtet. Pro Gel mit den Maßen 20 x 30 x 0,1 cm wurden je nach gewünschtem Gradienten zwei der in Tabelle 16 angegebenen Acrylamid-Lösungen angesetzt. Nach Zugabe von jeweils 60 μl APS zum Starten der Polymerisation wurde der Gra-

dienten-Formen mit den beiden Lösungen befüllt und das Gel gegossen. Zur Herstellung des Sammelgels wurden anschließend 4 ml Acrylamid-Lösung (0% UF, 8% AA) mit 3 µl TEMED und 30 µl APS gemischt, über das Gradientengel geschichtet und vorsichtig der Kamm eingesetzt. Nach mindestens 1 h Aushärtzeit wurde das Gel beladen. Je nach DNA-Konzentration wurden 10 - 35 µl PCR-Produkt (Umweltproben) oder 1 - 5 µl PCR-Produkt (Klone, Reinkulturen) bzw. 6 µl Marker (DGGE high) mit je 7 µl Ladepuffer (siehe Kap. 2.7.2) versetzt und aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 4,5 h bei 200 V wurde das Gel für 1 h mit SYBR-Gold gefärbt und fotografiert (siehe Kap. 2.7.2). Zur Zuordnung einzelner Banden wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Kap. 2.7.3), reamplifiziert, kloniert und sequenziert (s. u.).

Tab. 16: Zusammensetzung der Acrylamid-Lösungen zur Herstellung verschiedener denaturierender Gradienten.

Gewünschte Denaturierung der Lösung [% UF]	0	10	20	30	35	40	50	60	65	70	80
0% UF, 8% AA [ml]	12,0	10,8	9,6	8,4	7,8	7,2	6,0	4,8	4,2	3,6	2,4
100% UF, 8% AA [ml]	0,0	1,2	2,4	3,6	4,2	4,8	6,0	7,2	7,8	8,4	9,6
TEMED [µl]	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

2.7.7 Klonierung

Unter Klonierung versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in einen Vektor (meist ein Plasmid), mit dessen Hilfe die Fremd-DNA anschließend in einen Wirtsorganismus (meist *E. coli*) eingeschleust und beliebig vermehrt werden kann (Sambrook et al., 1989; Brown, 1996). Dadurch lässt sich ein Gemisch verschiedener DNA-Fragmente auftrennen und die entstandene „Genbibliothek“ Klon für Klon analysieren.

Hier wurde das Verfahren zur Auftrennung und Analyse von 16S rRNA- und *amoA*-Genfragmenten verwendet, die zuvor mittels PCR (siehe Kap. 2.7.5) aus TF-Proben amplifiziert wurden. Ferner wurden Genbibliotheken von *narG*-Genfragmenten (für TF, DB und FBR) sowie eine *nosZ*-Genbibliothek (für DB; Nastaran Rezakhani, unveröffentlicht) angelegt. Dazu wurde das pGMT®-T Vector System II von Promega (Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.7.1 Ligation

Bei der Ligation werden die zu klonierenden PCR-Produkte („Inserts“) mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in die Multiple Cloning Site (MCS) des linearisierten Vektors eingefügt. Die 3'-Thymin-Überhänge an der MCS des Vektors steigern dabei die Ligationseffizienz, da viele thermostabile DNA-Polymerasen (u. a. die Taq-Polymerase) matrizenunabhängig ein zusätzliches Adenin an das 3'-Ende des Amplifikates anhängen. Dies verringert darüber hinaus auch die Wahrscheinlichkeit zur Selbstligation des Vektors. Die MCS liegt „downstream“ des Promotors für das *lac*-Operon innerhalb des β -Galactosidase-Gens (*lacZ*). Durch die Aufnahme eines Inserts in den Vektor wird das *lacZ*-Gen unterbrochen und die β -Galactosidase-Aktivität geht verloren. Diese Eigenschaft ist, neben der ebenfalls auf dem Plasmid liegenden Ampicillinresistenz wichtig für die Erkennung insertpositiver Klone. Weiterhin besitzt der Vektor beiderseits der MCS Primerbindungsstellen und Transkriptionspromotoren, die eine einfache Sequenzierung bzw. Expression des Inserts ermöglichen.

Für einen Ligationsansatz wurden die unten aufgeführten Komponenten (Tab. 17) zusammenpipettiert, gemischt und über Nacht im Wasserbad (Ausgangstemperatur 10 °C) bei 4 °C inkubiert. Dadurch kühlt der Ansatz langsam von 10 auf 4 °C ab, wobei die dazwischen liegende, optimale Ligationstemperatur durchschritten wird.

Tab. 17: Zusammensetzung des Ligationsmixes.

Bestandteil	Menge
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 μ l
pGMT®-T (50 ng/ μ l)	1 μ l
PCR-Produkt (Insert)	1 - 3 μ l
T4 DNA-Ligase (3 Weiss-Einheiten/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Die Menge des eingesetzten PCR-Produkts (max. 3 μ l) richtete sich nach dessen Konzentration. Für optimale Ligationsbedingungen sollte das Molverhältnis Insert:Vektor um 1:1 liegen, tolerabel sind Abweichungen von 1:8 bis 8:1. Die optimale Menge ist abhängig von der Länge des Inserts und kann über untenstehende Formel berechnet werden (Gleichung 11).

Gleichung 11: Berechnung des optimalen Insert-Vektor-Verhältnisses.

$$\text{Menge des Inserts [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Größe des Inserts [kb]}}{\text{Größe des Vektors [kb]}} \cdot \text{molares Verhältnis Insert : Vektor}$$

Für ein 1,5 kb langes 16S rRNA-Genfragment wäre die ideale Menge demnach ca. 25 ng, eine erfolgreiche Ligation wäre in einem Bereich von 3 - 200 ng wahrscheinlich.

2.7.7.2 Transformation

Bei der Transformation wird der Vektor (inklusive Insert) in dafür geeignete, kompetente Zellen eingeschleust. Dies geschah mittels Hitzeschocktransformation. Als kompetente Zellen wurde der Stamm *E. coli* JM 109 (High Efficiency > 10⁸ cfu/μl; Promega) verwendet. Dieser Stamm ist unter anderem *hsd*- und *lacZ*-negativ, was zu erhöhter Vektor- und Insertstabilität im Wirt führt sowie das sogenannte „Blue-White-Screening“ (siehe unten) ermöglicht.

Auf Eis wurden vorsichtig 50 μl kompetente Zellen und 2 μl Ligationsansatz zusammenpipettiert und gemischt. Nach 30 min auf Eis (Anheften der Plasmide) wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt (Permeabilisierung der Zellmembran und Aufnahme des Plasmids in die Zelle) und dann sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden zu jedem Ansatz 950 μl SOC-Medium (siehe Kap. 2.6.1.3.4) zugegeben und für 1,5 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Thermomixer inkubiert (Ausbildung der Amp-Resistenz). Anschließend wurden die Transformationsansätze auf vorbereitete LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten (siehe Kap. 2.6.1.3.3) aufgeteilt (100 - 200 μl pro Platte), ein paar sterile Glaskügelchen zugegeben und durch Schütteln ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht (16 - 24 h) bei 37 °C inkubiert, zur deutlichen Ausbildung der Blau/weiß-Färbung (siehe unten) z. T. auch länger. Eine anschließende Lagerung der Platten bei 4 °C ist für maximal 4 Wochen möglich.

2.7.7.3 Klonscreening

Eine Vorauswahl an Klonen zur Weiterbearbeitung wurde mit Hilfe des „Blue-White-Screenings“ getroffen. Dieses Verfahren macht sich zwei mit dem Plasmid in die Wirtszellen eingebrachte Eigenschaften zunutze. Zum einen sind die Platten mit Ampicillin versetzt, weshalb nur Zellen wachsen können, die ein Plasmid und somit auch das darauf liegende Gen für die Amp-

cillin-Resistenz aufgenommen haben. Zum anderen enthalten die Platten das Substratanalogon X-Gal, ein Chromogen, das von aktiver β -Galaktosidase zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgesetzt wird. Bei Klonen, die ein Plasmid mit Insert enthalten, ist das *lacZ*-Gen trotz Induktion des *lac*-Operons durch IPTG nicht mehr funktionell. Die Kolonien bleiben farblos, während sich Klone mit einem leeren Vektor (und somit einem funktionellen *lacZ*-Gen) blau färben. Weiße, insertpositive Zellen wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher gepickt und auf frische LB/Amp-Platten übertragen.

Als weiterer Test, ob die Klone ein Insert enthalten, das in etwa der erwarteten Länge entspricht, wurde etwas Zellmaterial der ausgewählten Kolonie in 25 μ l „Cracking Buffer“ (100 mM NaOH, 10 mM EDTA pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS) suspendiert (z. B. durch Abspülen des Zahnstochers nach dem Übertragen der gepickten Kolonie auf die frische Platte). Diese „Cracking Buffer“-Ansätze wurden auf ein 1%-iges Agarosegel (siehe Kap. 2.7.2) aufgetragen, bevor dieses vorsichtig mit Laufpuffer überschichtet wurde. Zum Vergleich wurde auch mindestens eine blaue Kolonie mitgeführt. Nach Gelelektrophorese und SYBR-Gold-Färbung (siehe Kap. 2.7.2) wurde durch Lauflängenvergleich ermittelt, welche Plasmide Inserts mit etwa der erwarteten Länge enthielten. Da die Plasmid-DNA überwiegend „supercoiled“ vorliegt, ist bei diesem Verfahren ein exakter Längenvergleich mit einem DNA-Standard allerdings nicht möglich.

Zur exakteren Überprüfung wurden die Plasmidinserts alternativ mittels M13-PCR (siehe Kap. 2.7.5) amplifiziert und die Produkte anschließend auf einem Agarosegel durch Vergleich mit einem Längenstandard überprüft.

Um redundante Klone von der weiteren Analyse auszuschließen wurden alle ausgewählten Klone einer RFLP-Analyse (siehe Kap. 2.7.8) unterzogen und nur einige Vertreter von jeder auf diese Weise ermittelten Gruppen sequenziert.

2.7.7.4 Plasmidisolierung

Die Plasmide ausgewählter Klone wurden mit dem Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) oder dem Gen EluteTM Miniprep Kit (Sigma) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Mittels steriler Zahnstocher wurden 5 ml LB-Amp in kurzen Reagenzgläsern (10 ml) mit Kapsenbergkappen mit den Klonen inokuliert und für ca. 16 h über Nacht auf einem Rundschüttler inkubiert. Die Zellen (3 - 5 ml) wurden abzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau) und das Pellet in „Cell Resuspension Solution“ resuspendiert. Dann wur-

den den Angaben des Herstellers folgend die Plasmide isoliert. Zur Überprüfung der Plasmidpräparation und zur Konzentrationsbestimmung wurde mit 3 - 5 µl des Extrakts eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.7.2) durchgeführt. Anschließend wurden sie sequenziert (Kap. 2.7.9).

2.7.8 RFLP-Analyse

Um den Sequenzierungsaufwand zu verringern, wurden Klone und Isolate einer Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (RFLP) unterworfen. Da jede Restriktionsendonuklease doppelsträngige DNA nur an einer spezifischen Erkennungssequenz schneidet (Tab. 18), entstehen in Abhängigkeit von der Basensequenz des verdauten DNA-Doppelstrangs Fragmente verschiedener Länge, die anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Das erhaltene Bandenmuster stellt einen für das jeweilige Klon-Insert oder 16S rRNA-Fragment charakteristischen „Fingerprint“ dar und ermöglicht somit die Erkennung redundanter Klone.

Zunächst wurden die Klon-Inserts bzw., bei den Isolaten, ein ca. 1,5 kb langes Fragment des 16S rRNA-Gens mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer M13uni/rev bzw. 26F/1492R (siehe Kap. 2.7.5) verwendet. Anschließend wurden die PCR-Produkte je nach amplifiziertem Genfragment mit ein oder zwei passenden Restriktionsendonukleasen verdaut (Tab. 18).

Je 10 µl PCR-Produkt wurden mit 0,33 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (= 3U) versetzt und für 1 h bei 37 °C verdaut. Nach der Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C wurden die Verdauung auf 3%-ige Agarosegele aufgetragen, um die entstandenen Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen (siehe Kap. 2.7.2). Anschließend wurden die Bandenmuster verglichen und eine Gruppierung der Klone bzw. Isolate anhand ihrer RFLP-Muster vorgenommen. Um verschiedene Gele miteinander vergleichen zu können, wurde die Laufzeit der Gele standardisiert und immer der gleiche DNA-Standard (PCR Markers, Promega) mitgeführt.

Tab. 18: Zur RFLP-Analyse verwendete Restriktionsendonukleasen.

Genfragment	Restriktionsenzym 1		Restriktionsenzym 2	
	Name	Schnittstelle	Name	Schnittstelle
16S rRNA, Isolate	RsaI	5'...GT [*] AC...3' 3'...CA _↓ TG...5'	HhaI	5'...G CG [*] C...3' 3'...C _↓ GC G...5'
16S rRNA, AOB-Klone	AluI	5'...AG [*] CT...3' 3'...TC _↓ GA...5'	-	-
<i>amoA</i> -Klone	RsaI	s. o.	HhaI	s. o.
<i>narG</i> -Klone	HaeIII	5'...GG [*] CC...3' 3'...CC _↓ GG...5'	-	-
<i>nosZ</i> -Klone	HaeIII	s. o.	-	-

2.7.9 Sequenzierung von Plasmidextrakten und PCR-Produkten

Plasmide wurden wie in Kap. 2.7.7.4 beschrieben extrahiert. PCR-Produkte wurden mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) oder dem PCR Clean up Kit (Sigma) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte überwiegend bei Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Südkorea). Als Sequenzierprimer wurden für Plasmide die Standardprimer M13uni und M13rev, für PCR-Produkte die jeweiligen PCR-Primer (26F und 1492R, *narG*1690F und *narG*2650R bzw. *nosZ*661F und *nosZ*1773R) verwendet.

2.7.10 Sequenzanalyse, Stammbauberechnung und Sondendesign

Alle erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit dem Online-Tool WU-Blast2 (WU-blastn/WU-blastx; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al., 1990 und 1997) auf Ähnlichkeiten mit bereits vorhandenen Datenbankeinträgen in Genbank (Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft.

Alle weiteren Analysen erfolgten mit dem Softwarepaket ARB (<http://www.arb-home.de>; Ludwig et al., 2004). Eigene Nukleotidsequenzen sowie (falls noch nicht vorhanden) die über die BLAST-Suche ermittelten nächst verwandten Sequenzen wurden in eine bereits existierende ARB-Datenbank (16S RNA, *amoA* und *nosZ*) importiert, mit den in dem Programmpaket enthaltenen Möglichkeiten aligned und wo nötig manuell nacheditiert. Bei den funktionellen Genen erfolgte das Alignment weitgehend auf Aminosäureebene, wozu die Basensequenzen in silico in Aminosäuresequenzen übersetzt wurden. Zur Analyse der *narG*-Gensequenzen musste erst eine

ARB-Datenbank aufgebaut werden. Zu diesem Zweck wurden alle über GenBank (s. o.) verfügbaren *narG*-Vollsequenzen in ARB importiert und in silico in Aminosäuresequenzen übersetzt. Diese wurden mit dem ClustalW-Algorithmus grob aligned und manuell nacheditiert. Anschließend wurde das Nukleinsäurealignment basierend auf dem Aminosäurealignment angepasst.

Die Stammbaumberechnung erfolgte mit „Distance-Matrix (Neighbour-Joining)“- , „Maximum-Parsimony“- und „Maximum-Likelihood“-Methoden. Lieferten die drei Methoden unterschiedliche Baumtopologien, so wurde durch das Einführen von Multifurkationen an den entsprechenden Stellen ein Konsensusbaum gezeichnet (Ludwig et al., 1998). Eine Ausnahme stellen die *narG*- und *nosZ*-Bäume dar. Durch die Größe der Bäume und die - je nach Berechnungsverfahren - stark unterschiedliche Topologie war das manuelle Einzeichnen von Multifurkationen nur schwer möglich. Deshalb wurden die Konsensusbäume für *narG* und *nosZ* mit dem „Tree-Puzzle“-Verfahren berechnet.

Zur Berechnung der auf 16S rRNA-Gensequenzen von Ammonium- und Nitritoxidierern basierenden Bäume wurden nur *E. coli*-Positionen 27 - 1225 (zwischen den Primern 616V und NSO1225R) berücksichtigt. Bei den übrigen 16S rRNA-basierten Bäumen richtete sich Lage und Anzahl der berücksichtigten Positionen nach der Länge der Fragmente, die in die Baumberechnung einbezogen wurden. Die *amoA*-Bäume wurden basierend auf einem 491 bp langen Genfragment zwischen den zur Amplifikation verwendeten Primern AmoA-1F u. AmoA-2R berechnet, die *nosZ*-Bäume basierend auf einem ca. 1100 bp langen Fragment zwischen dem Primerpaar nosZ661F/nosZ1773R. Bei *narG* erfolgte die Berechnung zunächst basierend auf den vorhandenen Vollsequenzen. Anschließend wurden die mit dem Primerpaar narG1960F/narG2650R erhaltenen Teilsequenzen mit Hilfe des „Parsimony“-Algorithmus dem auf den Vollsequenzen basierenden Baum hinzugefügt. Bei allen drei funktionellen Genen (*amoA*, *narG* und *nosZ*) erfolgte die Baumberechnung auf Grundlage des Nukleinsäurealignments unter Verwendung eines „Wobble“-Filters, der jeweils die dritte Base eines Triplets von der Berechnung ausklammerte.

Spezifische Sonden für die *Nitrospira marina*-Gruppe und verschiedene Cluster von Ammoniumoxidierer-Klonen wurden mit dem „Probe Design Tool“ in ARB entwickelt (<http://www.arb-home.de>; Ludwig et al., 2004). Sondenspezifität und optimale Hybridisierungsbedingungen wurden mit Clone-FISH (Schramm et al., 2002; s. u.) getestet. Als Negativkontrollen dienten „Mismatch“-Klone (3 „Mismatches“ zur Sondensequenz) und „Mismatch“-Sonden (Sonden mit einem zentralen „Mismatch“ zur Zielsequenz). Alle neu entwickelten Sonden inklu-

sive Spezifität und Hybridisierungsbedingungen wurden bei probeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>; Loy et al., 2003) hinterlegt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Gensequenzen wurden in der öffentlich zugänglichen Datenbank des European Bioinformatics Institute (EBI; <http://www.ebi.ac.uk>) hinterlegt. 16S rRNA-Genfragmente von AOB sind unter den „Accession Numbers“ AM295508 - AM295536 zu finden, 16S rRNA-Genfragmente von NOB unter AM295537 - AM295545. Bakterielle *amoA*-Sequenzen sind unter „Accession Numbers“ AM295546 - AM295575 abgelegt, *amoA*-Sequenzen von *Crenarcheota* unter AM295170 - AM295174. Die 16S rRNA-Sequenzen der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Isolate wurden unter „Accession Numbers“ AM403158 bis AM403241 hinterlegt. Die *narG*-Sequenzen sind unter AM419229 bis AM419349 (Klone), AM419350 bis AM419375 (eigene Isolate) bzw. AM419043 bis AM419048 (DSMZ-Kulturen) zu finden, die *nosZ*-Sequenzen von eigenen Isolaten unter AM422881 bis AM422890. Die *nosZ*-Sequenzen aus dem Klonierungsansatz wurden noch nicht hinterlegt.

2.7.11 In situ-Techniken

2.7.11.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermöglicht die mikroskopische Identifizierung und Lokalisierung ganzer Zellen in situ mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Sonden (Amann et al., 1995). Bei den Sonden handelt es sich um ca. 18 bp (18 - 21 bp) lange Oligonukleotide, die komplementär zu Signatursequenzen auf der 16S rRNA der Zielorganismen sind und an diese binden. Je nach SONDENSPEZIFITÄT können Mikroorganismen auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen fluoreszenzmarkiert und unter dem Mikroskop detektiert werden.

Hier wurde diese Technik zur Charakterisierung der Nitrifikantengemeinschaft in TF-Biofilmen verwendet.

2.7.11.1.1 Objektträger, Reagenzien und Sonden

Objektträger

Teflon-beschichtete Objektträger (6 Aussparungen, Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden zunächst mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocken wurden

sie in ca. 70 °C warme Gelatine-Lösung (0,075% (w/v) Gelatine, 0,01% $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$) getaucht und in vertikaler Position trocknen gelassen.

Reagenzien

Alle unten aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Ansetzen autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden von den häufig verwendeten Lösungen (z. B. zum Ansetzen von Hybridisierungs- und Waschpuffer) jeweils ein Aliquot als „Gebrauchslösung“ in ein steriles 50 ml-Nunc-Röhrchen (Nalgen Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA) abgefüllt.

• Natriumphosphat-Stammlösungen

- 1M NaH_2PO_4 (34,5 g auf 250 ml ddH₂O)
- 1M Na_2HPO_4 (44,5 g auf 250 ml ddH₂O)
- 0,1M Natriumphosphat-Puffer (NaPi), pH 7,4
(22,6 ml 1M NaH_2PO_4 , 77,4 ml 1M Na_2HPO_4 , ad 1000 ml ddH₂O)

• 3 x Phosphate-buffered Saline (3 x PBS)

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
NaCl	22,8 g	390 mM
0,1M NaPi, pH 7,4	300 ml	30 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

• 1 x Phosphate-buffered Saline (1 x PBS)

(130 mM NaCl, 10 mM NaPi, pH 7,4; 3 x PBS 1:3 verdünnt)

• 4% Paraformaldehydlösung (4% PFA)

(2 g PFA in 30 ml ddH₂O durch Erwärmen auf 60 °C und NaOH-Zugabe lösen, Zugabe von 16,6 ml 3 x PBS, pH auf 7,2 einstellen und mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen; bei Lagerung bei 4 °C im Dunkeln bis zu 1 Woche verwendbar)

• 1 x PBS/96% Ethanol 1:1 (PBS/EtOH)

(1 x PBS und 96% Ethanol zu gleichen Teilen gemischt)

- **1M Tris-HCl, pH 8,0**

(121,1 g Tris in 800 ml ddH₂O lösen, Zugabe von 42 ml konzentrierter HCl, nach dem Abkühlen pH-Wert einstellen und mit ddH₂O auf 1 l auffüllen)

- **5 M NaCl**

(292,2 g NaCl in 800 ml ddH₂O lösen, auf 1 l auffüllen)

- **0,5 M EDTA, pH 8,0**

(18,6 g EDTA durch Einstellen des pH-Werts auf 8,0 in 80 ml ddH₂O lösen, auf 100 ml auffüllen)

- **10% Natriumdodecylsulfat (SDS)**

(50 g SDS (Elektrophorese-Qualität) in 450 ml ddH₂O auf 68 °C erhitzen, pH mit konz. HCl auf 7,2 einstellen, mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen; nicht sterilisieren!)

- **Formamid (Bio-Rad)**

(deionisiert!; bei 4 °C im Dunkeln lagern, angebrochene Flaschen schnell aufbrauchen oder besser: in ERGs aliquotieren und bei -20 °C lagern)

- **Steriles ddH₂O**

(sterilfiltriertes und autoklaviertes ddH₂O; in ERGs aliquotiert)

Sonden

Die Sonden wurden von MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) oder Biomers (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) synthetisiert und am 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY3 oder CY5 (FISH) (Glöckner et al., 1996) bzw. mit Meerrettichperoxidase (HRP = horseradish peroxidase) (CARD-FISH) markiert (Pernthaler et al., 2002). Sequenzen, Zielorganismen, Hybridisierungsbedingungen und Referenzen aller verwendeten Sonden sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Eingesetzt wurden die Sonden in einer Konzentration von 50 ng/μl, die durch Verdünnen der Stammlösungen (500 ng/μl) mit sterilem ddH₂O eingestellt wurde.

Tab. 19: Sonden zur *in situ*-Detektion von AOB, NOB und Crenarchaeoten.

Sonde	Sequenz (5'-3')	Target site* (16S rRNA)	Formamid [%]	NaCl [mM]	Spezifität	Referenz
Allgemein						
EUB338-I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338-355	0 - 60	900 - 14	Domäne Bacteria	Amann et al., 1990
EUB338-II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	338-355	0 - 60	900 - 14	Planctomycetes	Daims et al., 1999
EUB338-III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	338-355	0 - 60	900 - 14	Verrucomicrobia	Daims et al., 1999
NON338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	---	0 - 60	900 - 14	Negativkontrolle	Manz et al., 1992
AOB						
NSO1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	1225-1244	35	80	β -proteobakterielle AOB	Mobarry et al., 1996
NSO190	CGA TCC CCT GCT TTT TCT CC	190-208	55	20	β -proteobakterielle AOB	Mobarry et al., 1996
NSM56	TAT TAG CAC ATC TTT CGA T	156-174	5	636	versch. <i>Nitrosomonas</i> spp.	Mobarry et al., 1996
NEU23a + CTE	CCC CTC TGC TGC ACT CTA TTC CAT CCC CCT CTG CCG	653-670 659-676	40	56	<i>Nitrosomonas europaea</i> - Lineage (die meisten Mitglieder)	Wagner et al., 1995
Nse1472 ^a	ACC CCA GTC ATG ACC CCC	1472-1489	50	28	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Juretschko et al., 1998
NmV	TCC TCA GAG ACT ACG CGG	174-191	35	80	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Pommerening-Röser et al., 1996
NmII	TTA AGA CAC GTT CCG ATG TA	120-139	25	159	<i>Nitrosomonas communis/nitrosa</i> -Lineage	Pommerening-Röser et al., 1996
Nmar831 ^d + cNmar831	AAC CTA AAA AGG CCC GAC AAC CTA ATA AGG CCC GAC	831-848 831-848	5	636	<i>Nitrosomonas marina</i> - ähnl. Klone, Cluster 1	diese Arbeit
NSMR76	CCC CCC TCT TCT GGA TAC	132-149	20	225	<i>Nitrosomonas marina</i> - Lineage (spezielle Gruppe)	Burrell et al., 2001
Nmo218	CGG CCG CTC CAA AAAG CAT	218-235	35	80	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> Lineage	Gieseke et al., 2001
NmIV	TCT CAC CTC TCA GCG AGC T	1004-1023	35	80	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> - Lineage	Pommerening-Röser et al., 1996
Nm143-446-1 ^d	AGT GCG GGT CTT TTC TTC	446-463	25	159	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143- ähnl. Klone, Cluster 1	diese Arbeit
Nm143-446-2 ^d	CGT CGT AGC CTT TTC TTC	446-463	20	225	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143- ähnl. Klone, Cluster 2	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 19: Sonden zur *in situ*-Detektion von AOB, NOB und Crenarchaeoten.

Sonde	Sequenz (5'-3')	Target site* (16S rRNA)	Formamid [%]	NaCl [mM]	Spezifität	Referenz
Fortsetzung AOB						
NSV443	CCG TGA CCG TTT CGT TCC G	444-462	30	112	<i>Nitrosospira</i> spp.	Mobarry et al., 1996
pAOB630	CCA CAG TCC TCA ATG CAA	630-647	10	450	potentielle AOB-Klone	diese Arbeit
NOB						
Ntspa712 ^b + c	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC CGC CTT CGC CAC CGG TCT TCC	712-732 712-732	50	28	Phylum <i>Nitrosospira</i>	Daims et al., 2001
Ntspa662 ^c + c	GGA ATT CCG CGC TCC TCT GGA ATT CCG CTC TCC TCT	662-679 662-679	35 35	80 80	Genus <i>Nitrosospira</i>	Daims et al., 2001
Nspmar62 ^d	GCC CCG GAT TCT CGT TCG	62-79	40	56	<i>Nitrosospira marina</i> -ähnl. Klone	this study
NSR826	GTA ACC CGC CGA CAC TTA	826-843	20	225	Freshwater <i>Nitrosospira</i> spp.	Schramm et al., 1998
NSR1156	CCC GTT CTC CTG GGC AGT	1156-1173	30	112	Freshwater <i>Nitrosospira</i> spp.	Schramm et al., 1998
NIT3 + c	CCT GTG CTC CAT GCT CCG CCT GTG CTC CAG GCT CCG	1035-1048	40	56	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner et al., 1996
AOA						
CREN554 ^e	TTA GGC CCA ATA ATC MTC CT	554-573	15	318	<i>Crenarchaeota</i>	Massana et al., 1997

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

^a veröffentlicht als S-*_{Nse}-1472-a-A-18

^b veröffentlicht als S-*_{Ntspa}-0712-a-A-21

^c veröffentlicht als S-G-_{Ntspa}-0662-a-A-18

^d neu entwickelte Sonden, bei probebase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>; Loy et al., 2003) hinterlegt

^e veröffentlicht als S-O-Crenar-0554-a-A-20. Hybridisierungsbedingungen nach Fuchs et al., 2005

2.7.11.1.2 Probenfixierung

Intakte Biofilme wurden für 1 bis mehrere Stunden bei 4 °C in frisch hergestellter Paraformaldehyd-Lösung (4% PFA in 1 x PBS, pH 7,2) fixiert, durch vorsichtigen Transfer in ERGs mit frischer Lösung zweimal in 1 x PBS gewaschen und bis zum Schneiden (s. u.) in PBS/EtOH 1:1 bei -20 °C aufbewahrt (Amann et al., 1990). Neben intakten Biofilmdünnschnitten wurde auch mit Zell-Suspensionen gearbeitet. Dazu wurden 1 - 2 ml Biofilm-Material abzentrifugiert, in 1 ml 4%-igem PFA resuspendiert und für 1 h bei 4 °C fixiert. Wie oben wurden die Proben zweimal in 1 x PBS gewaschen und in PBS/EtOH 1:1 endfixiert. Allerdings wurde hier bei jedem Schritt abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischer Lösung resuspendiert.

2.7.11.1.3 Herstellung und Immobilisierung von Biofilmdünnschnitten

PFA-fixierte Biofilmpollen wurden zusammen mit dem Trägermaterial (Kabelbinder) von der Biofilmseite her in OCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Nachdem die Proben gefroren waren, wurde der Biofilm vorsichtig von der Unterlage abgelöst, auch von der Unterseite her in OCT eingebettet und erneut gefroren. Anschließend wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Microm, Walldorf, Deutschland) 14 bis 30 µm dicke vertikale Schnitte angefertigt. Die Biofilmdünnschnitte wurden auf Gelatine-beschichtete Objektträger (s. o.) aufgebracht und durch Lufttrocknen immobilisiert (Schramm et al., 1996). Um das Einbettmedium zu entfernen, wurden die Objektträger vorsichtig in destilliertes Wasser getaucht. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in einer Ethanolreihe (50, 80 und 96% Ethanol, jeweils 3 Minuten) dehydratisiert und dann bei Raumtemperatur bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.7.11.1.4 Immobilisierung von Probensuspensionen

Pro Feld wurden 3 - 5 µl der Suspension auf Gelatine-beschichtete Objektträger (s. o.) aufgebracht und wie die Biofilmdünnschnitte (s. o.) nach dem Trocknen in einer Ethanolreihe dehydratisiert.

2.7.11.1.5 Hybridisierung

Pro OT-Feld wurden 1 µl Sonde und 9 µl Hybridisierungspuffer (0,9M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,01% (w/v) SDS; 5 - 55% (v/v) Formamid (FA)) aufgetragen. Hybridisiert wurde für 90 min bei 46 °C in 50 ml Nunc-Röhrchen (Nalgen Nunc International Corporation), die mit mit Hybridisierungspuffer getränktem Zellstoff ausgelegt waren (Amann et al., 1990). Anschließend wurde das Sonden-Puffer-Gemisch vorsichtig mit etwas auf 48 °C vortemperiertem Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 - 636 mM NaCl; 0 o. 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,01 (w/v) SDS) abgespült und der Objektträger dann noch für 15 min in einem 50 ml Nunc-Röhrchen mit Waschpuffer im 48 °C-warmen Wasserbad inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger vorsichtig mit ddH₂O abgespült und an der Luft trocknen gelassen.

Stringente Hybridisierungsbedingungen für die jeweilige Sonde (Tab. 19) wurden durch Variieren der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bzw. der Salzkonzentration im Waschpuffer erreicht (Manz et al., 1992). Dabei gilt die Faustregel, dass 1% Formamid einer Temperaturerhöhung um 0,5 °C entspricht. Bei neu entwickelten Sonden kann die errechnete Dissoziationstemperatur (T_d) der Sonde (Gleichung 12) als Anhaltspunkt dienen, die optimalen Hybridisierungsbedingungen müssen jedoch experimentell ermittelt werden.

Gleichung 12: Berechnung der Dissoziationstemperatur von Sonden.

$$T_d = 81,5 + 16,6 \cdot \log[Na^+] + 0,41[\%(G+C)] - 820/n, \text{ wobei}$$

[Na⁺] = die Salzkonzentration [mol/l] im Hybridisierungspuffer,
 %(G+C) = der G+C-Gehalt der Sonde,
 n = die Länge der Sonde.

Wasch- und Hybridisierungspuffer wurden vor jeder Hybridisierung frisch angesetzt. Ihre Zusammensetzung ist Tab. 20 bzw. 21 zu entnehmen. Doppelhybridisierungen mit Sonden verschiedener Stringenz (z. B. Nm143-446-1+2 und NEU23a) wurden als zwei aufeinanderfolgende Hybridisierungen durchgeführt. Begonnen wurde dabei mit der Sonde mit der höheren thermischen Stabilität. Sonden gleicher oder sehr ähnlicher Stringenz wurden gemeinsam hybridisiert. Dann wurden bei zwei Sonden je 1 µl Sonde 1 und Sonde 2, bei 3 Sonden 2 µl Sondenmix aller 3 Sonden, und nur 8 µl Hybridisierungspuffer eingesetzt.

2.7.11.1.6 DAPI-Färbung

Im Anschluss an die Hybridisierung mit Sonden verschiedener Spezifität wurden die Proben noch mit dem an die DNA bindenden Fluorochrom 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) gefärbt. Pro OT-Feld wurden 10 µl DAPI (1 µg/ml in ddH₂O) aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 10 min auf Eis im Dunkeln wurden die Objektträger mit reichlich ddH₂O abgespült und an der Luft getrocknet. Alternativ wurde das zum Mikroskopieren verwendete Einbettmedium (Citiflour oder Citiflour/Vectashield (4:1) (Citiflour Ltd., London, UK bzw. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) vor dem Auftragen mit DAPI versetzt (Endkonzentration von 1 µg/ml).

2.7.11.2 Clone-FISH

Clone-FISH ist eine Methode, die es ermöglicht, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit in vivo transkribierten Plasmid-Inserts von 16S rRNA-Klonen durchzuführen (Schramm et al., 2002). Dies erlaubt beispielsweise den Test von Sonden, die spezifisch für Sequenzen aus einer Klonbibliothek entwickelt wurden und für die keine Reinkulturen zur Validierung der Sonde und zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zur Verfügung stehen.

2.7.11.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Als Wirtszellen wurde der *E. coli*-Stamm JM109(DE3) (Promega) verwendet, der unter anderem ein IPTG-induzierbares Gen besitzt, das für die T7-Polymerase (aus dem Bakteriophagen T7) codiert. Da dieser Stamm nicht in Form kompetenter Zellen verfügbar war, mussten die Zellen erst aus einer Glycerinkultur angezogen und „kompetent gemacht“ werden.

Etwas Glycerinkultur wurde mit einer sterilen Impföse abgenommen und auf einer LB-Platte ausgestrichen. Nachdem Kolonien gewachsen waren, wurde eine davon gepickt und in 5 ml LB (siehe Kap. 2.6.1.3.1) eine Übernachtskultur (ÜNK) angelegt. Mit dieser ÜNK wurden am nächsten Tag 2 x 50 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert (Dauer ca. 5 h). Dann wurden die Kulturen in sterile Zentrifugenbecher überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 4000 rpm (Beckmann LE-70, Beckmann Instruments, München, Deutschland) abgeerntet. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in je

15 ml eiskaltem TFB1 (s. u.) resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Dann wurde erneut für 5 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und die Zellen in je 2 ml eiskaltem TFB2 (s. u.) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen (auf Eis!) in 220µl-Portionen auf ERGs aufgeteilt.

• **Transformationspuffer 1 (TFB1)**

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
RbCl	3,02 g	100 mM
MnCl ₂ x 4H ₂ O	2,47 g	50 mM
Kaliumacetat	0,74 g	30 mM
CaCl ₂	0,28 g	10 mM
87% Glycerin	43,10 ml	15%
ddH ₂ O	ad 250 ml	

pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

• **Transformationspuffer 2 (TFB2)**

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
MOPS	0,52 g	10 mM
RbCl	0,3 g	10 mM
CaCl	2,08g	75 mM
Glycerin	43,10 ml (87% Glycerin)	15%
ddH ₂ O	ad 250 ml	

pH mit Essigsäure auf 8,0 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

2.7.11.2.2 Umklonierung

Mit Klonen (2 Stück pro zu testender Sonde), die das gewünschte Plasmid-Insert in der richtigen Orientierung trugen, wurde eine Plasmidextraktion durchgeführt (siehe 2.7.7.4). Anschließend wurden wie unter 2.7.7 beschrieben je 2 µl des Plasmidextrakts in kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm JM109(DE3)) transformiert, wobei jedoch nur 250 µl SOC zugegeben wurden. Pro Transformationsansatz wurden zur Kontrolle 50 µl auf LB+Amp-Platten ausplattiert. Mit den restlichen 250 µl wurden je 5 ml LB mit Carbenicillin (50 µg/ml) beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.7.11.2.3 Induktion der Transkription

Mit den ÜNKs wurden am nächsten Tag je 11 ml frisches LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml) im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer OD₆₆₀ von ca. 0,4 wachsen gelassen. Dies geschah bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Zur Überprüfung der OD₆₆₀ wurde von jedem Ansatz 1 ml Kultur entnommen und bei 660 nm am Photometer vermessen. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden jedem Ansatz 20 µl IPTG (0,5 M) zugegeben (Endkonzentration im Ansatz 100 mM) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden je 50 µl Chloramphenicol (34 mg/ml; Endkonzentration im Ansatz 170 mg/l) zugegeben und für weitere 2 h inkubiert.

2.7.11.2.4 Fixierung

Anschließend wurden die Kulturen in sterile Zentrifugenbecher umgefüllt und für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert (Beckmann LE-70, Beckmann Instruments, München, Deutschland). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in 4%-igem PFA resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 1 h wurden die Zellen wie unter 2.7.11.1.2 beschrieben gewaschen und endfixiert.

2.7.11.2.5 Hybridisierung

Hybridisierungsreaktionen wurden wie unter 2.7.11.1.5 beschrieben auf Gelatine-beschichteten Objektträgern (Teflon-beschichtet, 6 oder 8 Aussparungen, Paul Marienfeld) durchgeführt. Pro Feld wurden dazu 3 bis 5 µl Zellsuspension aufgetragen und nach dem Trocknen in einer Ethanolreihe (siehe 2.7.11.1.3) dehydratisiert.

2.7.11.3 CARD-FISH

Zur in situ-Detektion der ammoniumoxidierenden Crenarchaeoten war die Anwendung von CARD(Catalysed Reporter Depositon)-FISH erforderlich. In diesem Verfahren werden Meerrettichperoxidase-markierte Sonden (Horseradish Peroxidase, HRP) eingesetzt, die nach der Hybridisierung die Deposition von fluoreszenzmarkiertem Tyramid durch kovalente Bindung an zelluläre Proteine katalysieren (Pernthaler et al., 2002). Dadurch lässt sich eine im Vergleich zur „Standard“-FISH stark erhöhte Signalintensität erzielen. Zusätzlich zum „normalen“ Hybridisie-

rungsverfahren (s. o.) sind vor der Hybridisierung ein Schritt zur Inaktivierung endogener Peroxidasen sowie eine zusätzliche Zellpermeabilisierung nötig. Nach der Hybridisierung erfolgt der CARD-Schritt, in dem die hybridisierten Zellen fluoreszenzmarkiert werden (s. o.).

2.7.11.3.1 Probenvorbereitung

PFA-fixierte Biofilmsuspension aus dem TF (siehe 2.7.11.1.2) wurde zur Homogenisierung zunächst einer milden Ultraschallbehandlung (2 x 30 s auf Eis) ausgesetzt. Anschließend wurden 20 µl Probe mit 880 µl Natriumpyrophosphat (0,1% (w/v)) versetzt, gevortext und unter Schütteln in einem Thermoblock auf 60 °C vorgeheizt. Ebenfalls im Thermoblock (60 °C) wurde Agarose (1% (w/v) in PBS) aufgeschmolzen. Dann wurden 100 µl der Agarose-Lösung zu der vorgewärmten Probe gegeben. Pro Feld wurden 10 µl des Agarose-Proben-Gemisches auf Teflonbeschichtete Objektträger (6 Aussparungen, Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger wie unter 2.7.11.1.3 beschrieben in einer Ethanol Reihe dehydratisiert.

2.7.11.3.2 Inaktivierung endogener Peroxidasen

Um endogene Peroxidasen zu inaktivieren, wurden die Objektträger mit den fixierten und immobilisierten Proben für 10 min bei Raumtemperatur in 50 ml 0,01M HCl inkubiert und anschließend erst vorsichtig mit 1 x PBS und dann mit ddH₂O abgespült. Danach wurden die OTs sofort weiter bearbeitet oder luftgetrocknet und bei 4 °C gelagert.

2.7.11.3.3 Permeabilisierung

Um Archaeenzellen zu permeabilisieren, eignet sich am besten eine Proteinase K-Behandlung (Teira et al., 2004). Dazu wurden die Vertiefungen der Objektträger mit einer frisch hergestellten Proteinase K-Lösung bedeckt (0,2 µl/ml Proteinase K (20 U/ml, Sigma) in TE-Puffer (0,1M Tris-HCl[pH 8.0], 0,01M EDTA)). Dann wurden die Objektträger für 60 min bei 37 °C horizontal in 50 ml Nunc-Röhrchen (Nalgen Nunc International Corporation) inkubiert, die mit angefeuchtetem Zellstoff ausgelegt waren. Anschließend wurden die Objektträger 3 x mit ddH₂O abgespült und dann erneut für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,01M HCl inkubiert, um etwaige

Proteinase K-Rückstände zu inaktivieren und zu entfernen. Danach wurden die Objektträger noch einmal vorsichtig mit ddH₂O und anschließend mit Ethanol (96%) abgespült. Nach der Permeabilisierung können die Objektträger mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

2.7.11.3.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte im Prinzip wie unter 2.7.11.1.5 für das „Standard“-FISH-Verfahren beschrieben. Allerdings wurden pro OT-Feld 10 µl eines fertigen Gemisches aus Sonde (Endkonzentration 50 ng/µl) und Hybridisierungspuffer aufgetragen. Der Hybridisierungspuffer wurde in einem Volumen von 20 ml angesetzt und enthielt die in Tab. 22 angegebenen Komponenten. Zum Befeuchten der Kammer wurden statt Hybridisierungspuffer 2 ml eines FA-Wasser-Gemisches mit entsprechender FA-Konzentration verwendet. Der Waschpuffer unterschied sich nicht von dem des Standard-FISH-Protokolls (Kap. 2.7.11.1.5, Tab. 21).

Tab. 22: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für CARD-FISH bei verschiedenen Formamidkonzentrationen.

FA [%]	0	5	10	15	20	25	30	35
Dextransulfat [g]	2	2	2	2	2	2	2	2
Lösung	[ml]							
5M NaCl	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
1M Tris-HCl, pH 8,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
FA	0	1	2	3	4	5	6	7
ddH ₂ O	14	13	12	11	10	9	8	7
Blocking-Reagenz* (10%)	2	2	2	2	2	2	2	2
20% SDS	20	20	20	20	20	20	2	2

FA [%]	40	45	45	50	55	60	65	70
Dextransulfat [g]	2	2	2	2	2	2	2	2
Lösung	[ml]							
5M NaCl	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
1M Tris-HCl, pH 8,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
FA	8	9	9	10	11	12	13	14
ddH ₂ O	6	5	5	4	3	2	1	0
Blocking-Reagenz* (10%)	2	2	2	2	2	2	2	2
20% SDS	2	2	2	2	2	2	2	2

* Blocking Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)

2.7.11.3.5 CARD-Schritt

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger aus dem Waschpuffer genommen und für 15 min bei Raumtemperatur in 1 x PBS inkubiert, um die an die Sonde gebundene HRP zu equilibrieren. Dann wurden pro OT-Feld 10 µl Amplifikations-Mix bestehend aus 1000 µl Amplifikationspuffer (10% (w/v) Dextransulfat, 2 M NaCl, 0,1% (w/v) Blocking Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)), 10 µl H₂O₂-Stammlösung (1000 µl 1x PBS + 5 µl 30% H₂O₂) und 1 µl Fluorescein-markiertem Tyramid aufgetragen. Dann wurden die Objektträger in horizontaler Position in 50 ml-Nunc-Röhrchen (inklusive angefeuchtetem Zellstoff) eingebracht und für 15 min bei 46 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Objektträger zuerst vorsichtig mit ddH₂O und dann mit Ethanol (96%) gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger entweder sofort mikroskopisch ausgewertet oder bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert, was über einen Zeitraum von einigen Tagen möglich ist.

2.7.11.4 MAR-FISH

Die Kombination von Mikroautoradiographie (MAR) mit FISH erlaubt es, Informationen über die Aktivität spezifischer Populationen zu gewinnen (Nielsen et al., 1999; Lee et al., 1999; Ouverny & Fuhrman, 1999). Dabei ist eine Auflösung bis hinunter zur Ebene der Einzelzelle möglich.

Zunächst wird unter geeigneten Bedingungen mit einem radioaktiv markierten Substrat inkubiert. Unter den gewählten Bedingungen aktive Zellen nehmen das Substrat auf und werden dadurch radioaktiv markiert. Anschließend werden durch FISH die Populationen, die von Interesse sind, fluoreszenzmarkiert. Das radioaktive Signal wird durch Überschichtung mit einer Fotoemulsion, anschließende Exposition (Schwärzung der Silberkörnchen in der Emulsion) und Entwicklung sichtbar gemacht. Im Anschluss können beide Signale simultan mikroskopisch ausgewertet werden.

2.7.11.4.1 Inkubation und Fixierung

Biofilmproben (Frischgewicht 11 - 25 mg) wurden in 5 ml Seewasser-Medium (20 psu, pH 8,0, 27 °C) mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen (Endkonzentration 0, 50 und 2000 µM) inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine pasteurisierte (10 min bei 80 °C)

Biofilmprobe. Alle Inkubationen erhielten 1,5 MBq $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, was zu einer endgültigen molaren Aktivität von 220 kBq ($\mu\text{mol CO}_3^{2-}$)⁻¹ führte. Um für Durchmischung und Belüftung zu sorgen, wurden Kanülen mit umgebogener Spitze mit einer Belüftungspumpe verbunden und ein schwacher Luftstrom auf die Oberfläche des Mediums gerichtet. Die Proben wurden für 8,25 h inkubiert und anschließend wie oben beschrieben in 4 % PFA fixiert, gewaschen und in PBS/EtOH 1:1 endfixiert (siehe Kap. 2.7.11.1.3).

2.7.11.4.2 Herstellung von Biofilmdünnschnitten

Wie unter 2.7.11.1.3 beschrieben, wurden von den radioaktiv markierten Biofilmen mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Microm, Walldorf, Deutschland) Dünnschnitte angefertigt. Die Schnittdicke betrug jedoch nur 10 μm und die Schnitte wurden an Stelle von Objektträgern auf Gelatinebeschichtete Deckgläser aufgebracht (Lee et al., 1999). Um etwaige Spuren von innerhalb des Biofilms ausgefallenem [¹⁴C]-Bicarbonat zu entfernen, wurde nach dem Entfernen des Einbettmediums (siehe Kap. 2.7.11.1.3) ein zusätzlicher Waschschriff mit Glycin-Pufferlösung (0,1M, pH 3) durchgeführt. Anschließend wurde mit ddH₂O nachgespült. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in einer Ethanolserie (50, 80 und 96% Ethanol, jeweils 3 min) dehydratisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.7.11.4.3 FISH

Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden (Tab. 19) wurden wie oben beschrieben (siehe 2.7.11.1.5) direkt auf den Deckgläsern durchgeführt. Um zu verhindern, dass die Deckgläser dabei brechen, wurden sie für Hybridisierungs- und Waschschriff auf Objektträgern befestigt.

2.7.11.4.5 Beschichtung mit Fotoemulsion („Coating“)

Die Beschichtung der Deckgläser mit Fotoemulsion erfolgte nach Andreasen et al. (1997). In der Dunkelkammer wurde eine Flasche mit Fotoemulsion (EM-1 Hypercoat emulsion RPN41, Amersham Biosciences) für 15 min in ein 43 °C warmes Wasserbad gestellt, um die Emulsion zu schmelzen. Dann wurden 9 ml der Emulsion in ein 50 ml Nunc-Röhrchen (Nalgen Nunc International Corporation) pipettiert und 1 ml ddH₂O zugegeben. Die verdünnte Emulsion wurde für

10 min zurück ins Wasserbad gestellt und durch vorsichtiges Schütteln alle 3 min gemischt. Dann wurde das Gemisch vorsichtig (Luftblasen vermeiden!) in eine Hybridisierungs-Kammer gefüllt. Nacheinander wurden nun die Deckgläser für je 5 s vorsichtig in die Emulsion getaucht, langsam wieder herausgezogen und abtropfen gelassen. Dann wurde die Rückseite mit einem Papiertuch (Kleenex) von Emulsion befreit und die beschichteten Deckgläser mit einem Papiertuch als Unterlage in vertikaler Position aufgestellt. Nachdem alle Deckgläser beschichtet waren, wurden sie für 10 min auf eine kalte Metallplatte gelegt und anschließend in einem Behälter für Objektträger für 2 h im Dunkeln inkubiert. Dann wurde wasserfreies Silikagel zugegeben, die Box mit Alufolie umwickelt und zur Exposition in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Für die Inkubationen mit 2000, 50 bzw. 0 µM Ammonium betrug die Expositionszeit 2 - 3, 8 - 9 bzw. 9 - 10 Wochen.

2.7.11.4.6 Entwicklung

Auch die Entwicklung erfolgte nach Andreasen et al. (1997). Die Deckgläser wurden für 3 min in den Entwickler gestellt (Kodak D19, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA; 40 g/l) und nach dem Abtropfen in das Stopperbad überführt (ddH₂O, Verweildauer 60 s). Dann wurde für 4 min fixiert (Kodak GBX fixer, Eastman Kodak). Um den Fixierer zu entfernen, wurden die Deckgläser anschließend mit ddH₂O gewaschen (5 - 6 x Wassertausch). Alle Schritte wurden mit Hilfe einer „Dipping Chamber“ durchgeführt, in die die Deckgläser gestellt wurden. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläser mikroskopisch ausgewertet.

2.7.11.5 Quantifizierung der wichtigsten AOB- und NOB-Populationen

Die Anteile der wichtigsten AOB- und NOB-Populationen (*Nitrosomonas* sp. Nm143- und *Nitrosomonas marina*-verwandte Spezies bzw. *Nitrospira marina*-ähnliche Spezies) am Gesamtbiovolumen wurden mit dem daime-Softwarepaket (Version 1.1, Daims et al., 2006) bestimmt. Dazu wurden für jede Sondenkombination (spezifische Sonde + allgemeine *Bacteria*-Sonden EUBI-III) eine Reihe zufällig ausgewählter optischer Schnitte aufgenommen (86, 120 bzw. 40 Bildsätze für *Nitrosomonas* sp. Nm143, *Nitrosomonas marina* bzw. *Nitrospira marina*) und in daime importiert. Die Dicke der optischen Schnitte betrug 1 µm, was die feste Einstellung des Mikroskops (s. u.) in Kombination mit dem 63x Objektiv darstellt. Vor der Bildfragmentierung und der Bestimmung des Biovolumens wurden für jede Bildserie die Schwellenwerte manuell

festgesetzt. Die endgültigen Anteile einer Population (spezifische Sonde) am Gesamtbiovolumen (EUBI-III) wurden durch Korrektur mit der NON-Sonde erhalten.

Die Dünnschnitte stammten von 5 verschiedenen Biofilmen. Pro Sondenkombination wurde von jedem der 5 Biofilme ein Objektträger mit 6 Dünnschnitten hybridisiert (5 x spezifische Sonde + EUBI-III, 1 x NON + EUBI-III). Wo möglich, wurden die Schnitte in 3 Schichten (oben, Mitte und unten) von jeweils ca. 100 µm unterteilt und das Biovolumen zuerst getrennt ermittelt (*Nitrosomonas* sp. Nm143 und *Nitrosomonas marina*). Da jedoch keine großen Unterschiede in der räumlichen Verteilung innerhalb der Biofilms beobachtet wurden, wurden die Bilder anschließend gepoolt und ein durchschnittlicher Anteil über die ganze Biofilmdicke berechnet.

Um zellspezifische Nitrifikationsraten berechnen zu können, war es nötig, für die in situ relevanten AOB (*Nitrosomonas* sp. Nm143- und *Nitrosomonas marina*-ähnlichen Spezies) Zellzahlen zu bestimmen. Dazu wurden mit daime (s. o.) die Fläche der spezifisch gefärbten Zellen sowie die ganze Biofilmfläche gemessen. Wie bei der Berechnung der in situ-Kinetik wurden dazu nur die Bildsätze von der Biofilmoberfläche (obere 100 µm) verwendet. Die durchschnittliche Fläche einer Einzelzelle wurde durch das Auszählen von Zellen innerhalb einer definierten Fläche ermittelt. Für jede der beiden Gruppen wurden ungefähr 1800 Zellen ausgezählt. Unter der Annahme, dass eine Zellschicht eine durchschnittliche Dicke von 1,3 µm hatte, konnte aus den gewonnenen Informationen anschließend die Zahl der Zellen pro Biofilmvolumen berechnet werden.

2.7.11.6 Mikroskopie und Bildanalyse

Hybridisierte Proben wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert, das mit einem UV-Laser (351 und 364 nm), einem Ar-Ionen-Laser (450 bis 514 nm) und zwei HeNe-Lasern (543 und 633 nm) ausgestattet war. Die Aufnahme und Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit der zu dem Gerät gehörigen Standard-Software (LSM Image Browser, Version 4.0).

Um die Ergebnisse des MAR-FISH-Experiments darzustellen, wurden Bildstapel aufgenommen, die von der Ebene mit dem meisten FISH-Signal bis zu der Ebene reichten, wo das MAR-Signal endete. Dann wurden daraus für FISH- und MAR-Signal getrennt „Overlays“ erzeugt. Für das FISH-Signal erfolgte dies mit dem LSM image browser (s. o.). Für Bilder mit dem MAR-Signal wurde das „Extended Focus-Tool“ der daime-Software (s. o.) verwendet, um unscharfe

Bereiche aus jedem Bild zu entfernen und ein Gesamtbild zu erzeugen, das die aus allen Bildern des Stapels extrahierten scharfen Regionen enthielt.

Die Bilder für die Quantifizierung sowie die CARD-FISH-Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome (Carl Zeiss) unter Verwendung einer AxioCam MRm und der Software Axio Vision (Version 4.4) aufgenommen.

2.8 Extrapolationsmethoden und statistische Verfahren

2.8.1 Auswertung der Genbibliotheken

2.8.1.1 Extrapolationsmethoden

Die Anzahl der in einer Genbibliothek zu erwartenden unterschiedlichen Sequenzen, „Spezies“ oder OTUs (= Operational Taxonomic Units, z. B. RFLP-Muster (siehe Kap. 2.7.8)) wurde mit verschiedenen statistischen Methoden abgeschätzt.

Die „Coverage“ (Gleichung 13; Good, 1958) bezeichnet den Anteil der in einer Genbibliothek detektierten OTUs an der erwarteten Anzahl von OTUs.

Die hypothetische Anzahl an OTUs in jeder Genbibliothek wurde mit dem nicht-parametrischen Schätzwert „Chao 1“ (Chao, 1984; Chao et al., 1993) abgeschätzt (Gleichung 14). Dazu wurde das Freeware-Programm EstimateS (Colwell, 2005; <http://purl.oclc.org/estimates>) verwendet. Darüber hinaus wurde die Anzahl der zu erwartenden OTUs in einer Genbibliothek auch mit einem deterministischen Modell (Hill et al., 2003) abgeschätzt. Dazu wurde eine Hyperbel an die „Collector’s Curve“ angepasst (Gleichung 15). Die Asymptote (Fit-Parameter A in der Gleichung), die das deterministische Modell liefert, stellt ebenfalls einen Schätzwert für die Gesamtzahl der zu erwartenden OTUs in einer Genbibliothek dar.

Bei der *nosZ*-Genbibliothek wurden Coverage und Schätzparameter auf verschiedenen Signifikanzniveaus mit dem Programm DOTUR ermittelt (Schloss & Handelsman, 2005; <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>).

Unter dem Begriff einer OTU wurden in dieser Arbeit Sequenzen zusammengefasst, die entweder das gleiche RFLP-Muster aufwiesen und/oder die eine Ähnlichkeit von $\geq 97\%$ für 16S rRNA-Sequenzen (Stackebrand & Goebel, 1994) bzw. $\geq 80\%$ für *amoA*-Sequenzen (Koops et al., 2003) hatten.

Gleichung 13: Coverage (Good, 1958).

$$C = \left(1 - \left(\frac{N_{OTUs, unique}}{N_{Clones, total}} \right) \right) \cdot 100$$

C = Coverage, in Prozent,

$N_{Clones, unique}$ = Anzahl der OTUs/Genotypen, die nur 1x aufgetreten sind,

$N_{Clones, total}$ = Anzahl der insgesamt untersuchten insertpositiven Klone einer Genbibliothek.

Gleichung 14: Bias-corrected Chao1 (aus Colwell, 2005).

$$S_{Chao1} = N_{OTUs} + \frac{N_{OTUs, 1x} \cdot (N_{OTUs, 1x} - 1)}{2 \cdot (N_{OTUs, 2x} + 1)}$$

S_{Chao1} = Schätzwert für den Artenreichtum,

N_{OTUs} = Anzahl der in der Genbibliothek aufgetretenen OTUs,

$N_{OTUs, 1x}$ = Anzahl der OTUs, die nur 1x aufgetreten sind,

$N_{OTUs, 2x}$ = Anzahl der OTUs, die nur 2x aufgetreten sind.

Gleichung 15: Deterministisches Modell (Hill et al., 2003).

$$N_{OTUs} = A \cdot \frac{N_{Clones}}{B + N_{Clones}}$$

N_{OTUs} = Anzahl der in der Genbibliothek aufgetretenen OTUs,

N_{Clones} = Anzahl der untersuchten insertpositiven Klonen,

A, B = Fit-Parameter.

2.8.1.2 Rarefaction-Methoden

Rarefaction-Methoden sind in der Ökologie ein gängiges Verfahren zur Berechnung von Artenzahl-Erwartungswerten bei unterschiedlichem Erfassungsaufwand (Achtziger et al., 1992). Sie ermöglichen zum einen abzuschätzen, ob der Erfassungsaufwand im Hinblick auf die Gesamtartenzahl groß genug ist, zum anderen erlauben sie einen Vergleich der Diversitäten von Proben unterschiedlicher Größe. Über die Hurlbert-Formel (Hurlbert, 1971) lässt sich ausgehend von einer Arten-Abundanzverteilung berechnen, wie viele Arten bei einer kleineren Individuenzahl zu erwarten wären (Gleichung 16). Ausgehend von zwei Stichproben kann die größere rechnerisch so weit „verdünnt“ werden, dass ein angenäherter Vergleich der erwarteten Artenzahlen möglich wird (Achtziger et al., 1992).

Gleichung 16: Hurlbert-Formel (aus Krebs, 1989).

$$E(\hat{S}_n) = \sum_{i=1}^S \left\{ 1 - \left[\frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \right\}, \text{ mit}$$

$E(\hat{S}_n)$ = erwartete Artenzahl in einer Probe mit n Individuen

S = Gesamtartenzahl,

N_i = Individuenzahl der Art i ,

N = Gesamtindividuenzahl,

n = für die Standardisierung der Probengröße gewählte Individuenzahl ($n \leq N$).

Hier wurde diese Methode zum Vergleich der *narG*-Genbibliotheken verwendet, die von Proben aus TF, DB und FBR angelegt wurden. An Stelle des Artbegriffs tritt der Begriff der OTU, die in diesem Fall über das RFLP-Muster der *narG*-Genfragmente festgelegt wurde. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Freeware-Tools „aRarefact“ (Holland, 2003; <http://www.uga.edu/~strata/software/>).

2.8.1.3 Quantitativer Genbibliotheks-Vergleich

Der quantitative Vergleich der *narG*-Genbibliotheken, deren repräsentierte Diversitäten zu einem hohen Anteil ausgewertet waren ($C > 80\%$), wurden mit Hilfe der Software J-Libshuff (Schloss et al., 2004; <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-libshuff.html>) vorgenommen, die eine erweiterte Version des Programms Libshuff (Singleton et al., 2001) darstellt.

Mit Libshuff ist es möglich, Sequenzen aus zwei verschiedenen Genbibliotheken auf beliebigen Ähnlichkeitsniveaus zu vergleichen. Eine mehr oder weniger willkürlich festgelegte OTU-Definition, die auf einer bestimmten Sequenzähnlichkeit beruht, ist daher zu Beginn der Analyse nicht von Bedeutung. Das Programm berechnet die Coverage C in Abhängigkeit vom evolutiven Abstand D (entspricht den „Ähnlichkeitsniveaus“) für die Sequenzen einer Genbibliothek (C_x oder C_y „homologe“ Coverage) im Vergleich zur Gesamtheit der Sequenzen (C_{xy} oder C_{yx} „heterologe“ Coverage). Ein Vergleich der homologen und der heterologen Coverage-Kurven mit Hilfe der (kumulierten) quadratischen Differenz zwischen den beiden Kurven ΔC ($(C_x - C_{xy})^2$ oder $(C_y - C_{yx})^2$) zeigt, ob die untersuchten Genbibliotheken in Abhängigkeit von dem angegebenen p -Wert und dem angestrebten Signifikanzniveau als unterschiedlich zu bewerten sind.

Die von Libshuff errechneten p -Werte beziehen sich auf die einzelnen Vergleiche von z. B. Bibliothek x mit den vereinten Bibliotheken xy . Deshalb muss für multiple Vergleiche noch die

„experimentweise Fehlerrate“ berücksichtigt werden. Dies erfolgt mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur (Gleichung 17).

Gleichung 17: Bonferroni Korrektur zur Bestimmung der experimentweisen Fehlerrate.

$$p_{\text{korr.}} = 1 - (1 - a)^{k(k-1)}, \text{ wobei}$$

$p_{\text{korr.}}$ = um experimentweisen Fehler korrigierter p-Wert ,

a = p-Wert aus Libshuff,

k = Zahl der verglichenen Bibliotheken.

D wurde in Form einer „Similarity Matrix“ basierend auf den Aminosäuresequenzen mit dem Neighbour-Joining Algorithmus und der Kimura-Korrektur mit dem Software-Programm ARB berechnet (siehe Kap. 2.7.10) und in Form einer „Lower Triangular Matrix“ in J-Libshuff importiert.

2.8.2 Weitere statistische Verfahren

2.8.2.1 Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler

Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s_x) und Standardfehler ($s_{\bar{x}}$) (Köhler et al., 1996; Sachs, 2004) wurden nach untenstehenden Formeln berechnet, bei denen n die Anzahl aller Messwerte darstellt und der Laufindex i von 1 bis n läuft. Meist wurde dazu das Programm „Excel“ verwendet.

Gleichung 18: Mittelwert.

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

Gleichung 19: Standardabweichung.

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

Gleichung 20: Standardfehler.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

2.8.2.2 Regression

Zur Berechnung von Eichgeraden sowie der zugehörigen Korrelationskoeffizienten (r^2) wurde das Programm „Excel 2000“ verwendet.

2.9 Verwendete Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht im Text genannt, von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Boehringer (Mannheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), BioRad (Richmond, CA, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Die Gase wurden von Linde AG (Höllriegelskreuth, Deutschland) geliefert. Die Reinheit der verwendeten Gase ist in Tabelle 23 aufgeführt.

Tab. 23: Reinheit der verwendeten Gase.

Gas	Ar	He	N ₂	N ₂ O	Druckluft
Reinheit	4.8	4.6	5.0	4.5	DIN 3188

3 Ergebnisse

3.1 Nitrifikation

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Struktur und Funktion der Nitrifikantengemeinschaft im Tropfkörper der Anlage zu erfassen und anschließend miteinander zu verknüpfen. Die Struktur der AOB- und NOB-Populationen wurde mit molekularbiologischen Methoden (*amoA*-DGGE, Klonierung von 16S rRNA- und *amoA*-Genfragmenten, FISH) untersucht. Ihre Aktivität wurde mit Mikrosensormessungen bestimmt. Eine Verknüpfung von Struktur und Funktion gelang über die Quantifizierung der AOB-Populationen, was wiederum die Berechnung zellspezifischer Nitrifikationsraten aus den Mikrosensordaten erlaubte. Mit MAR-FISH konnte die beobachtete Aktivität direkt bestimmten Populationen zugeordnet werden.

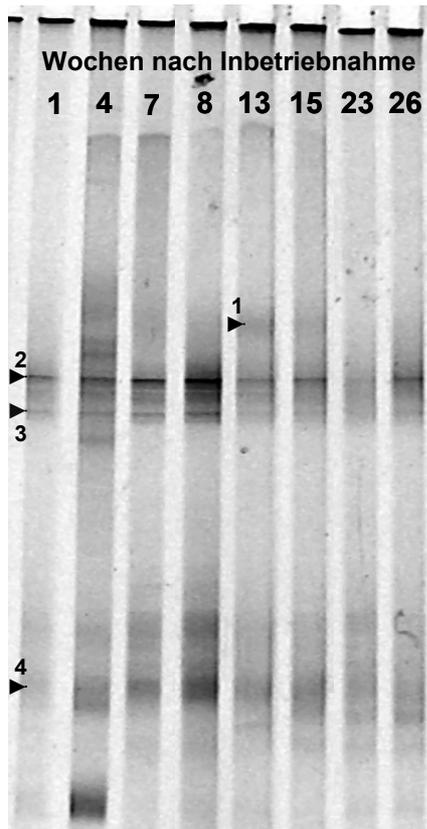
3.1.1 Biofilmstruktur

Die Biofilmdicke reichte von 50 bis 500 μm . Meist waren die Biofilme jedoch nicht dicker als 300 μm . Die durchschnittliche Dicke betrug ca. 150 μm (Schätzung anhand von ca. 100 Dünnschnitten von 5 verschiedenen Biofilmen). Unter den in situ vorherrschenden Ammoniumkonzentrationen ($\sim 20 \mu\text{M}$) war über die ganze Tiefe Sauerstoff vorhanden. Der ganze Biofilm trug zur Nitrifikation bei, ohne dass eine Zonierung erkennbar gewesen wäre (siehe Kap. 3.1.3.1.1, Abb. 22).

3.1.2 Zusammensetzung der Nitrifikantengemeinschaft

3.1.2.1 DGGE-Monitoring

Nach Wiederinbetriebnahme des Systems wurde von den israelischen Projektpartnern die Entwicklung der AOB-Gemeinschaft im TF mittels *amoA*-DGGE (siehe Kap. 2.7.6) über die Zeit beobachtet (Koch et al., unveröffentlicht). Schon nach wenigen Wochen hatte sich eine stabile Gemeinschaft etabliert (Abb. 13). Durch Ausschneiden, Klonieren und Sequenzieren einzelner Banden konnten *amoA*-Genfragmente mit großer Ähnlichkeit zu *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosomonas marina* und *Nitospira* sp. identifiziert werden.



Im Laufe der weiteren Analysen (Klonierung und FISH) stellte sich allerdings heraus, dass die dominante AOB-Population (*Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandte Spezies, s. u.) mit dem DGGE-Monitoring überhaupt nicht erfasst wurde. Wie der Klonierungsansatz später zeigte (siehe 3.1.2.2), handelte es sich wahrscheinlich um ein DNA-Extraktionsproblem.

Abb. 13: *amoA*-DGGE-Monitoring der AOB-Gemeinschaft nach Wiedereinbetriebnahme des Systems (Koch et al., unveröffentlicht). Identifizierte Banden: 1: *Nitrosomonas nitrosa*, 2, 3: *Nitrosomonas marina*, 4: *Nitrosospira* sp..

Allerdings ergab der Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden mittels *amoA*-DGGE keine sichtbaren Unterschiede (Abb. 14). Das Problem ist also nicht nur bei der DNA-Extraktion sondern auch bei der Methode selbst zu suchen.

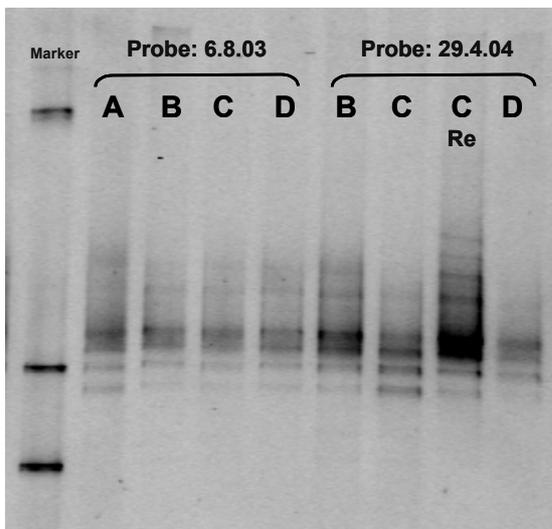


Abb. 14: DGGE-Gel (8% Acrylamid, Gradient: 30 - 50; *amoA*) zum Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden. A: Extraktionsmethode A = ursprüngliches Verfahren (FastDNA® Spin Kit for Soil, leicht modifiziert), B: FastDNA®Kit nach Protokoll des Herstellers, C: Extraktionsmethode B = Kombination aus enzymatischem Verdau und FastDNA®Kit, D: DNA-Extraktion nach Burrell et al., 2001 (Proteinase K-Verdau und Gefrier-Auftau-Zyklen).

3.1.2.2 Klonierungsansatz

3.1.2.2.1 Klonierung von 16S rRNA-Genfragmenten

Insgesamt waren vier Genbibliotheken basierend auf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden und PCR-Protokollen erforderlich, um eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den FISH-Ergebnissen (siehe Kap. 3.1.2.3) zu erzielen.

In einem ersten Klonierungsversuch wurde DNA aus einer TF-Probe mit einer einfachen Bead-Beating-Methode (DNA-Extraktionsmethode A, siehe Kap. 2.7.1.1) extrahiert und mit den allgemeinen Bakterien-Primern GM3 und GM4 (siehe Kap. 2.7.5, Tab. 13) amplifiziert. Von nahezu 300 gescreenten Klonen hatten ungefähr 20% ein Insert mit 97% Sequenzähnlichkeit zu dem Nitritoxidierer *Nitrospira marina*. AOB-Sequenzen wurden dagegen nicht gefunden. Deshalb wurde mittels semispezifischer PCR (Primer-Paar: 616V/NSO1225R; Kap. 2.7.5, Tab. 13) eine AOB-Genbibliothek angelegt. In dieser Genbibliothek gehörten 57 von insgesamt 61 Klonen einer Gruppe an, die später als *Nitrosomonas marina*-verwandte Art, Cluster 1 bezeichnet wurde (Abb.15). Die restlichen 4 Klone trugen Inserts mit β -proteobakteriellen Sequenzen, die nicht zur Gruppe der AOB gehörten (*Azoarcus* sp., *Denitromonas aromatica*).

Da dieser Befund nicht mit den Ergebnissen der FISH-Analyse (siehe Kap. 3.1.2.3) im Einklang stand, wurde als nächstes ein DNA-Extraktionsprotokoll verwendet, das einen enzymatischen Verdau beinhaltet (= Extraktionsmethode B; Juretschko et al. (1998), modifiziert; siehe Kap. 2.7.1.2). PCR-Amplifikation (wieder mit Primerpaar 616V/NSO1225R) und Klonierung von DNA, die mit diesem verbesserten Protokoll gewonnen wurde, erbrachten folgendes Resultat: Von 59 gescreenten Klonen gehörten 34 zu zwei *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten Clustern (*Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnliche Spezies, Cluster 1 und 2). Die zweithäufigste Gruppe (13 Klone) war eine Klongruppe, die als „potentielle AOB“ (pAOB) bezeichnet wurde. Denn sie fiel in ein Cluster von Umweltklonen, das im Stammbaum unmittelbar vor allen bisher bekannten AOB abzweigt (Abb. 16A); die Sequenzähnlichkeit zum nächsten kultivierten Ammoniumoxidierer *Nitrosospira briensis* betrug 90%. Zwei Klon-Inserts gehörten zur *Nitrosomonas marina*-ähnlichen Spezies, Cluster 1. Die verbleibenden 9 Klon-Inserts gehörten nicht zur Gruppe der AOB; sie wurden als 16S rRNA-Genfragmente von *Cytophaga* sp., *Pseudonocardia* sp. und *Azoarcus* sp. identifiziert.

Auch die DNA-Extraktion durch Proteinase K-Verdau und Gefrier-Auftau-Zyklen (nach Burrell et al., 2001) erbrachte Klone mit *Nitrosomonas* sp. Nm143- und pAOB-Inserts, was aber nicht weiter verfolgt wurde.

Eine Teilsequenz der zweiten *Nitrosomonas marina*-ähnlichen Spezies (*Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies, Cluster 2), die erst nur mit FISH detektiert wurde, konnte schließlich mit einer spezifischen PCR (aus einem DNA-Extrakt nach Methode B) gewonnen werden. Dazu wurde das „Reverse Complement“ der Sonde NSMR76 (siehe Kap. 2.7.11.1, Tab. 19) als Vorwärtsprimer und NSO1225 als Rückwärtsprimer verwendet.

Ein Test auf das Vorkommen von γ -AOB der *Nc. oceani/halophilus*-Gruppe mittels spezifischer PCR (siehe Kap. 2.7.5.2.1) fiel negativ aus. Auch Mitglieder des Genus *Nitrobacter* (NOB) wurden mit einer für diese Gruppe spezifischen PCR (Primer: 616V/NIT3R; Kap. 2.7.5, Tab. 13) nicht gefunden.

Einen Stammbaum mit repräsentativen 16S rRNA-Genfragmenten aller detektierten AOB- und NOB-Klongruppen zeigt Abb. 16A.

3.1.2.2.2 Klonierung von *amoA*-Genfragmenten

Um die Ergebnisse der 16S rRNA-basierten Analyse der AOB-Gemeinschaft und den Einfluss der DNA-Extraktionsmethode auf das erhaltene Resultat zu bestätigen, wurden zwei *amoA*-Genbibliotheken angelegt. Zum einen wurde der mit Methode A (nur „Bead-Beating“) erhaltene DNA-Extrakt verwendet, zum anderen derjenige, der mit Methode B (Kombination aus enzymatischem Verdau und „Bead-Beating“) gewonnen wurde. Von jeder Bibliothek wurden jeweils mindestens 100 Klone gescreent. Übereinstimmend mit der Klonierung von 16S rRNA-Genfragmenten enthielt die erste Genbibliothek (Extraktionsmethode A) nur *Nitrosomonas marina*-ähnliche Sequenzen (88% Sequenzähnlichkeit auf Nukleinsäureebene). Die zweite Bibliothek (Extraktionsmethode B) bestand dagegen zu 62% aus Klonen mit *Nitrosomonas marina*-verwandten Inserts, zu 38% aus *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten Sequenzen (97% Ähnlichkeit zu *Nitrosomonas* sp. NS20, einem neuen Isolat dieser Gruppe (Urakawa et al., 2006)).

Darüber hinaus wurden in dem zweiten DNA-Extrakt (Methode B) Crenarchaeen-*amoA*-Sequenzen detektiert, die nahe mit der kürzlich beschriebenen Spezies „*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*“ (Könnecke et al., 2005) verwandt waren (97% Ähnlichkeit auf Nukleinsäureebene).

Dagegen wurde keine tief abzweigende *amoA* gefunden, die auf die Gruppe der potentiellen AOB hingedeutet hätte.

Die phylogenetische Position der beiden verschiedenen *amoA*-Sequenz-Cluster sowie der Crenarchaeen-*amoA*-Sequenzen zeigt Abb. 16B.

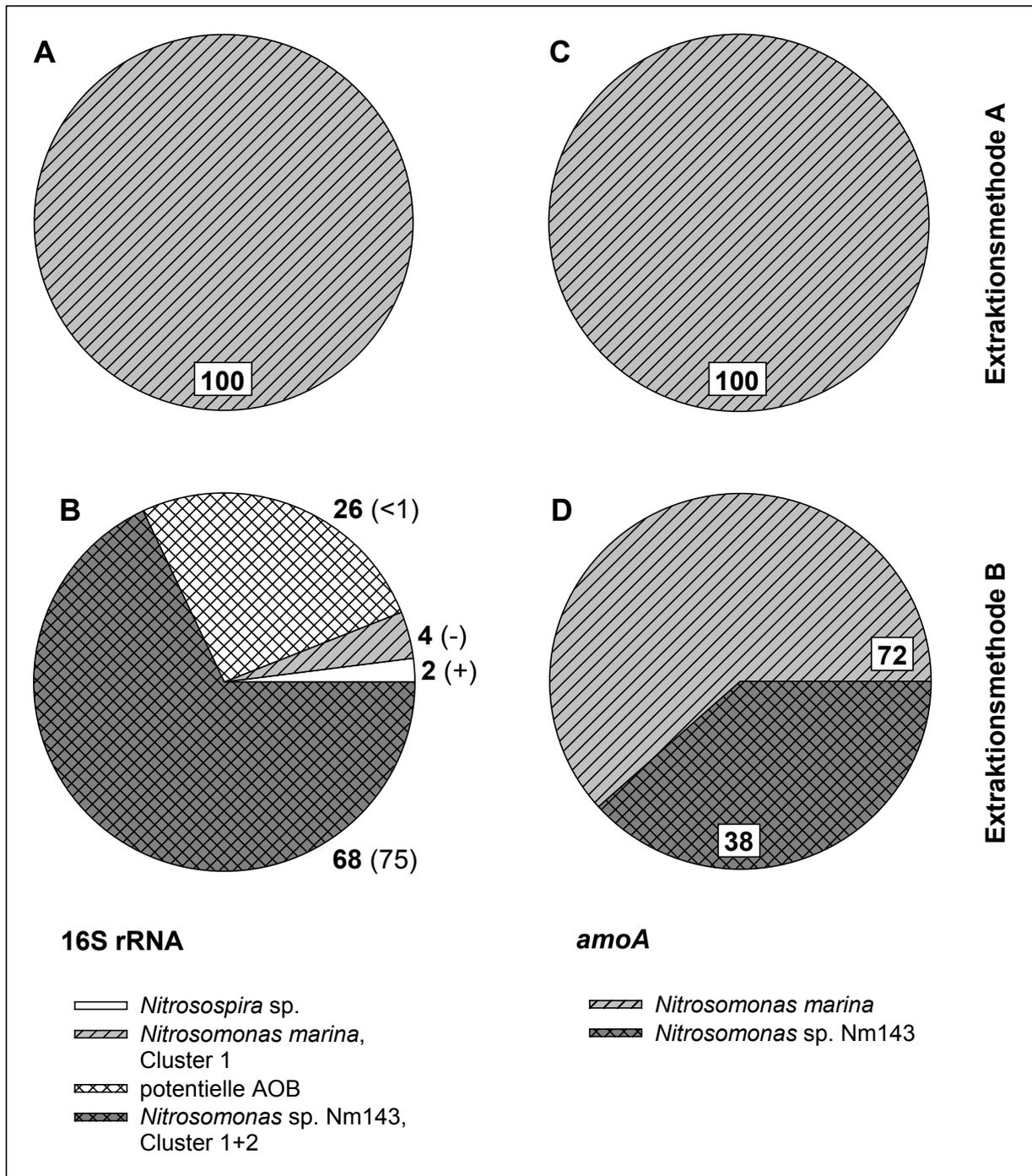


Abb. 15: Vergleich von 16S rRNA- und amoA-Genbibliotheken, die nach DNA-Extraktion mit verschiedenen Methoden angelegt wurden. A: 16S rRNA, DNA-Extraktionsmethode A (nur „Bead-Beating“), B: 16S rRNA, DNA-Extraktionsmethode B (enzymatischer Verdau + „Bead-Beating“), C: amoA, DNA-Extraktionsmethode A, D: amoA, DNA-Extraktionsmethode B. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil von Klonen jeder Gruppe an der Summe aller AOB- und pAOB-Klone an; die Zahlen in Klammern stellen den über FISH detektierten prozentualen Anteil dieser Gruppe dar (+: detektiert, aber nur in sehr geringer Zahl, -: nicht detektiert).

Die zweite in situ relevante AOB-Gruppe, *Nitrosomonas marina*, Cluster 2 (FISH: 25% aller AOB), fehlte in den 16S rRNA-Genbibliotheken; eine 16S rRNA-Gensequenz konnte erst unter Verwendung spezifischer PCR-Primer amplifiziert werden.

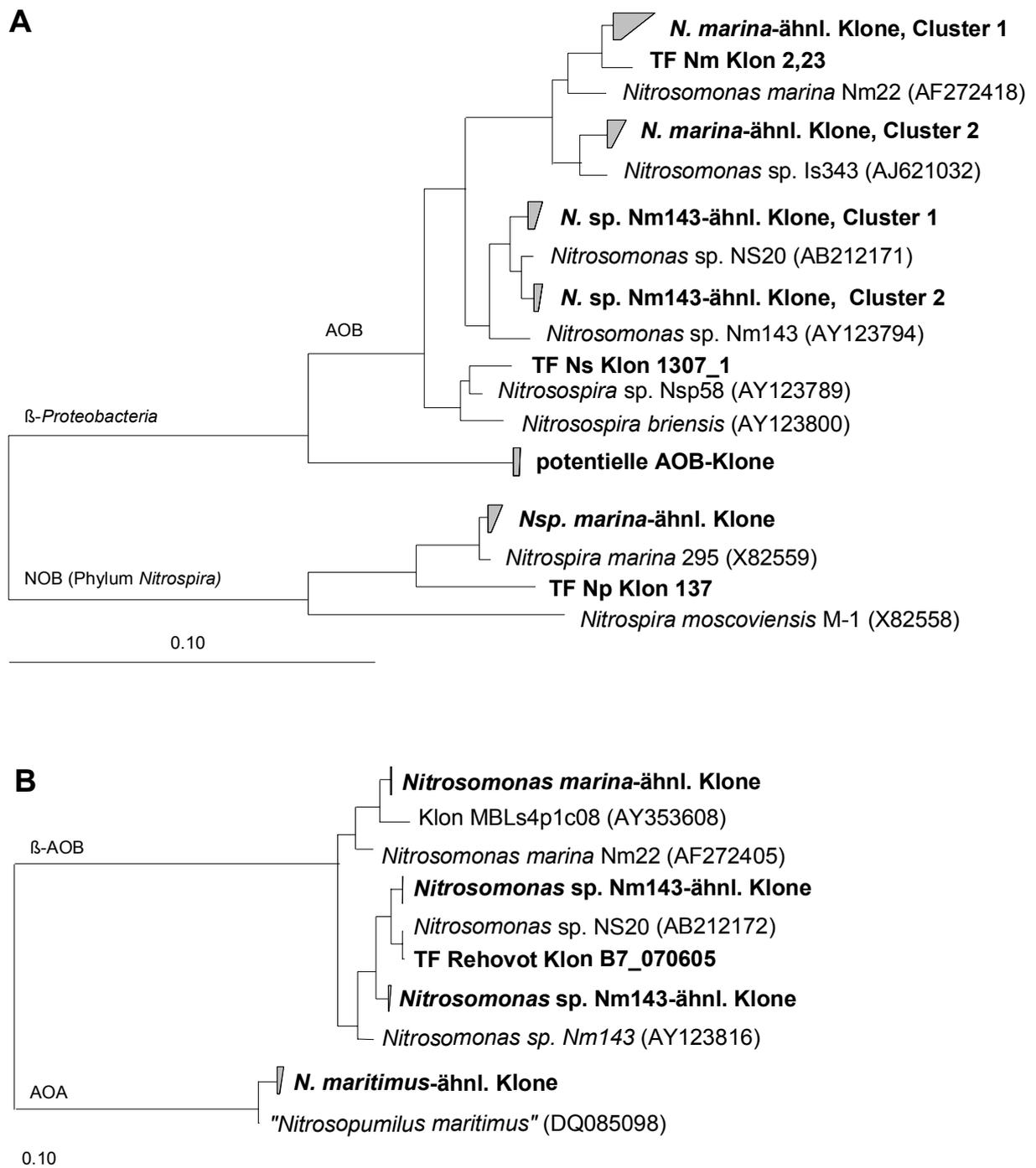


Abb. 16: Stammbäume (Neighbor Joining-Methode) partieller 16S rRNA- und amoA-Gensequenzen. Sequenzen oder Sequenzgruppen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sind fett gedruckt; von jedem Cluster mit sehr ähnlichen Sequenzen wurden für die Darstellung drei repräsentative Sequenzen ausgewählt. A: Stammbaum von AOB und NOB basierend auf 16S rRNA-Teilsequenzen, B: AmoA-Baum (Teilsequenzen) mit den beiden Sequenzgruppen, die über DNA-Extraktionsmethode B erhalten wurden, sowie den zu „Cand. Nitrosopumilus maritimus“ verwandten Crenarchaeen-amoA-Sequenzen. Maßstab: 10% Sequenzunterschied.

3.1.2.2.3 Qualität der Genbibliotheken

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse, die mit DNA-Extraktionsmethoden A und B erzielt wurden, war die Anzahl der gescreenten Klone für die verglichenen Genbibliotheken (2 x AOB-16S rRNA, 2 x *amoA*) mehr als ausreichend. In Abbildung 17 sind die „Collector’s Curves“ einschließlich Datenfit nach dem deterministischen Modell (siehe Kap. 2.8.1.1) für die beiden 16S rRNA-Bibliotheken aufgetragen. Für die *amoA*-Bibliotheken war dies nicht möglich, da die Kurven nur aus 1 bzw. 2 Datenpunkten bestanden.

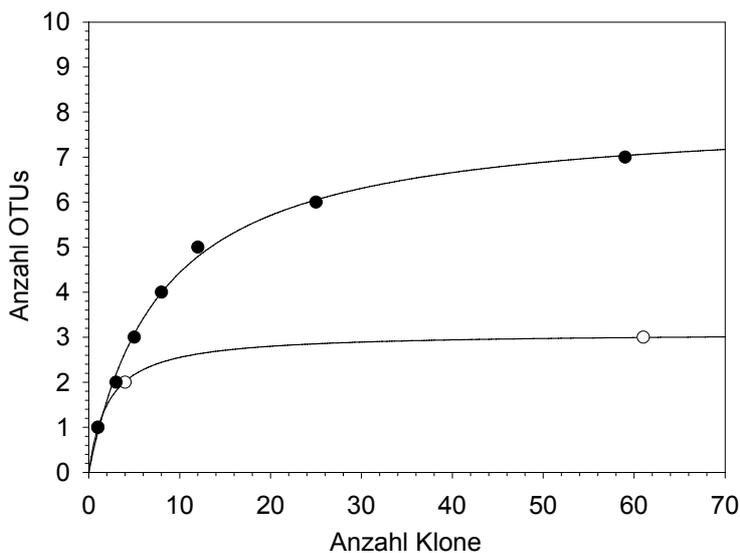


Abb. 17: „Collector’s Curves“ der beiden AOB-16S rRNA-Genbibliotheken (einschließlich der trotz spezifischer PCR mit erfassten nicht-AOB-Sequenzen). Offene Symbole: nach DNA-Extraktion mit Methode A, ausgefüllte Symbole: nach DNA-Extraktion mit Methode B. Eine OTU entspricht hier einem RFLP-Muster.

Die hohen Coverage-Werte sowie die Schätzparameter Chao1 und Fit-Parameter A machen deutlich, dass alle bedeutenden Populationen erfasst wurden (Tab. 24).

Tab. 24: 16S rRNA- und *amoA*-Genbibliotheken nach DNA-Extraktion mit zwei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. 16S rRNA: einschließlich der trotz spezifischer PCR mit erfassten nicht-AOB-Sequenzen. Eine OTU entspricht hier einem RFLP-Muster.

Herkunft	Typ	N _{OTUs} (N _{Klone})	Coverage [%]	Chao1	Fit-Parameter A
Extraktionsmethode A	16S rRNA	3 (61)	98	3	3
Extraktionsmethode B	16S rRNA	7 (59)	98	7	8
Extraktionsmethode A	<i>amoA</i>	1 (101)	100	1	-*
Extraktionsmethode B	<i>amoA</i>	2 (112)	100	2	-*

* Berechnung mit weniger als drei Datenpunkten nicht möglich

3.1.2.3 FISH

3.1.2.3.1 Optimierung des Sonden-Sets

Um Zusammensetzung und Populationsstruktur der Nitrifikantengemeinschaft zu untersuchen, wurde ein Set bereits existierender Sonden (Kap. 2.7.11.1, Tab. 19) verwendet. Darüber hinaus wurden - spezifisch für verschiedene Gruppen, die über den Klonierungs- und Sequenzierungsansatz entdeckt wurden - fünf neue Sonden entwickelt.

Die höchsten Trefferquoten erzielten die Sonden NEU23a und NSMR76 (AOB) sowie Ntspa 662 (NOB). Einige andere AOB- und NOB-spezifische Sonden (Nse1472, NmV, NmII, NmIV und NSV443 bzw. NSR826 und NSR1156) wurden ebenfalls positiv getestet, hybridisierten aber nur mit ein paar gelegentlich auftretenden Zellclustern. Hybridisierungen mit den Sonden Nmo 218 und NIT3 waren negativ.

Das positive Hybridisierungsergebnis mit Sonde NEU23a deutete darauf hin, dass die dominante AOB-Population der *Nitrosomonas europaea/eutropha*-„Lineage“ angehörte. Allerdings konnten trotz mehrerer Klonierungsversuche in den Genbibliotheken keine entsprechenden Sequenzen gefunden werden. Andererseits tauchten dort zwei mit *Nitrosomonas* sp. Nm143 verwandte Sequenzcluster auf, die nicht mit einem positiven FISH-Ergebnis korreliert werden konnten. Beim Vergleich dieser Sequenzen mit der Sondensequenz von NEU23a stellte sich heraus, dass die Sonde nur einen schwachen „Mismatch“ zu den betreffenden Klonsequenzen aufwies, der darüber hinaus nicht von der Competitor-Sonde CTE abgedeckt wurde (Abb. 18). Dies legte den Schluss nahe, dass die mit der Sonde NEU23a detektierte FISH-dominante Population zum *Nitrosomonas* sp. Nm143-Cluster und nicht zur *Nitrosomonas europaea/ eutropha*-„Lineage“ gehörte. Den endgültigen Beweis zu dieser Annahme lieferte eine Doppelhybridisierung mit den klonspezifischen Sonden Nm143-446-1+2 und der Sonde NEU23a, die mit den gleichen Zellclustern hybridisierten (Abb. 19). Diese Zellcluster waren auch ohne die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gut erkennbar, da jede Zelltetrad von einer dicken, stark autofluoreszierenden Hülle umschlossen war (Abb.20), die vermutlich aus extrazellulären polymeren Substanzen (Extracellular Polymeric Substances = EPS) bestand.

NEU23a-Sondensequenz: 3' -ATCTCACGTCGTCTCCCC-5'
 Zielsequenz (*N. europaea*): 5' -TAGAGTGCAGCAGAGGGG-5'
Nitrosomonas sp. Nm143-Klonsequenz: 5' -TAGAGTGTAGCAGAGGGG-5'
 Competitor(CTE) -Sequenz: 3' -GCCGTCTCCCCCTACCTT-5'

Abb. 18: Alignment von Sonde NEU23a + CTE, der Sequenz des Zielorganismus (*Nitrosomonas europaea*) und der Sequenz der *Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnlichen Klon-Inserts. „Mismatch“-Positionen zwischen Sonde und *N. sp. Nm143*-Klonsequenz sind mit Sternchen gekennzeichnet.

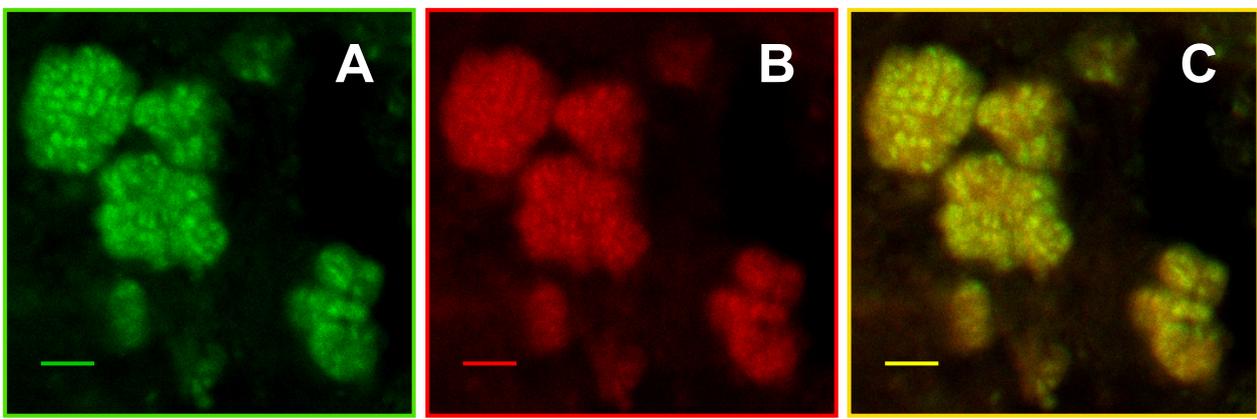


Abb. 19: Doppelhybridisierung von *Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnlichen Zellclustern mit Sonde NEU23a-CY5 und Nm143-446-1+2-CY3. A: NEU23a, B: Nm143-446-1+2 und C: Kombiniertes Bild von A and B. Maßstab: 10 μ m.

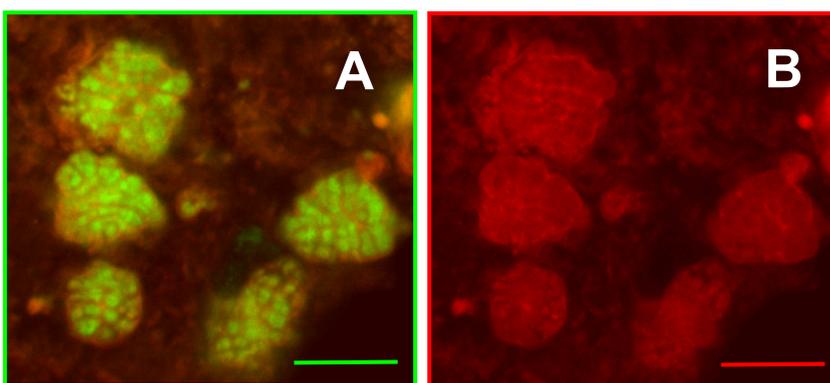


Abb. 20: *Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnliche Zellcluster. A: Spezifisch markierte Zellen (grün) mit autofluoreszierenden Hüllen (rot). B: Nur Autofluoreszenz der EPS-Hüllen. Maßstab: 10 μ m.

Der weitere Vergleich von Klon- und Sondensequenzen ergab, dass Sonde NSMR76 (positiv und in situ relevant) nicht die zunächst gefundenen *Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies, Cluster 1 erfasste. Die Zielsequenz für NSMR76 (*Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies, Cluster 2) konnte daraufhin mittels spezifischer PCR (siehe Kap. 2.7.5.2.1) amplifiziert und kloniert werden. Dagegen lieferte die spezifisch für die *Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies, Cluster 1 entwickelte Sonde Nmar831 im Biofilm keine positiven Hybridisierungsergebnisse. Dies zeigte, dass *Nitrosomonas marina*, Cluster 2 und nicht Cluster 1 die in situ relevante Spezies war.

Die neu entwickelte *Nitrospira marina*-Sonde Nspmar62 hybridisierte mit nahezu 100% der mit der allgemeinen *Nitrospira*-Sonde Ntspa662 erfassten Zellen. Demnach stellten die *Nitrospira marina*-verwandten Spezies die einzigen in situ relevanten Nitritoxidierer dar.

Auch für die potentiellen AOB wurde eine spezifische Sonde entwickelt. Sie hybridisierte mit kleinen Zellclustern (Abb. 21G), die immer wieder in direkter Nachbarschaft zu anderen AOB und NOB auftraten.

3.1.2.3.2 Zusammensetzung der Nitrifikantengemeinschaft

Quantifizierung der AOB-Gemeinschaft mit dem optimierten Sondenset ergab, dass die *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten Spezies, Cluster 1 und 2 mit ungefähr 75% aller AOB die dominante Population darstellten. Die zweite, wichtige Gruppe waren die *Nitrosomonas marina*-ähnlichen Spezies, Cluster 2. Sie machten ca. 25% der AOB-Gemeinschaft aus. Darüber hinaus wurden in situ Mitglieder der „Lineages“ *Nitrosomonas cryotolerans*, *N. communis/nitrosa*, *N. europaea/Nc. mobilis* und *Nitrospira* sp. detektiert (Abb. 21). Allerdings kamen sie nur in sehr geringer Zahl vor und machten zusammengenommen weniger als 1% der AOB-Gemeinschaft aus. Auch *Crenarchaeota* waren nachweisbar. Mit einer Population von ca. 1% aller DAPI-gefärbten Zellen waren sie aber ebenfalls nur von sehr geringer Bedeutung.

Die NOB-Population bestand überwiegend aus *Nitrospira marina*-verwandten Arten (nahezu 100% aller NOB). Gelegentlich wurde auch eine mehr *Nitrospira moskoviensis*-verwandte Gruppe detektiert. *Nitrobacter* spp. wurden dagegen nicht gefunden.

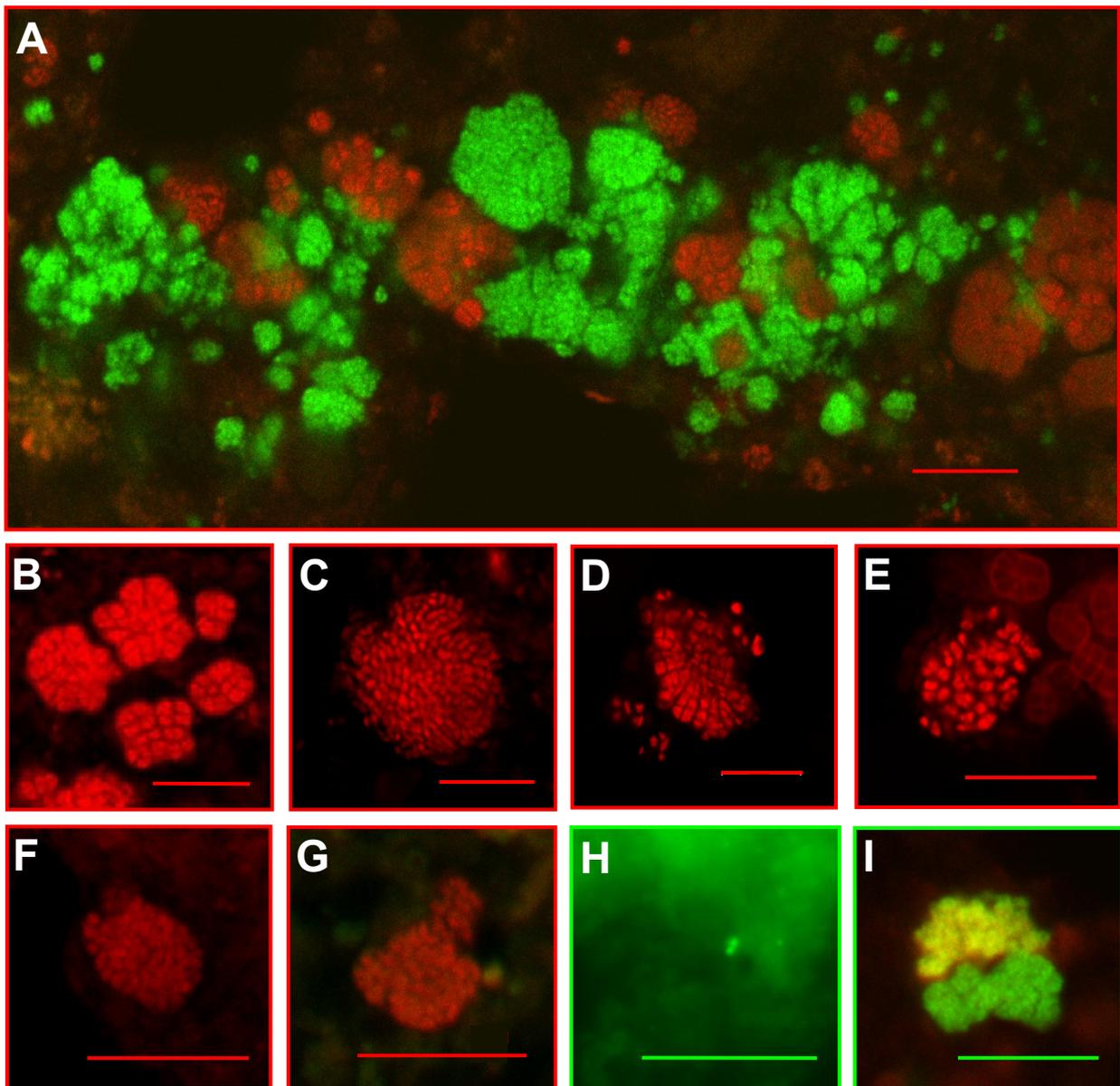


Abb. 21: In situ-Detektion β -proteobakterieller AOB, AOA aus der Gruppe der Crenarchaeota, sowie *Nitrospira*-verwandter NOB mittels FISH. A: Dichte AOB- (rot) und NOB-Cluster (grün), B: *Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnliche Spezies, C: *Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies, D: *Nitrosomonas cryotolerans*, E: Mitglieder der *Nitrosomonas communis/nitrosa*-Gruppe, F: *Nitrospira* sp., G: potentielle AOB, H: Cand. „*Nitrosopumilus maritimus*“-ähnliche Ammoniumoxidierer und I: Kombiniertes Cluster aus *Nitrospira moskoviensis*-verwandten (gelb) und *Nitrospira marina*-verwandten Spezies (grün). Größenmaßstab: 10 μ m.

Nitrosomonas marina hatte einen Volumenanteil (spezifische Gruppe im Vergleich zu allen *Bacteria*; siehe Kap. 2.7.11.5) von 2,2%, *Nitrosomonas* sp. Nm143 einen Anteil von 6,7%, was zusammengenommen einen Anteil von 8,9% für die gesamte AOB-Gemeinschaft ausmacht. Für die NOB-Population, die fast ausschließlich aus *Nitrospira marina* bestand, wurde ein Volumen-

anteil von 15,7% bestimmt. Da keine Unterschiede in der räumlichen Verteilung innerhalb des meist sehr dünnen Biofilms beobachtet wurden (siehe Kap. 2.7.11.5), stellen diese Werte durchschnittliche Anteile über die ganze Biofilmtiefe dar.

Die Zellzahlbestimmung (siehe ebenfalls Kap. 2.7.11.5) ergab für *Nitrosomonas* sp. Nm143 $1,2 \times 10^{10}$ Zellen/cm³ und für *Nitrosomonas marina* $3,6 \times 10^9$ Zellen/cm³. Insgesamt waren also $1,6 \times 10^{10}$ Ammoniumoxidiererezellen pro cm³ vorhanden. Für die Nitritoxidierer war eine Zellzahlbestimmung nicht möglich.

3.1.3 Aktivität

3.1.3.1 Mikrosensormessungen

Die Mikrosensordaten (Kap. 2.4) wurden von A. Gieseke und P. Stief (MPI Bremen) erhoben. Die Auswertung stammt zu weiten Teilen von A. Gieseke.

3.1.3.1.1 Sauerstoff und NO_x⁻-Profile

Unter allen Inkubationsbedingungen wurde ein gewisser Sauerstoffverbrauch beobachtet (Abb. 22). Dies gilt auch für den Fall, in dem extern kein Ammonium zugegeben wurde. Ohne Ammonium oder mit geringen Ammoniumkonzentrationen im Medium trat keine Sauerstofflimitation auf. Zunehmende Ammoniumkonzentrationen gingen mit einem steigenden Sauerstoffverbrauch einher. Der Sauerstoff wurde jedoch erst bei der höchsten getesteten Ammoniumkonzentration (1800 µM) limitierend und die Eindringtiefe ging auf 0,3 mm zurück.

Die NO_x⁻-Mikroprofile (Abb. 22) zeigen, dass die Nitrifikationsraten im Allgemeinen mit der zugegebenen Ammoniummenge zunahmen. Auch ohne Ammoniumzugabe war eine geringe Nitrit- und Nitratbildung zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass eine Hintergrundkonzentration von ungefähr 23 µM im Biofilm selbst vorhanden war. Die Menge an gebildetem NO_x⁻ war geringer, wenn der Biofilm vor den Messungen 24 h in ammoniumfreiem Medium vorinkubiert wurde (Daten nicht gezeigt). Wie aus der Krümmung der Profile ersichtlich ist, wurde bei den höchsten Ammoniumkonzentrationen tiefer im Biofilm das Nitrat, vermutlich durch Denitrifikation, wieder verbraucht.

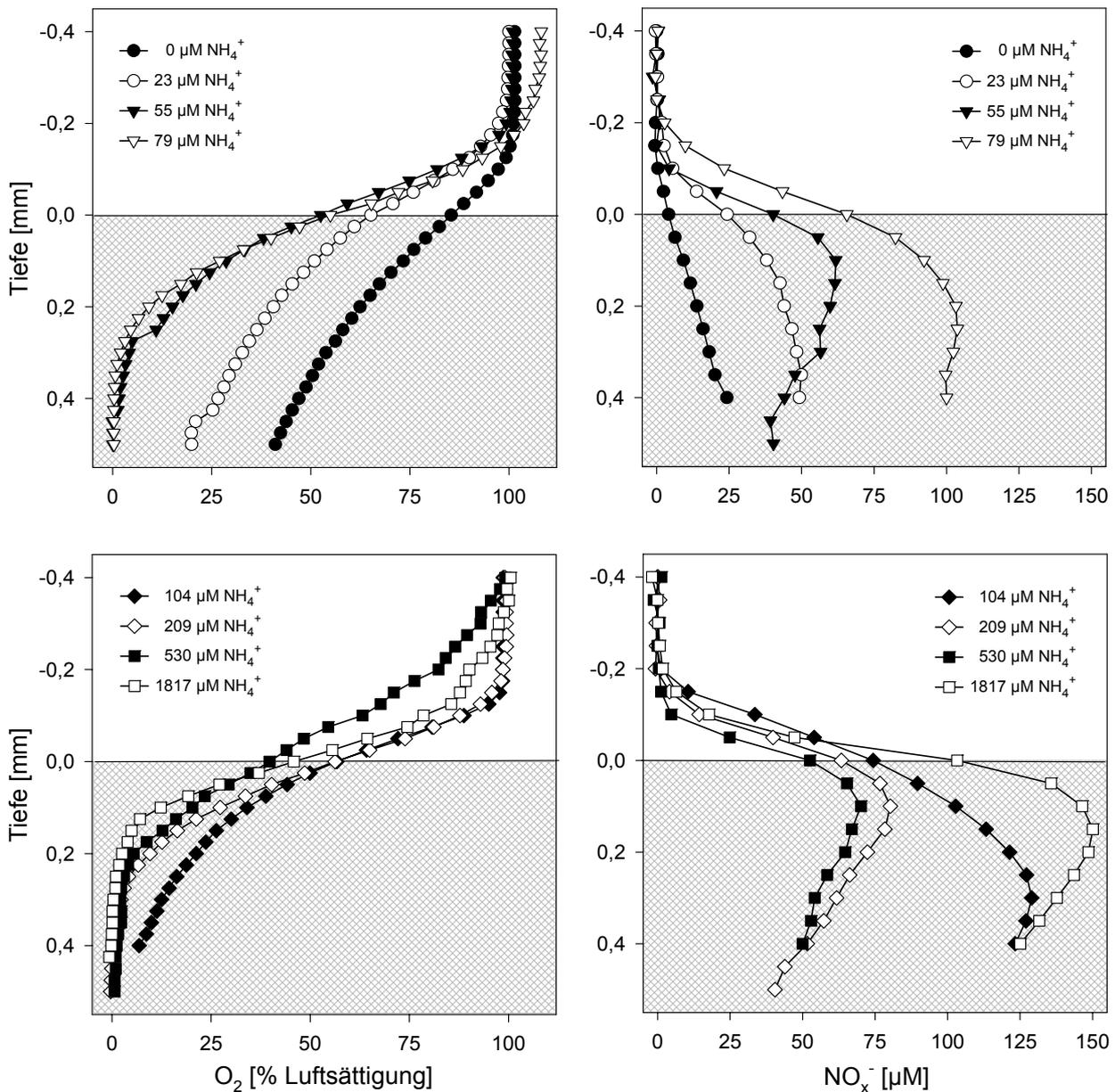


Abb. 22: Durchschnittliche Sauerstoff- und NO_x⁻ (Nitrat + Nitrit)-Mikroprofile in TF-Biofilmen bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen (O₂: n = 5, ausgenommen 0 μM (n = 6), 1816 μM (n = 9); NO_x⁻: n = 5, ausgenommen 0, 79 u. 500 μM (n = 4), 104 μM (n = 7); Fehlerbalken aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen). Linke Spalte: Sauerstoff, rechte Spalte: NO_x⁻.

3.1.3.1.2 In situ-Kinetik

In situ-Substratumsatzraten an der Biofilmoberfläche lagen in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration im Medium zwischen $6 (\pm 4,3)$ und $58 (\pm 17,6)$ μmol oxidiertem NH₃/NH₄⁺ cm⁻³ h⁻¹. Bezogen auf die Zellzahlen (s. o.) ergab dies Werte von $0,36 (\pm 0,27)$ und $3,7 (\pm 1,1)$

fmol Zelle⁻¹ h⁻¹. Über eine Spanne von 0 bis 0,2 mM Ammonium stiegen die Umsatzraten nahezu linear mit der Ammoniumkonzentration (Abb. 23). Bei höheren Konzentrationen wurde die Kurve flacher und es stellte sich allmählich eine Sättigung ein. Nicht-lineare Regression mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (Ein-Enzym-System) ergab einen $K_M(\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+)$ von $294 \pm 70 \mu\text{M}$ und ein v_{max} von $65 \pm 6 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ bzw. $4,06 \pm 0,35 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0,963$). Die Verwendung eines Zwei- oder Mehr-Enzym-Systems erbrachte keine bessere Korrelation.

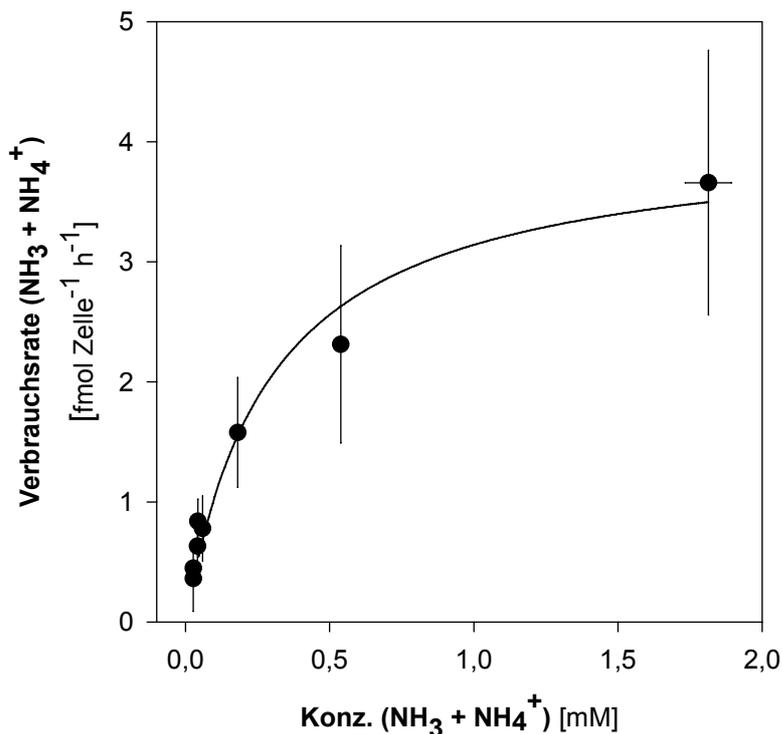


Abb. 23: In situ-Ammoniumoxidationsraten bei verschiedenen lokalen Ammoniumkonzentrationen an der Biofilmoberfläche. Die Kurve stellt eine Fit basierend auf einer einphasigen Michaelis-Menten-Kinetik dar. Fehlerbalken: Standardfehler ($n = 5$, ausgenommen: $0,04 \text{ mM}$ und $0,54 \text{ mM}$ ($n = 4$), $0,06 \text{ mM}$ ($n = 7$)).

3.1.3.2 MAR-FISH

Die Kombination aus Mikroautoradiographie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde benutzt, um zu untersuchen, ob die zwei in situ relevanten AOB Populationen *Nitrosomonas* sp. Nm143 und *Nitrosomonas marina* zwei unterschiedliche Nischen hinsichtlich ihrer Ammoniumaffinität innehaben. Postuliert wurden eine Population mit hoher Substrataffinität, die schon unter den meist vorherrschenden, sehr niedrigen Ammoniumkonzentrationen aktiv ist, und eine

Population mit geringerer Substrataffinität, die an die periodisch wiederkehrenden Ammoniumpeaks angepasst ist (siehe Kap. 1.3). Darüber hinaus wurde die Gruppe der potentiellen AOB auf ihre Fähigkeit zur Ammoniumoxidation hin überprüft.

Generell wurde die höchste Aktivität (CO_2 -Aufnahme unter nitrifizierenden Bedingungen) an der Biofilmoberfläche beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bei den Inkubationen ohne zusätzliches Ammonium war kaum Aktivität vorhanden. Dagegen waren sowohl die *Nitrosomonas* sp. Nm143- als auch die *Nitrosomonas marina*-Population bei $50 \mu\text{M NH}_4^+$ bereits voll aktiv (Abb. 24) und es konnte kein nennenswerter Unterschied in ihrer Ammoniumaffinität festgestellt werden. Die pasteurisierten Kontrollen wiesen nur ein paar zufällig verteilte Silberkörnchen auf (Daten nicht gezeigt).

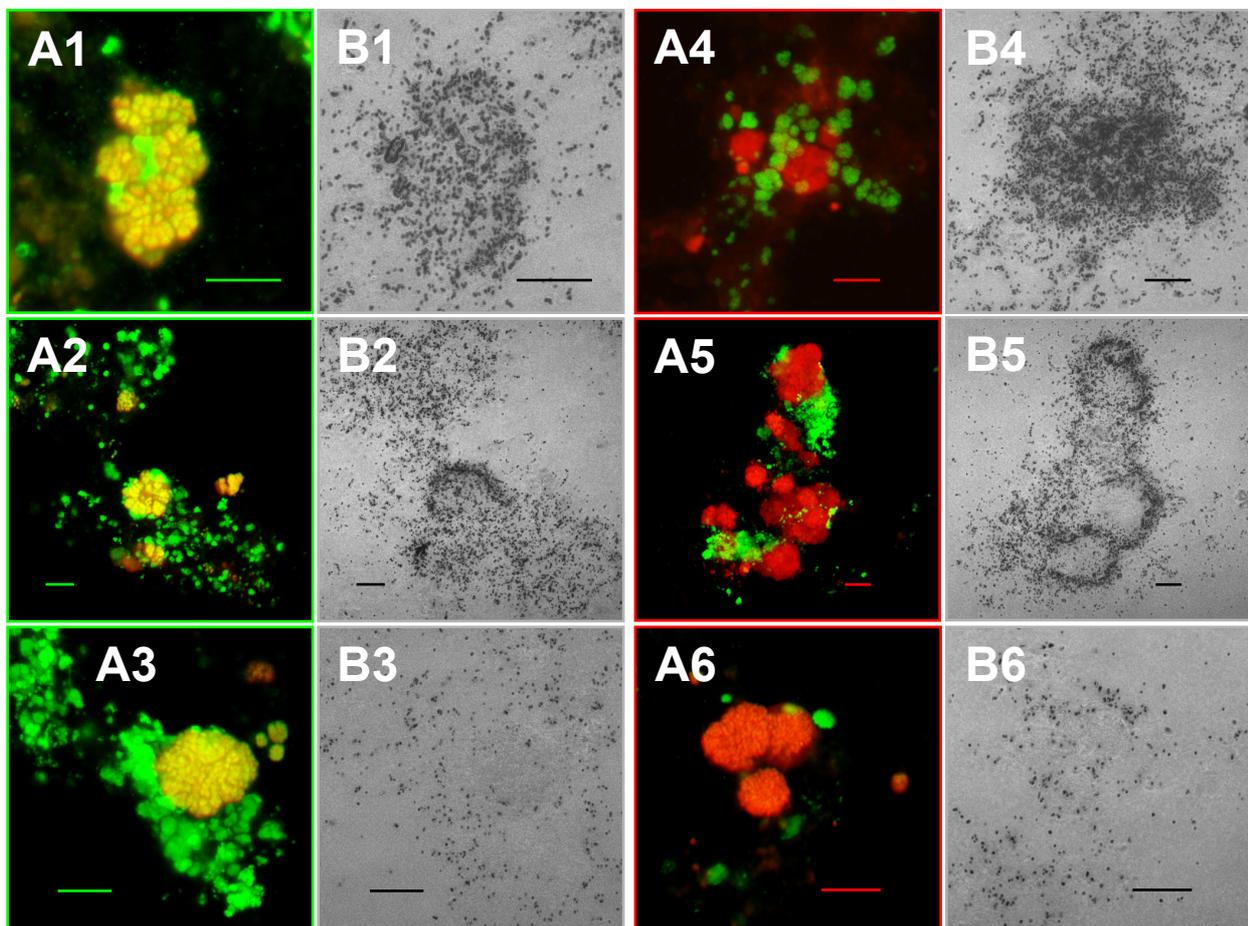


Abb. 24: Aktivität der *in situ* relevanten AOB-Populationen (und als Folgeerscheinung auch der dominanten NOB-Population) bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen. A: FISH-Signal, B: MAR-Signal. 1 - 3: *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandte Spezies (gelb) und *Nitrospira marina*-ähnliche NOB (grün). 4 - 6: *Nitrosomonas marina*-ähnliche Spezies (rot) und *Nitrospira marina*-ähnliche NOB (grün). Alle Bilder stammen von Hybridisierungen mit der gleichen Probenkombination (Nm143-446-1+2-CY3, NEU23a-CY5, NSMR76-CY3, Ntspa712-CY5). Obere Reihe: Inkubation mit $2000 \mu\text{M NH}_4^+$, mittlere Reihe: Inkubation mit $50 \mu\text{M NH}_4^+$, untere Reihe: ohne zusätzliches NH_4^+ ; alle mit ^{14}C -markiertem Bicarbonat. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Für die Gruppe der potentiellen AOB konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 25). Da die sehr kleinen pAOB-Cluster meist von anderen AOB- und NOB-Clustern umgeben waren, war eine eindeutige Zuordnung des MAR-Signals allerdings oft sehr schwierig. Nachdem jedoch auch keine tiefabzweigende *amoA*-Sequenz gefunden wurde (siehe Kap. 3.1.2.2.2), handelt es sich bei dieser Gruppe sehr wahrscheinlich nicht um Ammoniumoxidierer, obwohl sie wie typische AOB-Cluster aussehen.

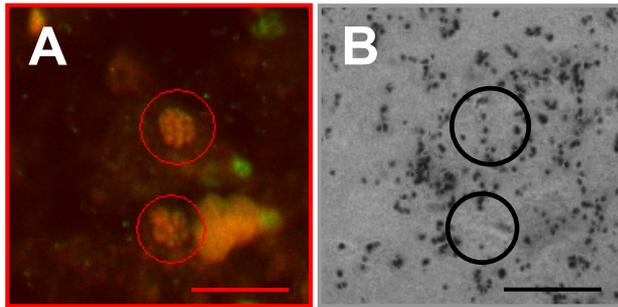


Abb. 25: Aktivität der potentiellen AOB. A: FISH-Signal. Potentielle AOB sind in rot dargestellt, Zellen der *Nitrosomonas sp. Nm143*-Gruppe in grün. NOB wurden hier nicht fluoreszenzmarkiert. B: Zugehöriges MAR-Signal (Inkubation mit 2mM NH_4^+ und ^{14}C -markiertem Bicarbonat). Maßstab: 10 μm .

3.2 Nitratreduktion und Denitrifikation

Die Bedeutung der verschiedenen nitratreduzierenden Prozesse DNRA, Denitrifikation und Anammox (siehe Kap. 1.2.2) in DB und FBR wurde mittels eines ^{15}N -Experiments abgeschätzt. Potentielle Substrate für nitratreduzierende Organismen wurden mittels HPLC-Analyse von Wasserproben aus verschiedenen Anlageteilen ermittelt.

Die Gemeinschaft der Nitratreduzierer und Denitrifikanten wurde zum einen mittels funktioneller Gene (*narG*, *nosZ*) erfasst. Zum anderen wurde versucht, potentiell wichtige Arten aus den drei Biofiltern der Anlage (TF, DB und FBR) zu kultivieren und zu isolieren. Anschließend wurden die beiden Ansätze auf Ebene der funktionellen Gene verglichen.

Um den Einfluss von Sulfid auf Denitrifikation und DNRA zu untersuchen, wurden ^{15}N -Experimente mit Schlamm aus dem DB vorgenommen (Schwermer et al., unveröffentlicht). Darüber hinaus wurde der Effekt von Sulfid auf Wachstum und Nitratumsetzung ausgewählter Isolate untersucht.

3.2.1 Relevanz verschiedener nitratreduzierender Prozesse

^{15}N -Inkubationsexperimente (Kap. 2.5) ergaben, dass im DB 30 - 60% des Nitrat-N in N_2 wiedergefunden wurde, das aus dem Denitrifikationsprozess stammte (Tab. 25). Dabei waren deutliche Unterschiede innerhalb der Schlammsäule zu beobachten. In der Bodenschicht machte die Denitrifikation nur einen Anteil von +/- 30% aus, während es in der obersten Schlammschicht ca. 50 - 60% waren. Im FBR trug die Denitrifikation knapp 20% zum Nitratumsatz bei. Anzeichen für Anammox wurden in keiner der Inkubationen gefunden. Da auch kaum N_2O gebildet wurde, ist anzunehmen, dass das restliche Nitrat über DNRA zu Ammonium umgesetzt wurde.

Tab. 25: Bedeutung des Denitrifikationsprozesses in DB und FBR.

DB		% Denitrifikation	N_2O max. [μM]
Einlass	Oben	49	0,4
	Unten	35	0,5
Mitte	Oben	45	0,7
	Unten	27	0,001
Auslass	Oben	64	0,5
	Unten	36	0,001

Fortsetzung Tab. 25: Bedeutung des Denitrifikationsprozesses in DB und FBR.

FBR	% Denitrifikation	N ₂ O max. [μ M]
Einlass (Unten)	16	0,015
Auslass (Oben)	16	0,017

3.2.2 Isolierung nitratreduzierender und denitrifizierender Spezies

3.2.2.1 Auswahl von Substraten für das Kultivierungsexperiment

Um einen Eindruck zu gewinnen, welche C-Quellen im System vorhanden sind, wurden Wasserproben aus verschiedenen Anlagenteilen mittels HPLC analysiert. Im DB wurden verschiedene kurzkettige Fettsäuren detektiert (Tab. 26). Zucker, Aminozucker oder Alkohole wurden nicht gefunden. In Fischpool, TF und FBR wurde keine der detektierbaren Substanzen festgestellt.

Tab. 26: Mittels HPLC-Analyse im DB detektierte C-Quellen.

		DB, in		DB, m		DB, out	
		Okt '03	Mai '04	Okt '03	Mai '04	Okt '03	Mai '04
		c [mM]					
Oben	Acetat	-	-	-	-	0,03	-
	Propionat	-	-	-	-	0,04	-
	Isobutyrat	-	-	-	-	n. b.	-
Mitte	Acetat	n. a.	-	n. a.	0,33	n. a.	-
Unten	Acetat	2,48	3,61	8,97	n. b.	1,05	n. b.
	Propionat	1,25	0,96	4,23	-	1,20	-
	Isobutyrat	0,15	0,10	0,71	-	n. b.	-
	Butyrat	0,39	-	1,54	-	-	-
	D,L- Methylbutyrat	0,28	-	0,56	-	-	-

n. a. = nicht analysiert, n. b. = nicht bestimmbar, da Konz. zu gering

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden verschiedene Fettsäuren (Acetat, Lactat, Propionat, Butyrat/Isobutyrat) als e⁻-Donatoren für das Kultivierungsexperiment gewählt. Zusätzlich wurden noch ein Medium mit Thiosulfat (→ nitratreduzierende Sulfidoxidierer) und ein Hefe/Pepton-Medium (→ Fischfutter sehr eiweißreich) verwendet (siehe Kap. 2.6.1.2.1).

3.2.2.2 Isolierung und phylogenetische Analyse

Zur Gewinnung von Reinkulturen potentiell in situ relevanter Nitratreduzierer und Denitrifikanten wurden Verdünnungsreihen von Proben aus TF, FBR und DB (unterteilt in in, m und out) angesetzt. Aus den höheren Verdünnungsstufen (10^{-5} bis 10^{-9}) wurden anschließend Einzelkolonien isoliert und auf Nitratverbrauch gescreent (siehe Kap. 2.6.2).

Von insgesamt ca. 780 getesteten Isolaten waren 484 Nitrat-positiv, was einem Anteil von 62% entspricht. Die Nitrat-positiven Isolate wurden mittels RFLP-Analyse (siehe Kap. 2.7.8) in Gruppen eingeteilt. Anschließend wurde von einigen Vertretern jeder Gruppe ein fast vollständiges 16S rRNA-Genfragment sequenziert und phylogenetisch analysiert (Tab. 27). Anhand der Ergebnisse der Sequenzanalyse wurde die Gruppeneinteilung überprüft und, wo nötig, korrigiert. Dies führte zur Identifikation von insgesamt 41 verschiedenen Spezies.

Tab. 27: Phylogenetische Einordnung und nächste Verwandte (basierend auf BLAST-Analyse mit 16S rRNA-Sequenzen fast voller Länge) nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien aus der Aquakultur.

Gruppe	Isolat	RFLP-Muster	Accession Number	Sequenzlänge (bp)	Nächster Verwandter	Sequenzähnlichkeit
Alphaproteobacteria						
1	D5-9	7a	AM403187	1338	<i>Marteella mediterranea</i>	99%
	D5-11.1		AM403188	1327	“	“
	D9-11		AM403217	813	“	“
	D7-23.1		AM403207	894	“	98%
2	D9-21	7c	AM403218	1342	<i>Ochrobactrum aqua-oryzae</i>	100%
3	D2-13b	19/7h	AM403175	1351	<i>Shinella granuli</i>	99%
	D5-25		AM403191	1347	“	98%
	D11-28.1		AM403228	1358	“	99%
	D11-29		AM403229	1356	“	99%
	D12-46d		AM403241	1339	“	99%
4	D11-69	7g	AM403234	1361	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	96%
5	D1-42	7+7e+7c	AM403163	1351	<i>Pseudaminobacter</i> sp. W11-4	98%
	D5-18		AM403189	1345	“	97%
	D8-46		AM403213	1345	“	97%
	D11-71		AM403235	1346	“	97%
6	D12-37.1	~7a	AM403238	1278	<i>Mesorhizobium</i> sp. GWS-BW-H238	99%
7	D11-73	34	AM403236	1353	<i>Devosia riboflavina</i>	96%
8	D1-6	4	AM403158	1307	<i>Paracoccus solventivorans</i>	97%

Gruppe	Isolat	RFLP-Muster	Accession Number	Sequenzlänge (bp)	Nächster Verwandter	Sequ.-ähnlichk.
9	D1-19	3	AM403160	1195	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	95%
	D3-7bb		AM403177	1311	"	95%
10	D5-6.1	13a+13b	AM403186	1340	<i>Rhodobacter litoralis</i>	97%
	D5-41		AM403195	1352	"	97%
	D7-44		AM403209	1345	"	97%
	D8-35		AM403212	1331	"	97%
11	D9-3	3b+3c	AM403214	1320	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	94%
	D11-58		AM403233	1336	"	95%
12	D8-16	25+7f	AM403211	1338	<i>Stappia stellulata</i>	98%
	D11-55		AM403232	1326	"	98%
13	D2-3	13(=D2-3)	AM403172	1352	" <i>Cand. Alysiosphaera europaeae</i> "	90%
14	D1-34	5+11f	AM403161	1372	<i>Tistrella mobilis</i>	99%
	D1-36		AM403162	1367	"	99%
	D6-30		AM403200	1374	"	99%
<i>Betaproteobacteria</i>						
15	D3-13.1	17	AM403179	1392	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	97%
	D11-24b2		AM403226	1394	"	98%
16	D9-5	13c	AM403215	1387	<i>Bordetella trematum</i>	99%
17	D8-13b	24	AM403210	1385	<i>Massilia timonae</i>	99%
18	D1-68	1+12	AM403170	1409	<i>Denitromonas indolicum</i>	99%
	D2-1		AM403171	1396	"	99%
	D12-45.1		AM403240	1386	"	99%
<i>Gammaproteobacteria</i>						
19	D10-48	28	AM403222	1369	<i>Rheinheimera baltica</i>	97%
20	D7-10	11m	AM403204	1392	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99%
21	D3-8	11d/18	AM403178	1390	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	98%
	D7-21		AM403206	1398	"	97%
22	D3-15	11c	AM403180	1393	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%
23	D6-18	11(+11g-j+p)	AM403198	1393	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>P. chloritidismutans</i>	99%
24	D1-57	11a	AM403167	1393	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>P. balearica</i>	99% 98%
	D1-58		AM403168	1396	"	"
	D3-26		AM403184	1393	"	"
	D4-34		AM403185	1392	"	"
	D5-38b		AM403194	1393	"	"
	D6-6		AM403196	1403	"	"
	D6-32b		AM403202	1397	"	"
	D11-10.1		AM403223	1399	"	"

Gruppe	Isolat	RFLP-Muster	Accession Number	Sequenzlänge (bp)	Nächster Verwandter	Sequ.-ähnlichk.
25	D2-17	16+11o	AM403176	1383	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99%
	D6-9		AM403197	1385	"	99%
26	D3-22	9b+15	AM403182	1396	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99%
	D3-23		AM403183	1390	"	99%
	D5-19		AM403190	1399	"	99%
	D5-35a		AM403192	1395	"	99%
	D5-38a		AM403193	1398	"	99%
	D7-5		AM403203	1392	"	99%
	D11-27		AM403227	1396	"	99%
	D12-26a		AM403237	1396	"	99%
27	D6-32a	27+30	AM403201	1387	<i>Aquimonas voraii</i>	99%
	D9-22		AM403219	1393	"	99%
	D11-21		AM403224	1398	"	99%
	D11-34A		AM403231	1371	"	99%
Bacteroidetes						
28	D12-42.1	13d	AM403239	1388	<i>Flexibacter aggregans</i>	99%
29	D11-24b1	31	AM403225	1369	<i>Cytophaga sp.</i> <i>Flavobacterium gelidilacus</i>	94% 92%
30	D10-6.1	xxx	AM403221	1349	<i>Muricauda aquimarina</i> , <i>M. flavescens</i>	97%
31	D7-13	22	AM403205	1353	<i>Vitellibacter vladivostokensis</i>	99%
Firmicutes						
32	D1-61.1	11b(+k)	AM403169	1426	<i>Enterococcus sanguinicola</i>	99%
33	D1-54	9a	AM403166	1409	<i>Bacillus firmus</i>	99%
34	D1-52	9	AM403165	903	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. anthracis</i>	99%
Actinobacteria						
35	D9-7	26	AM403216	1362	<i>Mycobacterium peregrinum</i> , ...	99%
36	D6-28	21	AM403199	577	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	96%
37	D2-4	6/6a	AM403173	1396	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98%
	D2-6		AM403174	1368	<i>Rhodococcus zopfii</i>	99%
	D3-18		AM403181	1360	<i>Rh. zopfii</i> , <i>Rh. phenolicus</i>	99%
	D11-33.1		AM403230	1367	<i>Rh. phenolicus</i> , <i>Rh. zopfii</i>	99% 98%
38	D1-15	2	AM403159	1361	<i>Microbacterium aurum</i>	99%
39	D7-38	23	AM403208	1268	<i>Microbacterium chocolatum</i> , <i>M. laevaniformans</i>	99%
40	D9-23	2b	AM403220	1357	<i>Microbacterium koreense</i> , <i>M. schleiferi</i>	98%
41	D1-50	10	AM403164	1372	<i>Leucobacter chromiireducens</i>	99%

Es wurden Vertreter der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, der *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* isoliert (Abb. 26). Während die Gammaproteobakterien - und hier v. a. die Gattung *Pseudomonas* - mit 42% zahlenmäßig überwog, machten, nach der Anzahl der verschiedenen Spezies bewertet, die Alphaproteobakterien mit 34% den größten Anteil aus.

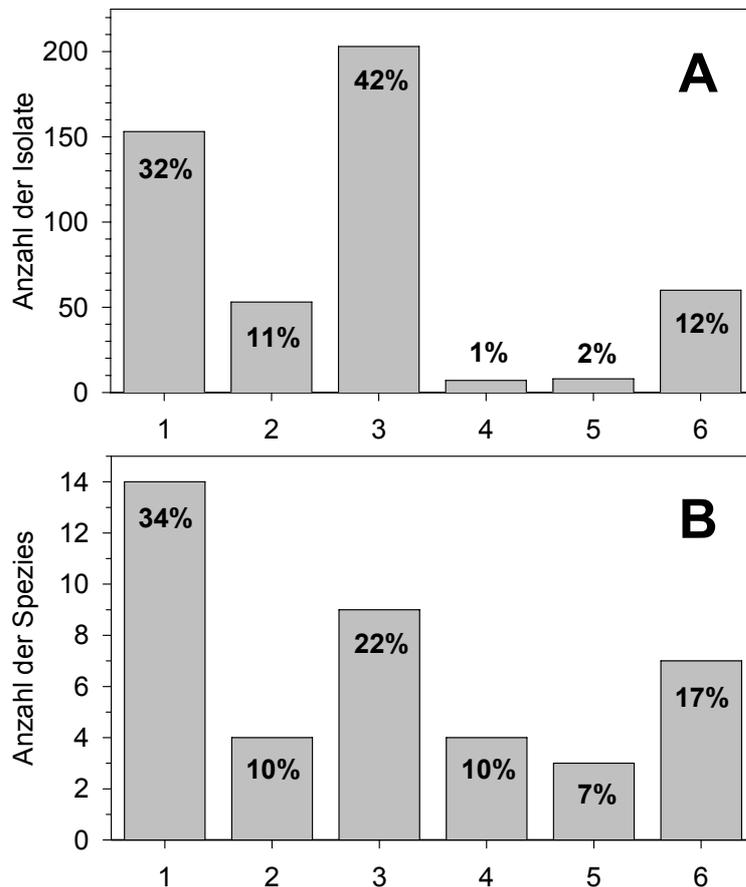


Abb. 26: Verteilung der Isolate auf verschiedene phylogenetische Gruppen (1: *Alpha*- 2: *Beta*- 3: *Gammaproteobacteria*, 4: *Bacteroidetes*, 5: *Firmicutes*, 6: *Actinobacteria*). A: Anzahl der insgesamt gewonnen Isolate. B: Anzahl der unterschiedlichen Spezies.

In Abb. 27 bis 29 sind die Ergebnisse des Kultivierungsversuchs nach Teilsystemen, Medien und Verdünnungsstufen aufgeschlüsselt dargestellt.

Abgesehen von Arten, die insgesamt nur ein einziges Mal isoliert wurden, kamen die meisten Arten in mehr als einem der untersuchten Teilsysteme vor. Allerdings ließen sich für bestimmte Arten deutliche Schwerpunkte erkennen. Beispielsweise kam die zahlenmäßig am stärksten vertretene Gattung *Pseudomonas* überwiegend im DB vor, während aus TF und DB nur vereinzelt *Pseudomonas*-Spezies isoliert wurden. Dagegen wurde die Gattung *Denitromonas* schwerpunktmäßig aus TF und FBR isoliert. *Rhodobacter*-Spezies fanden sich hauptsächlich im FBR,

während *Actinobacteria* aus diesem Teilsystem überhaupt nicht isoliert wurden. *Firmicutes* wurden hauptsächlich im DB gefunden.

Viele Arten wurden von mehreren Medien isoliert. Allerdings gab es auch einige Gruppen, die nur auf einem der gewählten Medien wuchsen. Zum Beispiel wurden *Firmicutes* nur von M6 isoliert, *Cand. „Rhodobacter denitrificans“* (= D9-3 u. D11-58; siehe Kap. 3.2.2.4) und einige andere der nur sehr selten gefundenen Arten nur von M5.

Es gab nur einige wenige Arten (D2-3 (= „*Cand. Geminicoccus roseus*“), D9-5 (99% Ähnlichkeit zu *Bordetella trematum*), D7-10 (99% Ähnlichkeit zu *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) und D12-42.1 (99% Ähnlichkeit zu *Flexibacter aggregans*)), die nur bis Verdünnungsstufe 10^{-5} vorkamen. In Verdünnungsstufe 10^{-6} waren noch 90% aller gefundenen Arten vertreten, bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-7} waren es noch 83%. Bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-8} waren es 63% und bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-9} noch 41%.

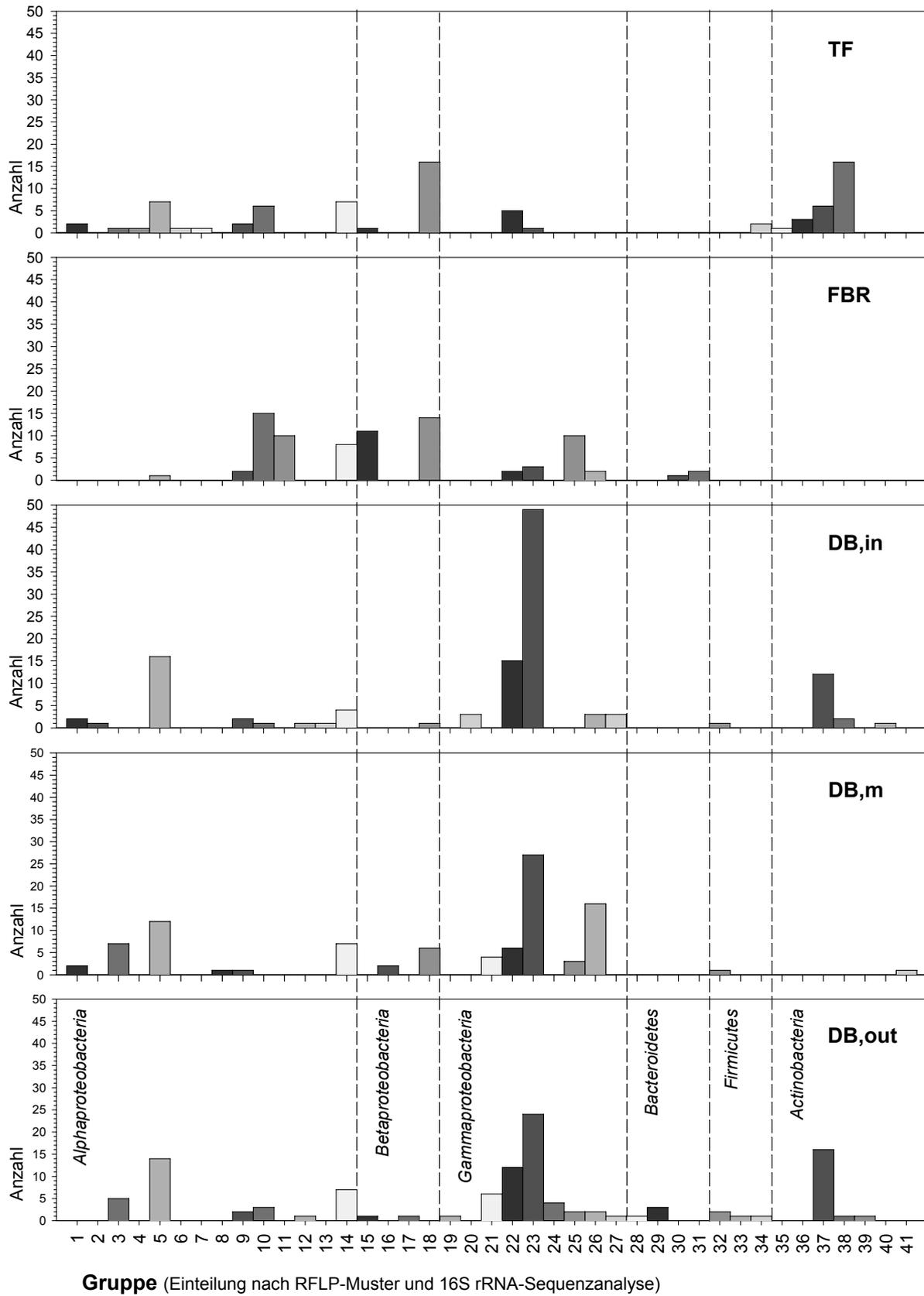


Abb. 27: Herkunft der Isolate aus den verschiedenen Teilsystemen. Die Namen der nächsten Verwandten der Gruppen 1 - 41 sind Tab. 27 zu entnehmen.

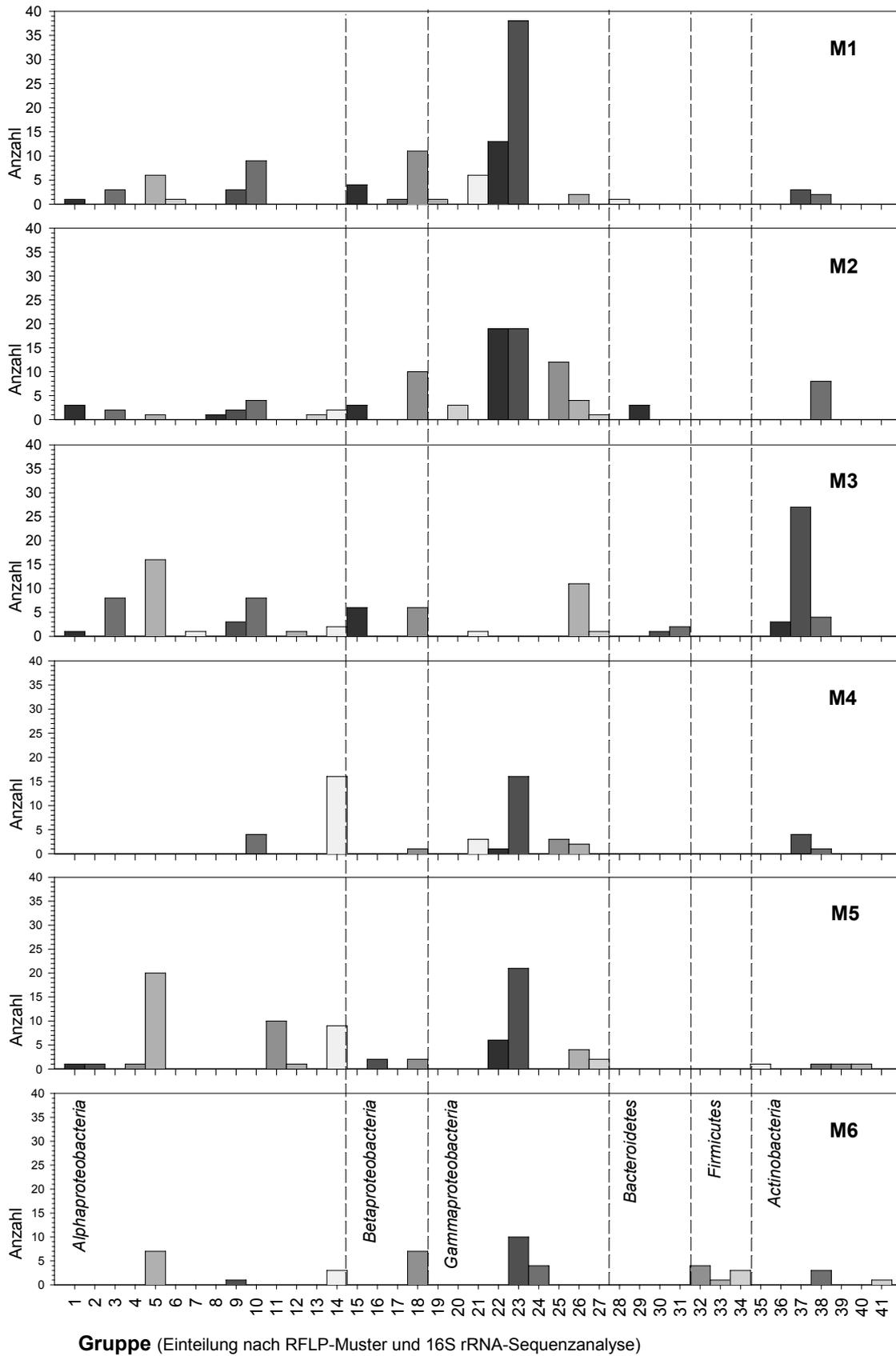


Abb. 28: Herkunft der Isolate von verschiedenen Medien. Die Namen der nächsten Verwandten der Gruppen 1 - 41 sind Tab. 27 zu entnehmen.

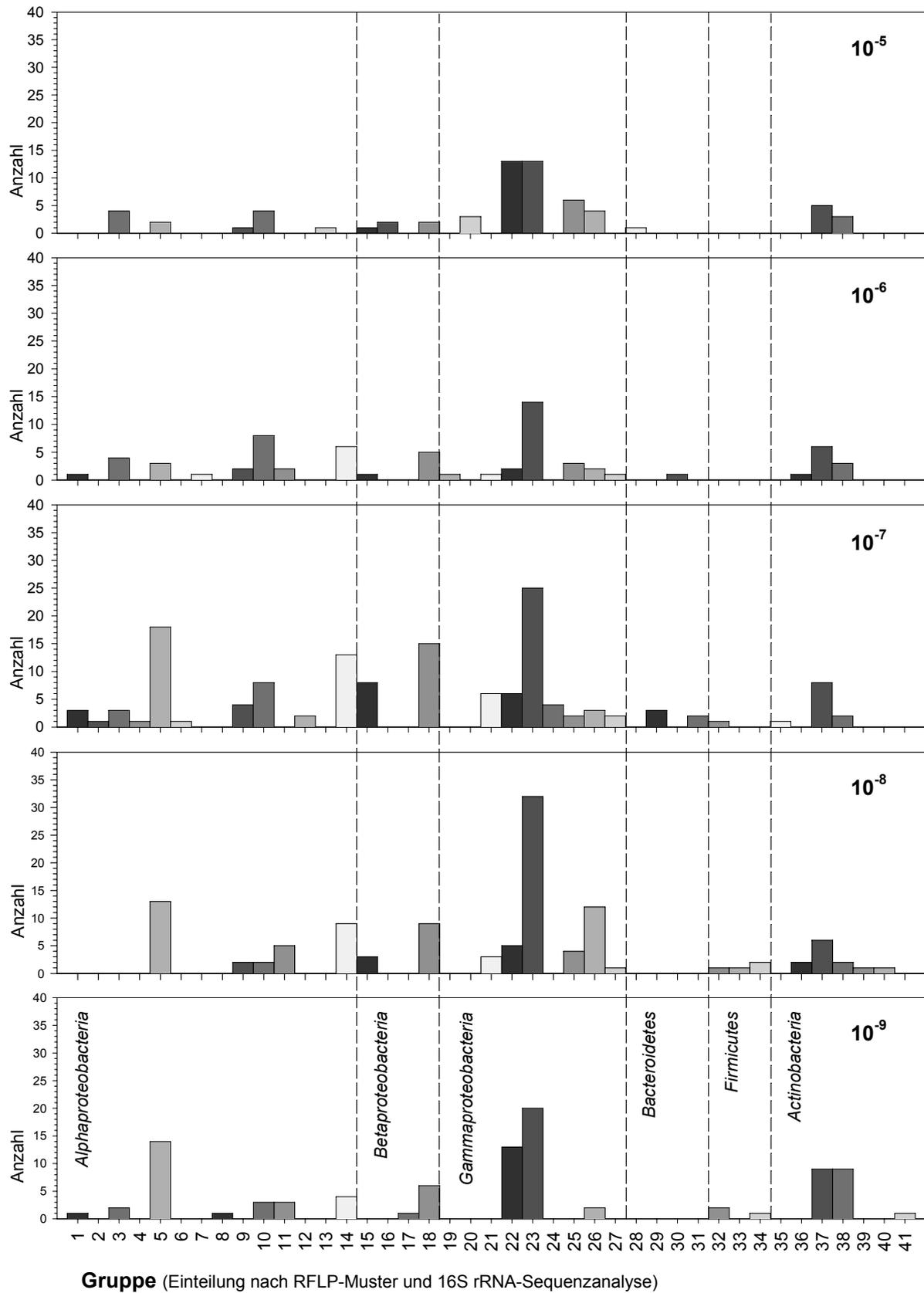


Abb. 29: Herkunft der Isolate aus verschiedenen Verdünnungsstufen. Die Namen der nächsten Verwandten der Gruppen 1 - 41 sind Tab. 27 zu entnehmen.

3.2.2.3 Fähigkeit zur Nitratreduktion/Denitrifikation

Von 41 Isolatgruppen enthielten 16 Denitrifikanten (Tab. 28). In 13 davon war die Fähigkeit vorhanden, Nitrat vollständig zum N_2 zu reduzieren. In zwei Gruppen (20: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, 30: *Bacillus firmus*) wurde Nitratreduktion nur bis zum N_2O festgestellt. In einer Gruppe (10: *Rhodobacter litoralis*) wurde ein Isolat gefunden, das nur von Nitrit ausgehend denitrifizieren konnte; das Endprodukt war N_2 . In manchen Gruppen variierte die Fähigkeit zur Nitratreduktion/Denitrifikation von Stamm zu Stamm. In der *Pseudoxanthomonas mexicana*-Gruppe (Nr. 26) gab es beispielsweise einige Stämme, die bis zum N_2 denitrifizierten, während andere nur Nitrat zu Nitrit reduzieren konnten. Bei Mitgliedern der Gruppe 27 (*Aquimonas voraii*-Verwandte) reichte das Spektrum vom Fehlen gasförmiger Produkte über die Bildung von N_2O als Endprodukt bis zur vollständigen Denitrifikation mit N_2 als Endprodukt.

Tab. 28: Test auf Nitratverbrauch, Nitrit-, N_2O - und N_2 -Bildung. Dargestellt sind nur diejenigen Isolate, die sequenziert und auf die Bildung gasförmiger N-Spezies untersucht wurden. Hinterlegung: hellgrau: N_2 -Bildung, mittelgrau: N_2O -Bildung, gestrichelt: Übergänge.

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	Sequenz-ähnlichkeit	Verbrauch	Bildung		
					NO_3^-	NO_2^-	N_2O
Alphaproteobacteria							
1	D5-9	<i>Marteella mediterranea</i>	99%	(x)	xxx	-	-
	D5-11.1	"	"	? ^a	? ^a	? ^a	-
	D9-11	"	"	? ^b	-	-	-
	D7-23.1	"	98%	? ^a	? ^a	? ^a	-
2	D9-21	<i>Ochrobactrum aqua-oryzae</i>	100%	? ^b	-	-	x
3	D2-13b	<i>Shinella granuli</i>	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x
	D5-25	"	98%	xxx	-	-	x/- ^c
	D11-28.1	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x
	D11-29	"	99%	xxx	-	-	x
	D12-46d	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x
4	D11-69	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	96%	? ^b	-	-	-
5	D1-42	<i>Pseudaminobacter</i> sp. W11-4	98%	xxx	xxx	-	-
	D5-18	"	97%	(x)	(x)	-	-
	D8-46	"	97%	x	-	-	-
	D11-71	"	97%	x	-	-	-
6	D12-37.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. GWS-BW-H238	99%	? ^a	? ^a	? ^a	-
7	D11-73	<i>Devosia riboflavina</i>	96%	x	x	-	-
8	D1-6	<i>Paracoccus solventivorans</i>	97%	(x)	-	-	-

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	Sequenz-ähnlichkeit	Verbrauch	Bildung		
					NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	N ₂ O
9	D1-19	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	95%	(x)	-	-	-
	D3-7bb	"	95%	? ^a	? ^a	? ^a	-
10	D5-6.1	<i>Rhodobacter litoralis</i>	97%	? ^a	? ^a	? ^a	-
	D5-41	"	97%	x	(x)	-	-/x ^d
	D7-44	"	97%	(x)	-	-	-
	D8-35	"	97%	x	-	-	-
11	D9-3	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	94%	? ^b	-	-	x
	D11-58	"	95%	? ^b	-	-	x
12	D8-16	<i>Stappia stellulata</i>	98%	xxx	-	-	-
	D11-55	"	98%	? ^b	-	-	x
13	D2-3	" <i>Cand. Alysiosphaera europaeae</i> "	90%	(x)	-	-	-
14	D1-34	<i>Tistrella mobilis</i>	99%	xxx	xxx	-	-
	D1-36	"	99%	(x)	-	-	-
	D6-30	"	99%	x	(x)	-	-
Betaproteobacteria							
15	D3-13.1	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	97%	? ^a	? ^a	? ^a	-
	D11-24b2	"	98%	? ^a	? ^a	? ^a	-
16	D9-5	<i>Bordetella trematum</i>	99%	? ^b	-	-	-
17	D8-13b	<i>Massilia timonae</i>	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x/- ^c
18	D1-68	<i>Denitromonas indolicum</i>	99%	xxx	-	-	x
	D2-1	"	99%	xxx	xx	x	x
	D12-45.1	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x
Gamma proteobacteria							
19	D10-48	<i>Rheinheimera baltica</i>	97%	x	(x)	-	-
20	D7-10	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99%	xxx	-	x	-
21	D3-8	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	98%	? ^a	? ^a	? ^a	x
	D7-21	"	97%	x	(x)	-	x
22	D3-15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	x	xxx	-	x
23	D6-18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	x	-	-	x
24	D1-57	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	xxx	-	-	x
	D1-58	"	"	xxx	-	-	x
	D3-26	"	"	xx	-	-	x
	D4-34	"	"	? ^b	-	-	x
	D5-38b	"	"	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
	D6-6	"	"	x	(x)	-	x
	D6-32b	"	"	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
	D11-10.1	"	"	? ^a	? ^a	-	x

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	Sequenz- ähnlichkeit	Verbrauch			
				NO ₃ ^{-*}	NO ₂ ^{-*}	N ₂ O	N ₂
25	D2-17	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99%	xxx	xxx	-	-
	D6-9	"	99%	xxx	xxx	-	-
26	D3-22	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99%	xxx	xxx	-	-
	D3-23	"	99%	xxx	-	-	x
	D5-19	"	99%	xx	xx	-	-
	D5-35a	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
	D5-38a	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
	D7-5	"	99%	xxx	xxx	-	x
	D11-27	"	99%	xxx	-	x	x/- ^c
	D12-26a	"	99%	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
27	D6-32a	<i>Aquimonas voraii</i>	99%	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a
	D9-22	"	99%	? ^b	-	x	-
	D11-21	"	99%	xx	-	-	x
	D11-34A	"	99%	? ^a	-	-	-
Bacteroidetes							
28	D12-42.1	<i>Flexibacter aggregans</i>	99%	? ^a	? ^a	? ^a	x
29	D11-24b1	<i>Cytophaga sp.</i>	94%	? ^a	? ^a	? ^a	-
30	D10-6.1	<i>Muricauda aquimarina, M. flavescens</i>	97%	? ^a	? ^a	? ^a	-
31	D7-13	<i>Vitellibacter vladivostokensis</i>	99%	(x)	xx	-	-
Firmicutes							
32	D1-61.1	<i>Enterococcus sanguinicola</i>	99%	(x)	-	-	-
33	D1-54	<i>Bacillus firmus</i>	99%	xxx	-	x	-
34	D1-52	<i>Bacillus cereus, ...</i>	99%	(x)	-	-	-
Actinobacteria							
35	D9-7	<i>Mycobacterium peregrinum, ...</i>	99%	? ^b	-	-	-
36	D6-28	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	96%	xxx	xxx	-	-
37	D2-4	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98%	xxx	xxx	-	-
	D2-6	<i>Rhodococcus zopfii</i>	99%	xxx	-	-	-
	D3-18	<i>Rhodococcus zopfii, R. phenolicus</i>	99%	xxx	xxx	-	-
	D11-33.1	<i>Rhodococcus phenolicus, R. zopfii</i>	99% 98%	? ^a	? ^a	-	-
38	D1-15	<i>Microbacterium aurum</i>	99%	x	xxx	-	-
39	D7-38	<i>Microbacterium chocolatum, M. laevaniformans</i>	99%	? ^b	-	-	-
40	D9-23	<i>Microbacterium koreense, M. schleiferi</i>	98%	? ^b	-	-	-
41	D1-50	<i>Leucobacter chromiireducens</i>	99%	(x)	-	-	-

* abgestuft in (x): minimal, x: wenig, xx: mittel, xxx: sehr viel oder alles

^a war zum Zeitpunkt des Tests noch keine RK, weshalb keine Angaben über das spezifische Isolat möglich sind

^b M5 -> Nitrattest nicht möglich

^c in M6 positiv, in M_{FGH} negativ

^d Denitrifikation ausgehend von Nitrit (siehe 3.2.2.4.6)

3.2.2.4 Beschreibung von D2-3 sowie der *Rhodobacter*-verwandten Spezies D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58

3.2.2.4.1 Herkunft der Isolate

Das Isolat D2-3 wurde nur ein einziges Mal isoliert. Es stammt aus der Probe DB, in Verdünnungsstufe 10^{-5} in Medium M2 (mit Lactat) und wurde über Ansatz 1A isoliert.

D1-19 wurde aus der Probe DB, in Verdünnungsstufe 10^{-7} in M3 (mit Propionat) ebenfalls über Ansatz 1A isoliert. Isolate mit gleichem RFLP-Muster wurden aber auch aus allen anderen Teilsystemen, von M1 (Acetat), M2 (Lactat), M3 (Propionat) und M6 (Hefe/Pepton), über Ansatz 0 und 1A und bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-8} gewonnen.

Isolat D5-41 wurde über Ansatz 1B gewonnen. Es stammt aus der Probe DB, out Verdünnungsstufe 10^{-6} in M3 (mit Propionat). Isolate mit gleichem RFLP-Muster waren auch in den Teilsystemen TF, DB, in und DB, out sowie FBR, auf M1 (Acetat), M2 (Lactat), M3 (Propionat), M4 (Butyrat/Isobutyrat), über alle 3 Ansätze und bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-9} zu finden.

D9-3 und D11-58 stammen aus der Probe FBR Verdünnungsstufe 10^{-6} bzw. 10^{-8} in M5 (mit Thiosulfat) und wurden über Ansatz 1A bzw. 0 isoliert. Alle weiteren Isolate, die dieses RFLP-Muster aufwiesen, kamen ebenfalls aus dem FBR, von M5 (Thiosulfat), aus allen 3 Ansätzen und waren bis einschließlich Verdünnungsstufe 10^{-9} zu finden.

3.2.2.4.2 Morphologische und cytologische Charakteristika

D2-3 bildete 1 - 3 mm große Kolonien, die glatt, glänzend, kreisförmig, konvex, glattrandig und rosa pigmentiert waren. Bei den Zellen handelte es sich um Gram-negative Diplokokken mit einem Durchmesser von 1,5 - 2,1 μm (Abb. 30).

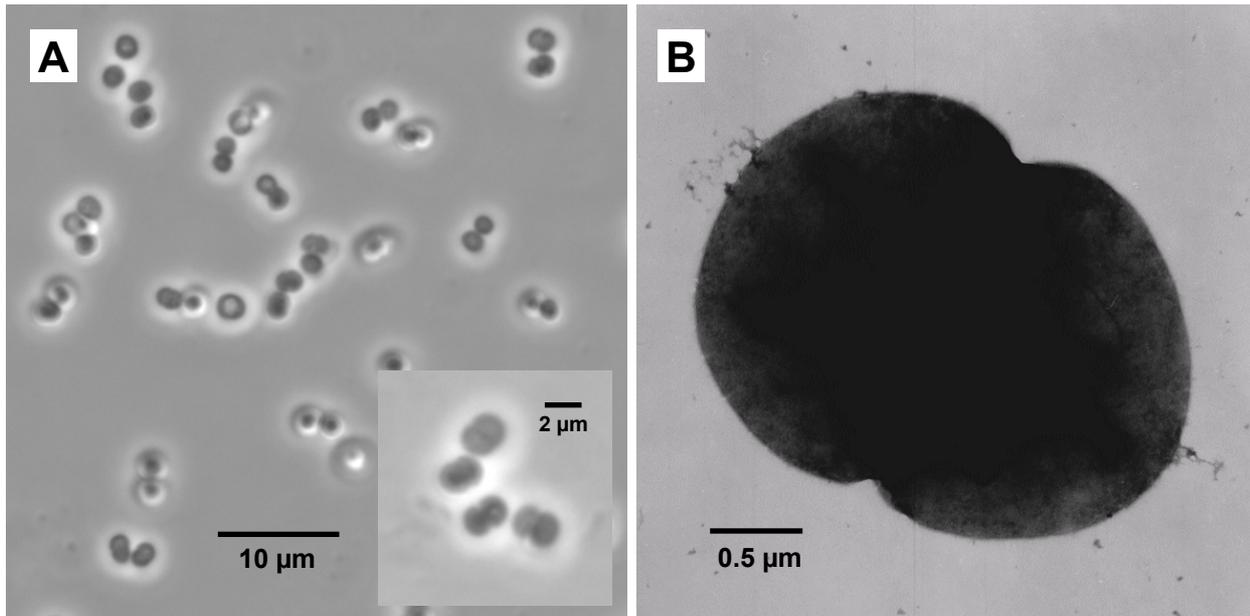
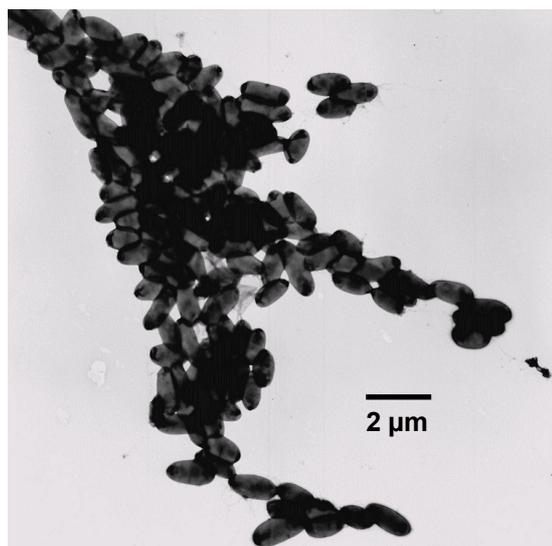
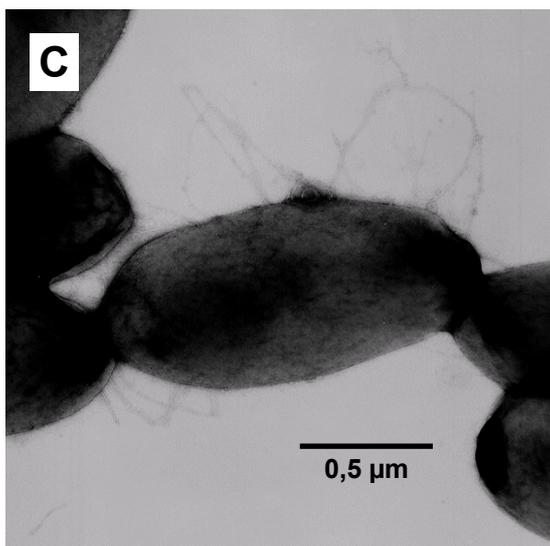
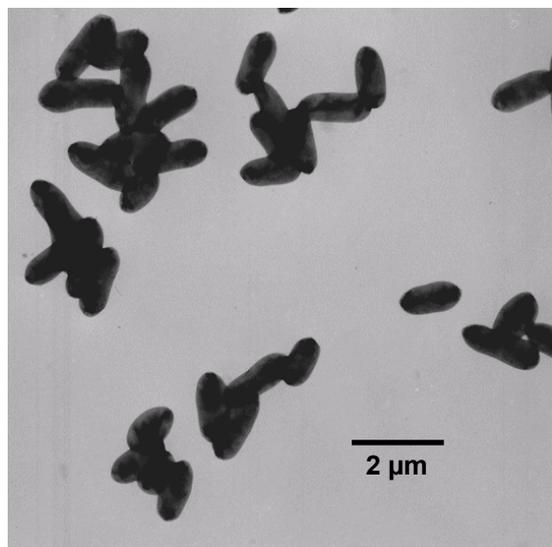
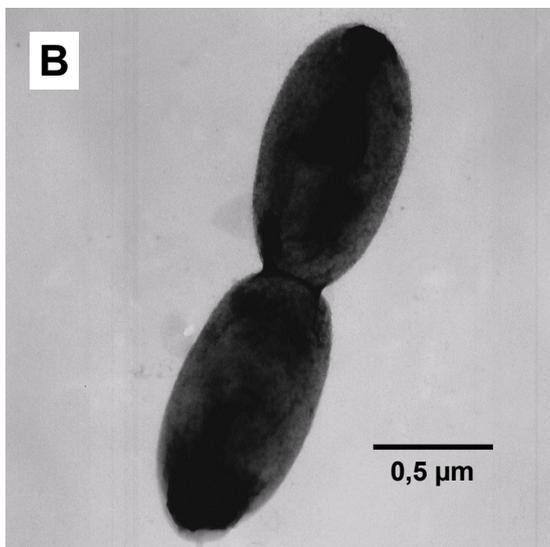
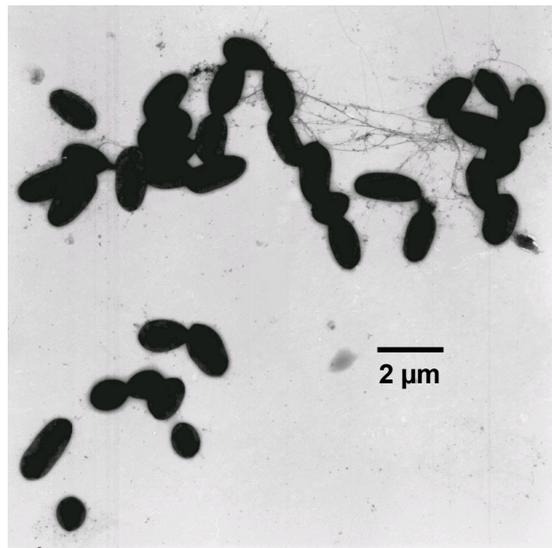
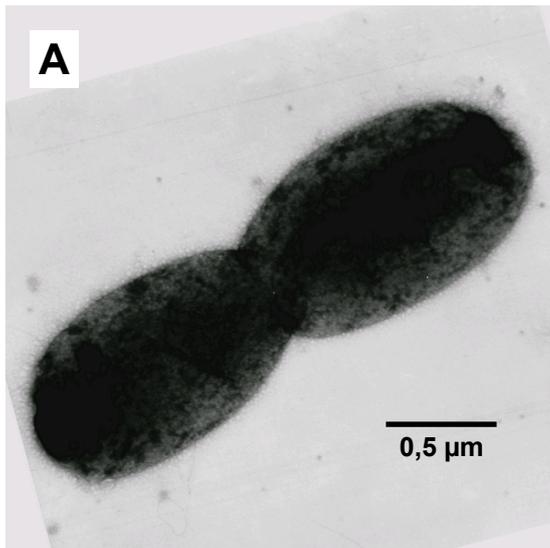


Abb. 30: Zellen des Isolats D2-3. A: Lichtmikroskopische Abbildung (Phasenkontrast). B: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme.

Die Kolonien von D1-19 waren 2 - 3 mm groß, glatt und glänzend. Die Wölbung war konvex, die Ränder glatt, die Färbung durchscheinend weißlich bis bräunlich. Bei den Einzelzellen handelte es sich um Gram-negative Stäbchen von 1,5 - 2,5 µm Länge und 0,5 - 0,8 µm Breite. (Abb. 31, A). In Flüssigkultur neigte der Stamm stark zur Aggregatbildung.

D5-41 bildete 1 - 1,5 mm große Kolonien, die glatt, glänzend und kreisförmig bis unregelmäßig oval geformt waren. Sie waren stark gewölbt mit gewellten Rändern. Die Pigmentierung war durchscheinend gelblich bis bräunlich. Die Zellen waren stäbchenförmig mit einer Länge von 1,5 - 2,9 µm und einer Breite von ca. 0,6 µm, Gram-negativ und unbeweglich (Abb. 31, B). In Flüssigkultur neigte der Stamm zur Flockenbildung.

Die Kolonien von D9-3 und D11-58 waren ca. 0,5 bis maximal 1 mm groß. Sie waren glatt, glänzend und durchscheinend gelblich pigmentiert. Junge Kolonien waren konvex und glattrandig, ältere stärker gewölbt und leicht ausgefranst. Die Zellen waren stäbchenförmig mit einer Länge von 1,1 - 1,9 µm und einer Breite von ca. 0,5 µm, teilweise beweglich und Gram-negativ (Abb. 31, C u. D).



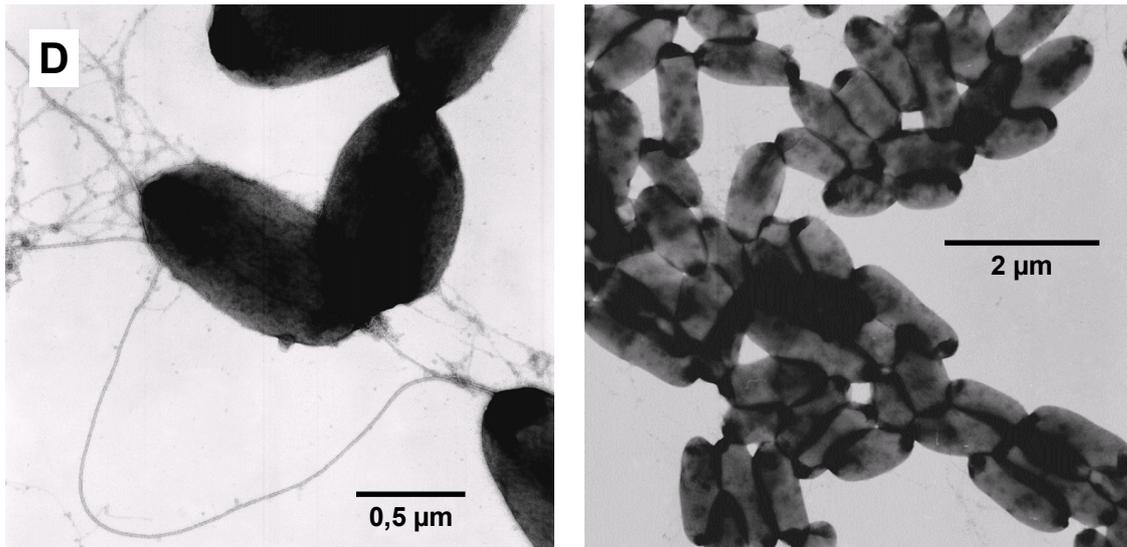


Abb. 31: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der 4 *Rhodobacter*-verwandten Spezies. A) D1-19, B) D5-41, C) D9-3 und D) D11-58.

3.2.2.4.3 Phylogenetische Analyse

Die 16S rRNA-Gensequenz von D2-3 (1352 bp) bildete zusammen mit ein paar Umweltklonen einen eigenen Zweig innerhalb der α -1 *Proteobacteria* (Abb. 32). Am ähnlichsten (99% Sequenzähnlichkeit) war ein nicht kultiviertes Bakterium aus dem Zebrafischdarm (Accession Number: DQ814256; Rawls et al., 2006). Bei den nächsten beschriebenen Verwandten handelt es sich um eine Gruppe von filamentösen Alphaproteobakterien, die in situ charakterisiert und mit dem Problem der Blähschlamm Bildung in Kläranlagen in Verbindung gebracht wurden (Levantesi et al., 2004). Die einzige kultivierte Spezies dieser Gruppe war „*Candidatus Alysiosphaera europea*“ (90,8% Sequenzähnlichkeit zu D2-3), die bisher allerdings nur in Cokultur mit einer Hefe kultiviert werden konnte (Snaidr et al., 2002). Weitläufiger verwandte Genera (< 88% Sequenzähnlichkeit) waren *Rhodothalassium*, *Azospirillum*, *Rhodocista*, *Stella*, *Iquilius*, *Tistrella*, *Acidiphilium*, *Craurococcus*, *Paracraurococcus* und *Roseococcus*.

Das Isolat D2-3 definiert somit eine neue Gattung innerhalb der Alphaproteobakterien. Im Folgenden wird es auch als „*Geminicoccus roseus*“ bezeichnet (siehe Kap. 3.2.2.4.10).

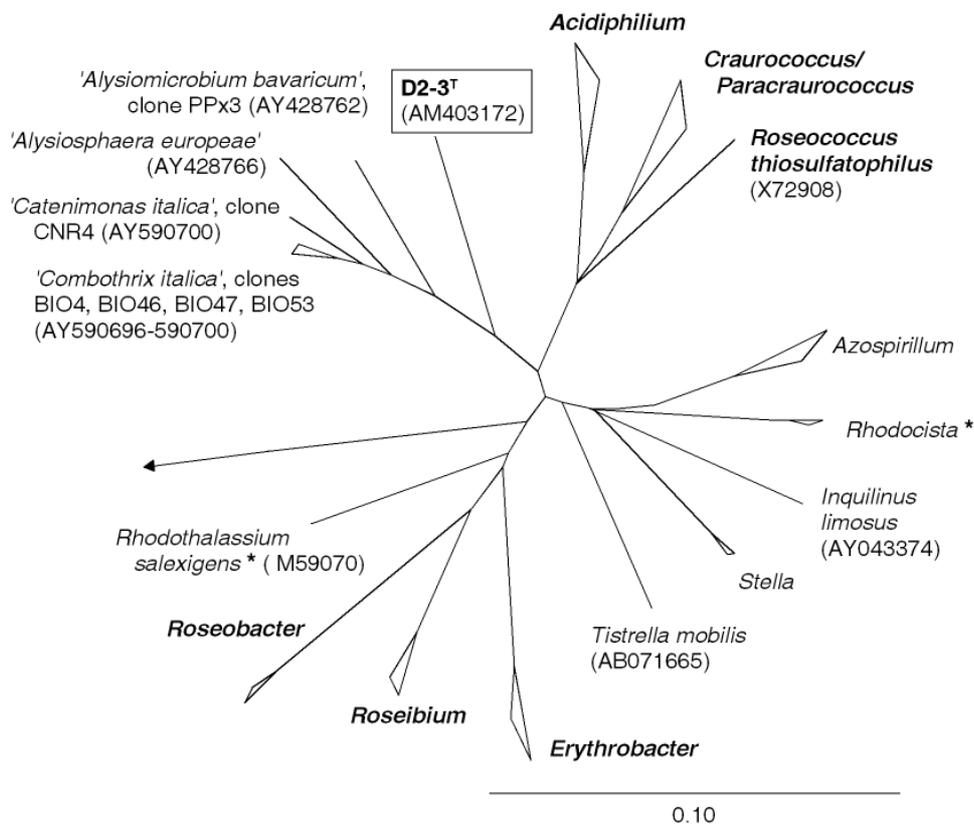


Abb. 32: Phylogenetische Position des Isolats D2-3 (bezeichnet als „*Geminicoccus roseus*“, siehe Kap. 3.2.2.4.10) basierend auf der Analyse von 16S rRNA-Gensequenzdaten (~ 1000 bp); Konsensusbaum aus mit Neighbor Joining-, Parsimony- und Maximum Likelihood-Methoden berechneten Bäumen. Aerobe, anoxigene Photrophe sind fett dargestellt, anaerobe, anoxigene Photrophe sind mit einem Stern markiert. Der Maßstab stellt einen Sequenzunterschied von 10% dar. Bei den Angaben in Klammern handelt es sich um die „Accession Numbers“ der verwendeten Sequenzen. Als „Outgroup“ diente *Escherichia coli* (Accession Number AE000406).

Die 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate D1-19 (1195 bp), D5-41 (1352 bp), D9-3 (1320 bp) und D11-58 (1336 bp) waren phylogenetisch am nächsten verwandt zu verschiedenen *Rhodobacteraceae*-Spezies (Abb. 33). Die Sequenz von D1-19 war mit 95,6 bzw. 95,4% am ähnlichsten zu der von *Rhodobacter azotoformans* und *R. sphaeroides*. Der nächste Verwandte von D5-41 war „*Rhodobacter litoralis*“ mit einer Ähnlichkeit von 97,3%, knapp gefolgt von *R. veldkampii* (Ähnlichkeit: 96,7%). Die beiden eng verwandten Stämme D9-3 und D11-58 waren am ähnlichsten zu einer Gruppe von Umweltklonen aus Belebtschlammproben (96,6 bis 97,8% Sequenzähnlichkeit). Die nächsten beschriebenen Verwandten waren *Rhodobacter massiliensis* und *Rhodovulum strictum* (beide 95,8%), dicht gefolgt von *Rhodobacter azotoformans* (95,3%).

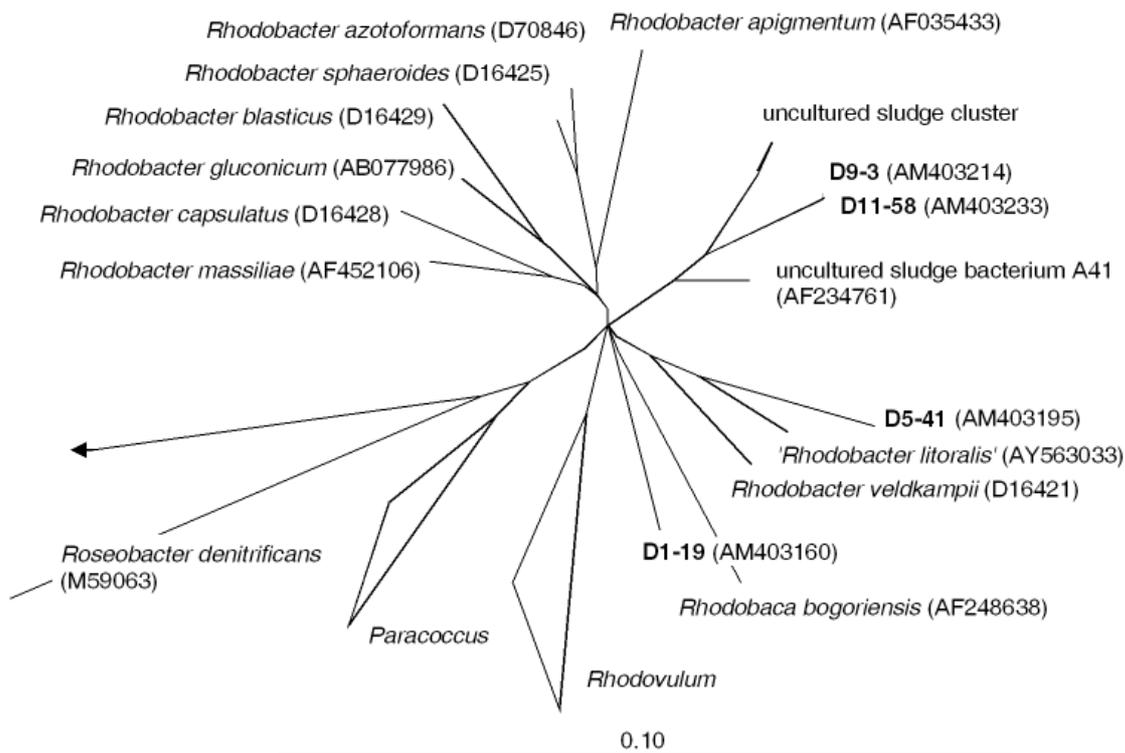


Abb. 33: Phylogenetische Position der *Rhodobacter*-verwandten Spezies D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 (bezeichnet als „*Rhodobacter aggregans*“, „*Rba. maritimus*“ und „*Rba. denitrificans*“, siehe Kap. 3.2.2.4.10) basierend auf der Analyse von 16S rRNA-Gensequenzdaten (~ 1300 bp); Konsensusbaum aus mit Neighbor Joining-, Parsimony- und Maximum Likelihood-Methoden berechneten Bäumen. Der Maßstab stellt einen Sequenzunterschied von 10% dar. Die „Accession Numbers“ der verwendeten Sequenzen sind in Klammern angegeben. Als „Outgroup“ diente *Rhodospirillum rubrum* (Accession Number: D30778).

3.2.2.4.4 Wachstumsparameter Temperatur, pH und Salzgehalt

Das Isolat D2-3 konnte von 15 - 45 °C und in einem pH-Bereich von 5,5 - 11,0 wachsen. Das Temperaturoptimum lag bei 30 - 35 °C, das pH-Optimum bei 8,0. Unter optimalen pH- und Temperaturbedingungen wurde eine OD₆₆₀ von 0,25 erreicht, die Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase lag bei 7,5 h (Abb. 34A).

Durch Inkubation der Bellco-Röhrchen im Liegen (= Vergrößerung der verfügbaren festen Oberfläche) konnte das Wachstum auf eine End-OD₆₆₀ von 0,30 gesteigert werden, was einer Erhöhung um 50% gegenüber aufrecht stehenden Röhrchen entspricht. Wachstumsrate und Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase wurden dadurch nicht gesteigert. Sie lagen sowohl bei den aufrecht stehenden als auch bei den liegenden Bellco-Röhrchen bei 0,14 bzw. 5 h. Wachstum am Licht bewirkte eine Steigerung auf eine End-OD₆₆₀ von 0,38 ge-

genüber den im Dunkeln (liegend) inkubierten Vergleichstubes, was eine nochmalige Steigerung um gut 25% bedeutet (Abb. 34B). Hier wurde auch eine etwas höhere Wachstumsrate von 0,16 bei einer Verdopplungszeit von 4,5 h erzielt.

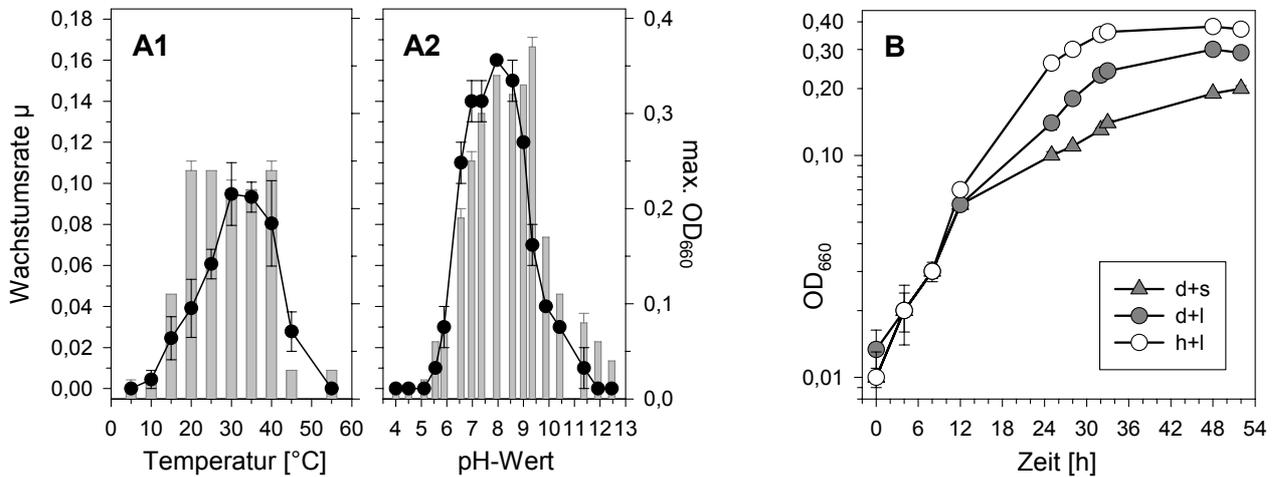


Abb. 34: A) Einfluss von Temperatur und pH und das Wachstum von D2-3 (●: Wachstumsrate μ , ■: maximale OD₆₆₀). B) Wachstumssteigerung durch Erhöhung der verfügbaren festen Oberfläche sowie Beleuchtung (d: dunkel, h: hell, s: stehend, l: liegend). Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

D1-19 wuchs in einem Temperaturbereich von 15 - 40 °C und bei einem pH von 6,0 bis 10,0. Optimales Wachstum fand bei 30 - 40 °C und pH 7,0 - 8,5 statt. Maximal wurde dabei eine OD₆₆₀ von ca. 0,5 erreicht, die Verdopplungszeit betrug 4 h. Bei D5-41 war bei Temperaturen von 15 - 40 °C und pH-Werten von 5,5 - 9,5 Wachstum zu beobachten. Das Wachstumsoptimum lag bei 25 - 40 °C und pH 6,5 - 8,5. Dabei wurde eine OD₆₆₀ von 0,4 - 0,5 erreicht, die Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase betrug 3,8 h. D9-3 und D11-58 konnten in einem Temperaturbereich von 10 - 40 °C und pH-Werten von 5,5 - 9,0 wachsen. Optimales Wachstum fand zwischen 30 und 40 °C und pH 6,5 und 7,0 statt. Dann wurden OD₆₆₀-Werte von 0,6 (D11-58) - 0,7 (D9-3) erreicht. Die maximale Verdopplungszeit betrug 4,6 h (D9-3) bzw. 4,8 h (D11-58) (Abb. 35).

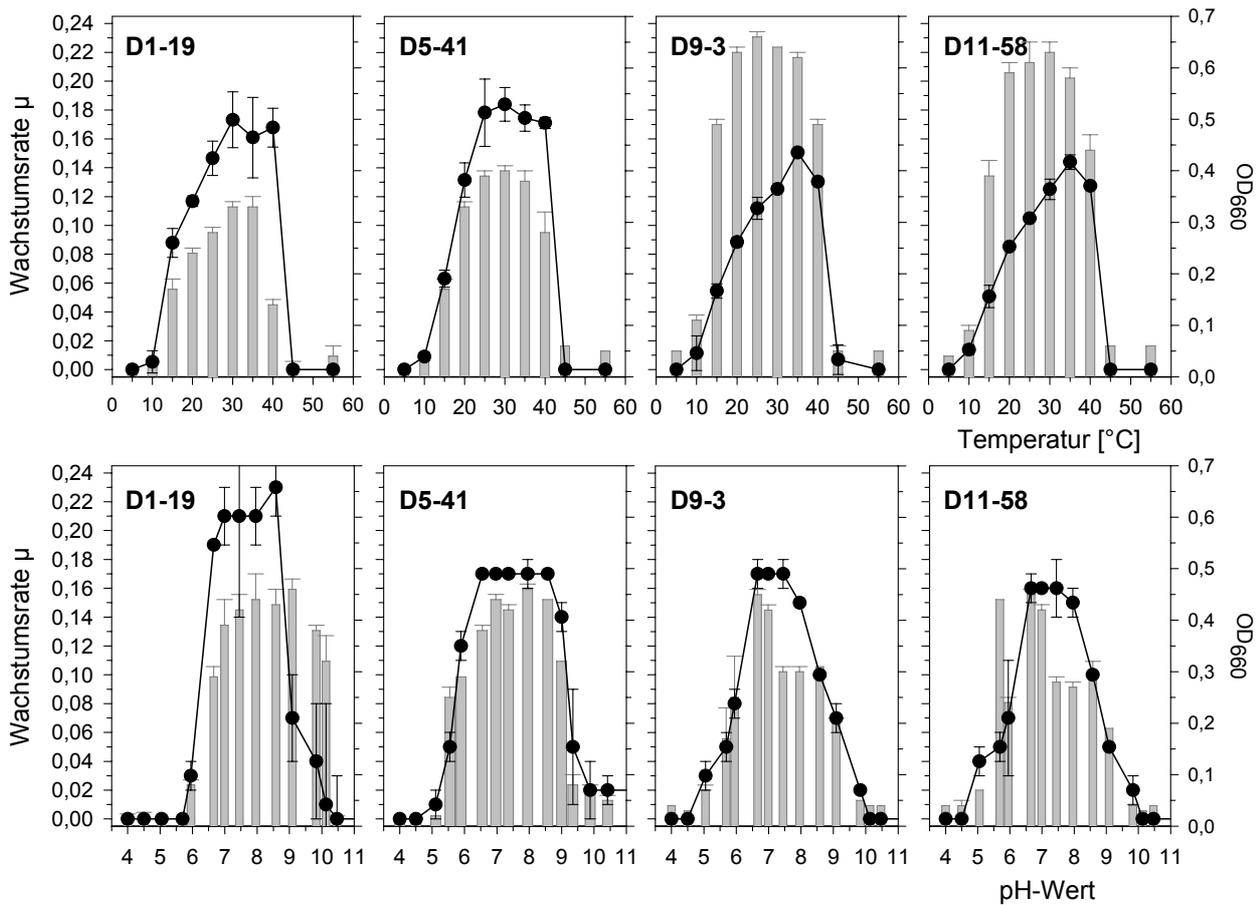


Abb. 35: Einfluss von Temperatur und pH auf das Wachstum von D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 (●: Wachstumsrate μ , ■: maximale OD_{660}). Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Die Reaktion auf unterschiedliche Salzgehalte war von Stamm zu Stamm sehr verschieden. D2-3 und D5-41 benötigten Seesalz, um wachsen zu können. Ohne Salz oder mit NaCl fand kaum bzw. gar kein Wachstum statt. Die anderen drei Isolate benötigten kein Salz im Medium, konnten aber auch bei Salzkonzentrationen von 5% noch wachsen (Tab. 29).

Tab. 29: Wachstum von D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 bei verschiedenen Salzgehalten (NaCl oder Rotes Meer Salz); -: kein Wachstum, (+) - +++: minimales bis sehr gutes Wachstum.

NaCl						Rotes Meer Salz					
[%]	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58	[%]	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58
0	(+)	++	(+)	++	++	0	+	++	(+)	++	++
0,25	-	++	-	++	+++	0,25	+++	+++	++	++	++
0,5	-	++	-	+++	+++	0,5	+++	+++	++	++	++
1,0	-	+++	-	+++	+++	1,0	+++	+++	+++	++	++
2,0	-	+++	-	+++	+++	2,0	++	++	++	+++	+++
3,0	-	+++	-	++	++	3,0	++	++	++	+++	+++
4,0	-	++	-	+	+	4,0					
5,0	-	+	-	+	+	5,0	+	+	++	+	+

3.2.2.4.5 Substrat- und Fermentationsproduktprofil

D2-3 konnte von den angebotenen Substraten einige Fettsäuren und Zucker verwerten (Tab. 30). Mit Aminosäuren fand kein Wachstum statt. Als terminaler Elektronenakzeptor diente O₂. Die *Rhodobacter*-verwandten Spezies wuchsen bevorzugt mit organischen Säuren und Aminosäuren, aber auch mit einigen Zuckern. Als terminale Elektronenakzeptoren konnten O₂, NO₃⁻ (D9-3, D11-58) und NO₂⁻ (D5-41, D9-3, D11-58) dienen. Bei keinem der fünf Isolate wurde die Fähigkeit zu fermentativem Wachstum nachgewiesen.

Tab. 30: Substratspektren der Isolate D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 (+: Substrat konnte verwertet werden, -: Substrat konnte nicht verwertet werden).

Substrat	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58
<i>Organische Säuren</i>					
Acetat	+	+	+	+	+
Butyrat	-	+	+	+	+
Citrat*	-	-	+	-	-
Fumarat	-	+	+	+	+
Lactat	+	+	+	+	+
Malat	-	+	+	+	+
Oxalat	-	-	-	-	-
Propionat	+	+	+	+	+
Pyruvat	+	-	-	-	-
Succinat	-	+	+	+	+

Substrat	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58
Tartrat	+	-	-	-	-
<i>Zucker und Alkohole</i>					
Amygdalin*	-	-	-	-	-
Arabinose*	+	-	-	-	-
Butanol	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	+	+
Ethanol	-	-	-	-	-
Fruktose	+	+	+	+	+
Glukose*	-	-	-	-	-
Inosit*	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	-	+	+
Mannose	+	-	-	+	+
Mannit*	-	-	-	-	-
Melibiose*	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	-	-
Propanol	+	+	-	-	-
Rhamnose*	-	-	-	+	+
Saccharose*	-	-	-	-	-
Sorbit*	-	-	-	-	-
Xylose	-	+	+	-	-
<i>Aminosäuren und andere Verbindungen</i>					
L-Alanin	-	+	+	+	+
L-Asparagin	-	+	-	-	-
L-Glutamat	-	+	+	+	+
Casamino Acids	-	+	+	+	+
Pepton	-	-	-	-	-

* mit API20E-Streifen (Biomérieux) durchgeführte Tests

3.2.2.4.6 Alternative Elektronenakzeptoren

Die beiden *Rhodobacter*-verwandten Stämme D9-3 und D11-58 konnten unter anoxischen Bedingungen Nitrat und Nitrit als alternative Elektronenakzeptoren verwenden. Übergangsweise wurde N₂O gebildet, das Endprodukt war jedoch N₂. Darüber hinaus wurden nach Beendigung des Wachstums geringe Mengen Nitrit und Ammonium im Medium festgestellt. D5-41 konnte mit Nitrit, nicht aber mit Nitrat, denitrifizieren. Auch hier wurde N₂ gebildet und es waren nach Versuchsende Spuren von Ammonium vorhanden. Die N₂O-Bildung wurde nicht überprüft.

D2-3 reduzierte Nitrat zu Nitrit, Wachstum war aber nicht feststellbar. D1-19 war nicht zu anoxischem Wachstum im Dunkeln fähig. Sulfat und Fe^{3+} wurden von keinem der Stämme verbraucht.

3.2.2.4.7 *Anaerobes phototrophes Wachstum*

Alle fünf Stämme zeigten unter anaeroben Bedingungen am Licht nur minimales Wachstum. Durch Sichtkontrolle wurden zwar leichte Trübung und/oder Flockenbildung festgestellt, jedoch war keine photometrisch messbare Erhöhung der OD_{660} zu verzeichnen. Auch die Ausbildung einer für phototroph wachsende Kulturen typischen Färbung (von beige-braun über olivgrün bis hin zu rot oder rosa; Imhoff, 2006) war nicht zu beobachten. Deshalb ist die Befähigung der Isolate zu anoxygener Photosynthese zumindest fraglich.

Allerdings wurden der Test auf phototrophes Wachstum nur mit dem DSMZ-Medium 27 (original Protokoll und modifizierte Variante; siehe Kap. 2.6.1.2.3 u. 2.6.1.2.4) durchgeführt, das nur eine sehr begrenzte Zahl möglicher Substrate (im Wesentlichen Acetat, Succinat und Ethanol) enthielt. Auf photoautotrophes Wachstum wurde gar nicht getestet. Letzteres könnte jedoch eine Rolle spielen, da bei zwei Isolaten (D1-19 und D5-41) mittels PCR zumindest ein RubisCO-Gen amplifiziert werden konnte. Bei den übrigen drei Isolaten fiel der Test mit den verwendeten Primern und unter den gewählten PCR-Bedingungen negativ aus. Ein Proteorhodopsin-Gen wurde unter den gewählten PCR-Bedingungen bei keinem der fünf Isolate gefunden.

3.2.2.4.8 *Cytochrome*

Die Redox-Differenzspektren von Membranfraktion und zellfreiem Extrakt des Isolats D2-3 weisen auf das Vorkommen von Cytochromen des Typs *a*, *b* und *c* hin (Abb. 36). Am deutlichen treten die für *b*-Cytochrome charakteristischen Absorptionsmaxima (430, 531, 563 nm) hervor. Die ausgezogene Schulter des γ -Peaks, sowie die Peaks bei ca. 520 und 550 nm deuten jedoch auch auf das Vorkommen von Cytochromen des Typs *a* bzw. *c* hin.

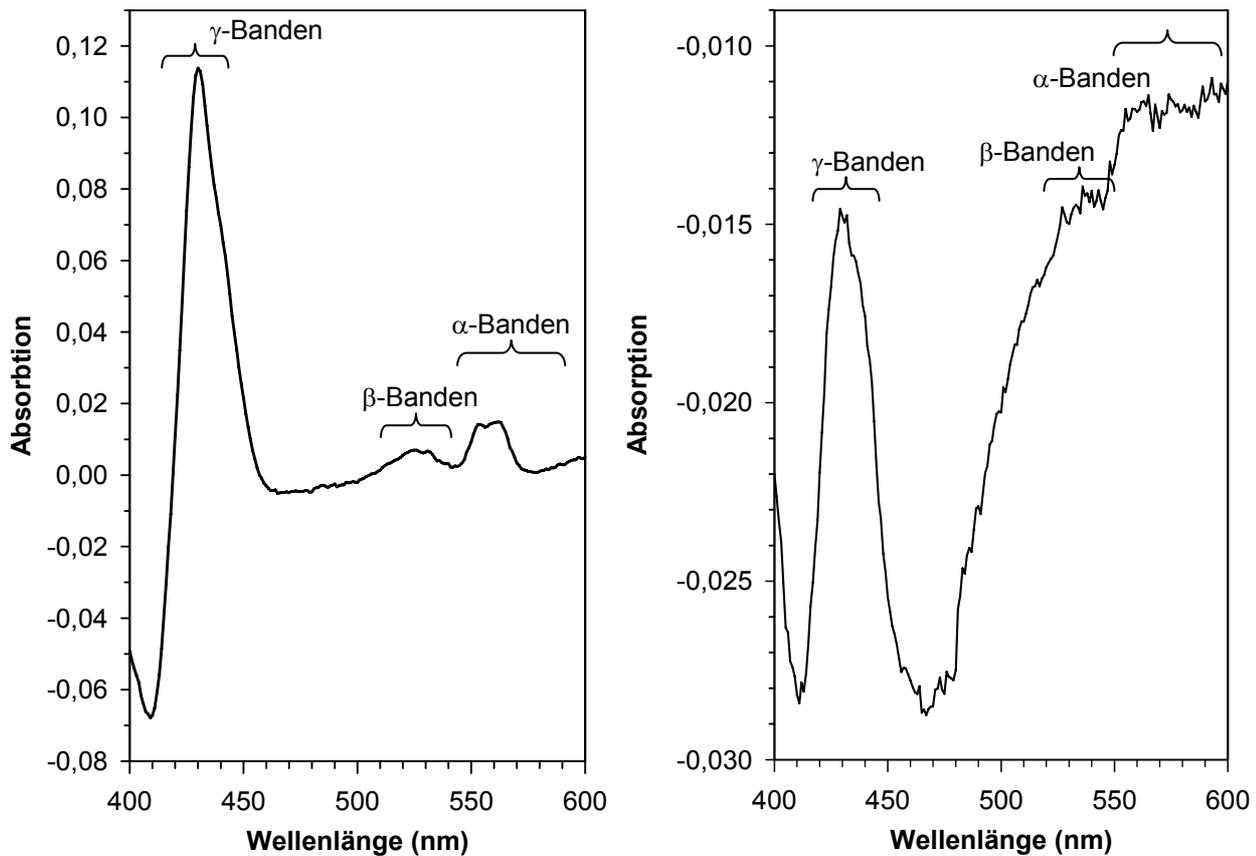


Abb. 36: Redox-Differenzspektren (A) der Membranfraktion und (B) des zellfreien Extrakts von Isolat D2-3.

3.2.2.4.9 Carotenoide und Bakteriochlorophyll *a*

Aerob am Licht kultiviert bildete das Isolat D2-3 eine rosa Färbung aus. Methanol/Aceton-Extrakte von aerob am Licht angezogenen Kulturen zeigten die für Carotenoide typischen Absorptionsmaxima im Bereich von 470 - 480, 498 und 520 - 530 nm (Abb. 37). Im Dunkeln gewachsene Kulturen waren hingegen nahezu farblos und die entsprechenden Absorptionsmaxima fehlten. Ein kleiner Peak bei 750 - 770 nm, der auf das Vorhandensein von Bakteriochlorophyll *a* hinweist, wurde dagegen sowohl in Methanol/Aceton-Extrakten von am Licht angezogenen Kulturen als auch in Extrakten von im Dunkeln angezogenen Kulturen beobachtet.

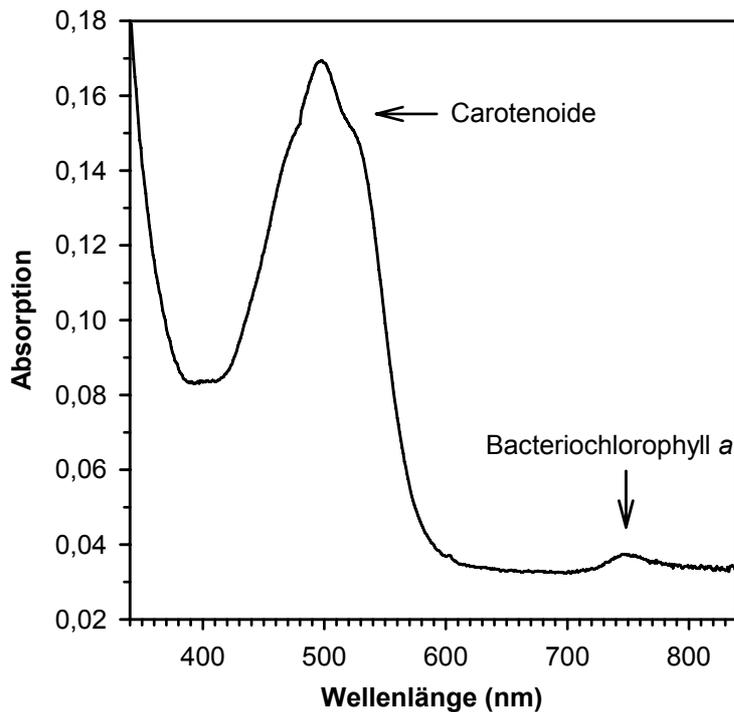


Abb. 37: Absorptionsspektrum der mit Methanol/Aceton extrahierten Pigmente von Isolat D2-3.

3.2.2.4.10 Weitere taxonomisch relevante Eigenschaften

Neben dem Test auf Katalase- und Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität wurden mit den API20E-Streifen (Biomérieux) noch verschiedene weitere Charakteristika der fünf Isolate ermittelt. Einen Überblick gibt Tabelle 31.

Tab. 31: Weitere Charakteristika der Isolate D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 (+: Reaktion positiv, -: Reaktion negativ).

Getestete Reaktion	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58
Beta-Galactosidase-Aktivität*	-	-	-	+	+
Arginin-Dihydrolase-Aktivität*	-	-	-	-	-
Lysin-Decarboxylase-Aktivität*	-	-	-	-	-
Ornithin-Decarboxylase-Aktivität*	-	-	-	-	-
H ₂ S-Bildung*	-	-	-	-	-
Urease-Aktivität*	+	+	+	-	-
Tryptophan-Desaminase-Aktivität*	-	-	+	+	+
Indol-Bildung*	-	-	-	-	-
Acetoin-Bildung* (Voges-Proskauer)	+	-	+	-	-
Gelatinase-Aktivität*	+	+	+	+	+

Getestete Reaktion	D2-3	D1-19	D5-41	D9-3	D11-58
NO ₂ ⁻ -Bildung*	+	-	-	-	-
N ₂ -Bildung*	-	-	-	+	+
Cytochrom c-Oxidase-Aktivität	-	-	+	+	+
Katalase-Aktivität	+	+	+	+	+

* mit API20E-Streifen (Biomérieux) durchgeführte Tests

3.2.2.4.11 G+C-Gehalt

Der G+C-Gehalt des Isolats D2-3 betrug $60,3 \pm 0,1$ mol%. Von den übrigen Isolaten wurde der G+C-Gehalt noch nicht bestimmt.

3.2.2.4.12 Taxonomie

Für das Isolat D2-3 wird die Gattung *Geminicoccus* (Ge.mi.ni.coc'cus. L. masc. Subst. *geminus*, Zwilling; N. L. masc. Subst. *coccus* Korn, Beere; N. L. masc. Subst. *Geminicoccus*, zwei kugelförmige Zellen), die Art *Geminicoccus roseus* (L. masc. Adj. *roseus*, rosenfarben, rosa) vorgeschlagen. Für die *Rhodobacter*-verwandten Isolate sind die Namen *Rhodobacter aggregans* (ag'gre.gans. L. V. *aggregare*, zusammenkleben, -ballen; L. Part. präs. *aggregans*, Ansammlungen, Aggregate bildend) (D1-19), *Rhodobacter maritimus* (L. masc. Adj. *maritimus*, aus dem Meer, marin, maritim) (D5-41) und *Rhodobacter denitrificans* (de.ni.tri'fi.cans. L. Präp. *de* weg von; L. Subst. *nitrum* Soda; N.L. von *denitrifico* denitrifizieren; N. L. Part. präs. *denitrificans* denitrifizierend) (D9-3 und D11-58) vorgesehen.

3.2.3 Untersuchung der Diversität nitratreduzierender und denitrifizierender Spezies anhand der funktionellen Gene *narG* und *nosZ*

Zur Untersuchung der kultivierungsunabhängigen Diversität nitratreduzierender und denitrifizierender Organismen wurden die funktionellen Markergene *narG* und *nosZ* gewählt. Das *narG*-Gen codiert für die katalytische Untereinheit der Nitratreduktase, die die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit katalysiert. Das *nosZ*-Gen codiert für die katalytische Untereinheit der N₂O-Reduktase, die für die Umsetzung von N₂O zu N₂ zuständig ist. Durch die Wahl eines Genmarkers ganz am Anfang und ganz am Ende der Denitrifikationsabfolge sollte einerseits eine möglichst große Bandbreite nitratreduzierender Organismen (inklusive DNRA) erfasst werden. Zum anderen sollten auch spezifisch Denitrifikanten identifiziert werden, die Nitrat vollständig bis zum N₂ reduzieren. Um zwischen Genbibliotheken und Isolaten vergleichen zu können, wurden auch *narG*- und *nosZ*-Genfragmente aus den gewonnenen Reinkulturen amplifiziert und sequenziert.

3.2.3.1 Nitratreduzierende und denitrifizierende Kulturen

3.2.3.1.1 DSMZ-Kulturen

Von den insgesamt 22 DSMZ-Kulturen (siehe Kap. 2.6.1.1, Tab. 5) gelang die Amplifikation eines *narG*-Genfragments nur bei *Alcaligenes defragrans*, *Comamonas nitratorans*, *Desulfuromusa kysingii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Thauera aromatica* und *Thiomicrospira denitrificans*.

3.2.3.1.2 Isolate aus der Aquakultur

Es wurde versucht von jeder der 41 Isolatgruppen mindestens ein *narG*-Genfragment und von allen Gruppen mit Denitrifikanten auch mindestens ein *nosZ*-Genfragment zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dies geschah mittels PCR direkt von den Zellkolonien (siehe Kap. 2.7.5.2.1) unter Verwendung der PCR-Programme *narG*-BK bzw. *nosZ*-NR und *nosZ*-BK (siehe Kap. 2.7.5.2.2). Bei vielen Isolaten musste vor dem Sequenzieren das gewünschte Fragment gelelektrophoretisch von Nebenprodukten getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden (siehe Kap. 2.7.3).

Trotz wiederholter Versuche konnte nur von ca. 50% der Reinkulturen ein *narG*-Genfragment gewonnen werden (Tab. 32). Vor allem für *Bacteroidetes* und *Firmicutes* sowie einen Teil der α -*Proteobacteria* schlug die Amplifikation von *narG*-Genfragmenten fehl. Für *nosZ* gelang die Amplifikation nur bei den verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies, bei *Pseudoxanthomonas mexicana* und bei *Aquimonas voraii* (alles γ -Proteobakterien), sowie bei *Granulella daejonensis* (α -Proteobakterium), was ebenfalls einem Anteil von ca. 50% der nachweislich denitrifizierenden Reinkulturen entspricht.

Tab. 32: Aus eigenen Isolaten gewonnene *narG*- und *nosZ*-Genfragmente. Dargestellt sind nur diejenigen Isolate einer Gruppe, die für die Amplifikation von *narG*- und *nosZ*-Genen herangezogen wurden (x: Amplifikation erfolgreich, -: Amplifikation nicht erfolgreich, o: kein Versuch zur Amplifikation unternommen; Hinterlegung: hellgrau: N_2 -Bildung nachgewiesen, mittelgrau: N_2O -Bildung nachgewiesen, gestrichelt: N_2 -Bildung unter bestimmten Bedingungen (weiß-hellgrau) bzw. N_2O und N_2 nachgewiesen (hell- und mittelgrau).

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	16S rRNA-Sequenz-ähnlichkeit	Amplifikation funktioneller Gene	
				<i>narG</i>	<i>nosZ</i>
Alphaproteobacteria					
1	D5-11.1	<i>Marteella mediterranea</i>	99%	x	o
2	D9-21	<i>Ochrobactrum aqua-oryzae</i>	100%	x	-
3	D2-13b	<i>Shinella granulii</i>	99%	-	-
	D5-25	"	98%	-	x
4	D11-69	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	96%	-	o
5	D5-18	<i>Pseudaminobacter</i> sp. W11-4	97%	-	o
6	D12-37.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. GWS-BW-H238	99%	-	o
7	D11-73	<i>Devosia riboflavina</i>	96%	-	o
8	D1-6	<i>Paracoccus solventivorans</i>	97%	-	o
9	D3-7bb	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	95%	-	o
10	D5-6.1	<i>Rhodobacter litoralis</i>	97%	-	o
	D5-41	"	97%	-	o
11	D9-3	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	94%	-	-
	D11-58	"	95%	-	-
12	D11-55	<i>Stappia stellulata</i>	98%	-	-
13	D2-3	" <i>Cand. Alysiosphaera europeae</i> "	90%	x	o
14	D1-34	<i>Tistrella mobilis</i>	99%	x	o
Betaproteobacteria					
15	D3-13.1	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	97%	x	o
	D11-24b2	"	98%	x	o

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	16S rRNA- Sequenz- ähnlichkeit	Amplifikation funktioneller Gene	
				<i>narG</i>	<i>nosZ</i>
16	D9-5	<i>Bordetella trematum</i>	99%	-	0
17	D8-13b	<i>Massilia timonae</i>	99%	x	-
18	D1-68	<i>Denitromonas indolicum</i>	99%	-	-
	D2-1	"	99%	x	-
	D12-45.1	"	99%	x	0
Gammaproteobacteria					
19	D10-48	<i>Rheinheimera baltica</i>	97%	-	0
20	D7-10	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99%	x	-
21	D7-21	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	97%	x	x
22	D3-15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	x	x
23	D6-18	<i>P. stutzeri, P. chloritidismutans</i>	99%	x	x
24	D1-57	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	x	x
	D1-58	"	"	x	x
	D3-26	"	"	x	x
	D6-6	"	"	x	x
25	D2-17	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99%	x	0
26	D3-23	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99%	-	-
	D5-19	"	99%	x	0
	D7-5	"	99%	x	x
	D11-27	"	99%	-	0
27	D9-22	<i>Aquimonas voraii</i>	99%	x	-
	D11-21	"	99%	x	x
Bacteroidetes					
28	D12-42.1	<i>Flexibacter aggregans</i>	99%	-	-
29	D11-24b1	<i>Cytophaga sp.</i>	94%	-	0
30	D10-6.1	<i>Muricauda aquimarina, M. flavescens</i>	97%	-	0
31	D7-13	<i>Vitellibacter vladivostokensis</i>	99%	-	0
Firmicutes					
32	D1-61.1	<i>Enterococcus sanguinicola</i>	99%	-	0
33	D1-54	<i>Bacillus firmus</i>	99%	-	0
34	D1-52	<i>Bacillus cereus, B. thuringiensis, ...</i>	99%	-	0
Actinobacteria					
35	D9-7	<i>Mycobacterium peregrinum, ...</i>	99%	x	0
36	D6-28	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	96%	x	0
37	D2-4	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98%	x	0
	D3-18	<i>Rhodococcus zopfii, R. phenolicus</i>	99%	x	0

Gruppe	Isolat	Nächster Verwandter	16S rRNA- Sequenz- ähnlichkeit	Amplifikation funktioneller Gene	
				<i>narG</i>	<i>nosZ</i>
38	D1-15	<i>Microbacterium aurum</i>	99%	x	o
39	D7-38	<i>Microbacterium chocolatum</i>	99%	o	o
40	D9-23	<i>Microbacterium koreense</i>	98%	x	o
41	D1-50	<i>Leucobacter chromiireducens</i>	99%	-	o

3.2.3.2 Umweltproben aus der marinen Aquakultur

3.2.3.2.1 *narG*

Da es in allen drei Teilsystemen anaerobe Bereiche gab, in denen bevorzugt Nitratreduktion stattfinden konnte, wurde für jeden der drei Biofilter (TF, DB, FBR) eine *narG*-Genbibliothek angelegt.

3.2.3.2.1.1 Aufbau und Screening der Genbibliotheken

Die der Klonierung vorausgehende DNA-Extraktion erfolgte mit Methode A (siehe Kap. 2.7.1. 1). Die *narG*-Genfragmente aus den drei Proben wurden parallel mit verschiedenen Annealing-Temperaturen (*narG*-BK 50/46, 52/48, 54/50 und 56/52) amplifiziert und die Produkte für die anschließende Klonierung gepoolt.

Insgesamt wurden 403 insertpositive Klone gescreent. 99 davon stammten aus dem TF, 178 aus dem DB und 126 aus dem FBR. Um den Sequenzieraufwand zu verringern, wurde mittels RFLP-Analyse (siehe Kap. 2.7.8) auf redundante Klone gescreent (Abb. 38). Von jeder RFLP-Gruppe wurden nur einige ausgewählte Klone sequenziert. Die Ähnlichkeit der sequenzierten Klone einer RFLP-Gruppe untereinander betrug auf Nukleinsäureebene meist 97 bis knapp 100%, in einigen wenigen Fällen waren es nur 96%. Eine Gruppe beinhaltete zwei Ausreißer mit nur 81 - 83% Ähnlichkeit zum Rest der Gruppe. Zwischen nahe verwandten, am RFLP-Muster aber deutlich voneinander zu unterscheidenden Gruppen bestand oft ein vergleichbarer oder sogar noch geringerer Sequenzunterschied. Gegebenenfalls wurden solche Gruppen für die weitere Auswertung zusammengefasst.

Zusammengenommen spricht dies dafür, dass das HaeIII-Screening für das Herausfinden redundanter Klone (mit einer Ausnahme) geeignet und in den meisten Fällen höher auflösend als erforderlichlich war.



Abb. 38: Beispiel für die RFLP-Analyse insertpositiver *narG*-Klone aus dem FBR. M: Längenmarker (1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp), die Nummern von 1 bis 6 markieren verschiedene RFLP-Muster.

3.2.3.2.1.2 Abschätzung der Zahl der OTUs

Die Coverage (C) lag bei allen drei Genbibliotheken über 90% (Tab. 33). In TF und DB wurden 18 bzw. 24 verschiedene OTUs gefunden, wobei eine OTU hier einem RFLP-Muster entspricht. Im FBR waren es nur 10. Die Schätzparameter Chao1 und Fit-Parameter A lieferten etwa gleich hohe (FBR) bzw. etwas höhere (TF, DB) Werte.

Tab. 33: Analyse der *narG*-Genbibliotheken aus den 3 Teilsystemen TF, DB und FBR. Eine OTU entspricht hier einem RFLP-Muster.

Herkunft	Typ	N _{OTUs} (N _{Klone})	Coverage [%]	Chao1	Fit-Parameter A
TF	<i>narG</i>	18 (99)	93	23	21
DB	<i>narG</i>	24 (178)	95	31	27
FBR	<i>narG</i>	10 (126)	98	10	11

Die kumulative Anzahl der OTUs wurde als Funktion der gescreenten Klone aufgetragen (Abb. 39). Der abflachende Verlauf der Kurven deutet - wie die hohen Coverage-Werte - darauf hin, dass die Diversität aller drei Genbibliotheken zum Großteil erfasst wurde. Ferner scheint die

detektierte *narG*-Gendiversität in der Bibliothek aus dem FBR sehr viel geringer zu sein als in TF und DB.

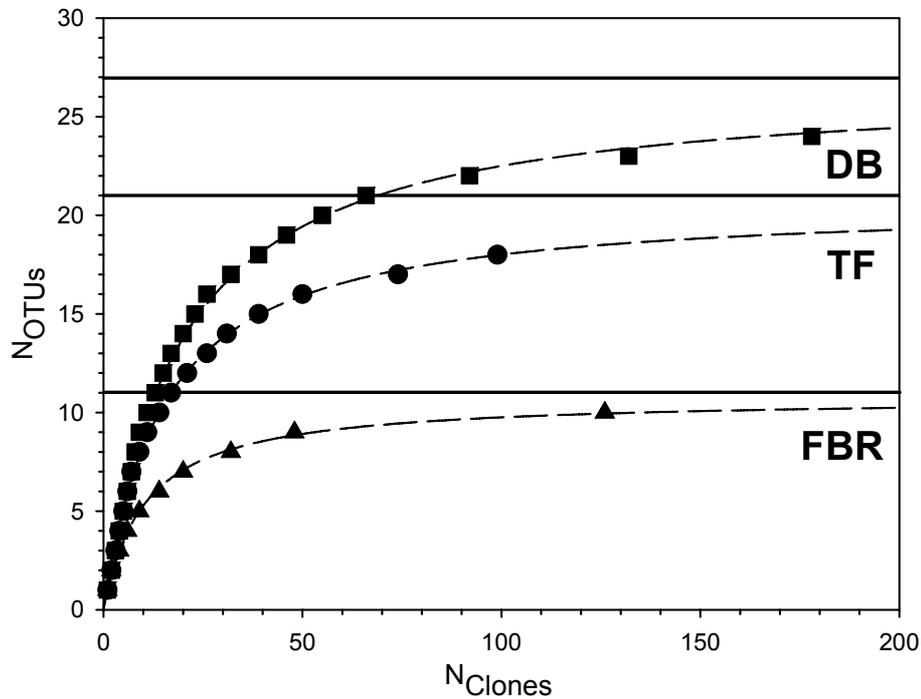


Abb. 39: Anzahl der in den *narG*-Genbibliotheken detektierten OTUs in Abhängigkeit von der Zahl der gescreenten Klone. Die Asymptoten der Regressionen (deterministisches Modell, siehe Kap. 2.8.1.1) stellen einen Schätzwert für die maximal zu erwartende Anzahl an OTUs dar und sind als horizontale Linien aufgetragen. Eine OTU entspricht einem RFLP-Muster.

3.2.3.2.1.3 Rarefaction-Analyse

Beim Vergleich der *narG*-Diversität in den Genbibliotheken aus den drei Teilsystemen mit Hilfe der Rarefaction-Analyse (Abb. 40) wurde zwischen TF und DB auf einem Signifikanzniveau von 95% kein Unterschied gefunden. Der FBR unterschied sich dagegen von den anderen beiden Biofiltern durch eine deutlich geringere *narG*-Gendiversität. Auch hier deutet das allmähliche Abflachen der Kurven auf einen ausreichenden Probenumfang hin.

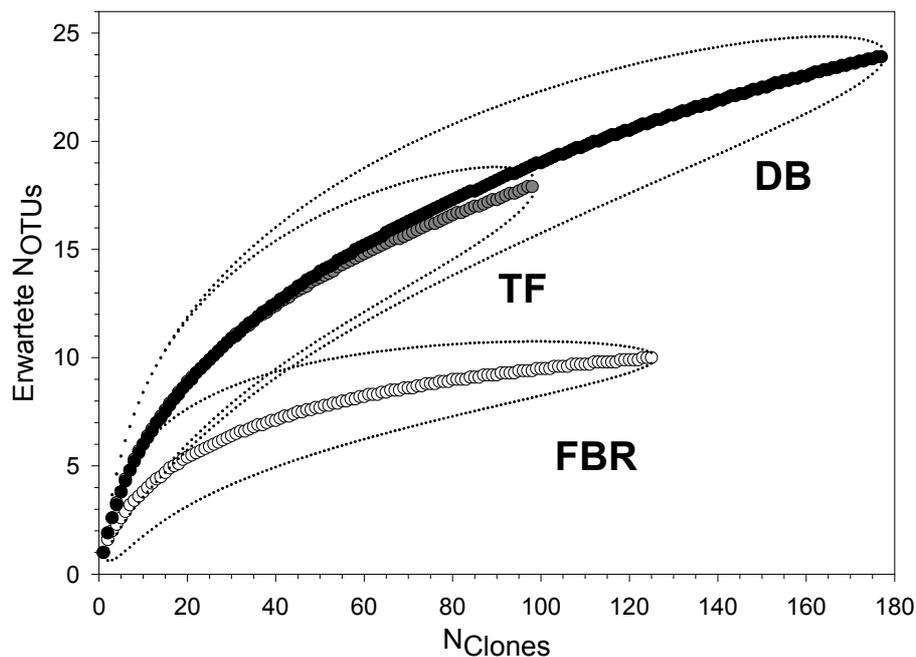


Abb. 40: Rarefaction-Kurven für die *narG*-Genbibliotheken aus TF, DB und FBR. Die Punktwolken um die Kurven stellen die 95%-Konfidenzintervalle dar. Die der Berechnung zugrunde liegende OTU-Definition ist die Einteilung nach RFLP-Mustern.

3.2.3.2.1.4 Libshuff-Vergleich

Um Genbibliotheken unabhängig von einer OTU-Definition miteinander vergleichen zu können, wurde eine Analyse mit dem Software-Tool \mathcal{J} -Libshuff durchgeführt (siehe Kap. 2.8.1.3).

Die *narG*-Genbibliotheken aller 3 Teilsysteme unterschieden sich hoch signifikant voneinander. Für alle Einzelvergleiche war $p < 0,0001$. Demnach ergab sich für einen paarweisen Vergleich von zwei Genbibliotheken eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,0002$, beim Vergleich aller drei Bibliotheken eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,0006$, dass die Bibliotheken identisch sind. Bei den homologen Kurven lag die Coverage schon bei sehr geringem evolutivem Abstand nahe 1, was bedeutet, dass die Diversität der einzelnen Bibliotheken weitestgehend erfasst wurde. Die heterologen Kurven erreichten meist schnell eine Coverage von ca. 50%. Zur Deckung kamen homologe und heterologe Kurven aber meist erst bei einem evolutiven Abstand von ca. 0,4 (Abb. 41, B) bis 0,7 (Abb. 41, C). Das zeigt, dass die einzelnen Bibliotheken eine große Zahl (40 - 50%) stark unterschiedlicher *narG*-Sequenzen (30 bis 60% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene) enthielten. Eine Ausnahme stellten die Vergleiche von FBR mit FBR+TF (Abb. 41, D) und von FBR mit FBR+DB (Abb. 41, F) dar. Dies lässt sich mit der hohen Abundanz eines

bestimmten Kloninserts (78 von insgesamt 126 FBR-Klonen) erklären, das sowohl die FBR-Genbibliothek als auch die kombinierten Bibliotheken FBR+TF und FBR+DB dominierte.

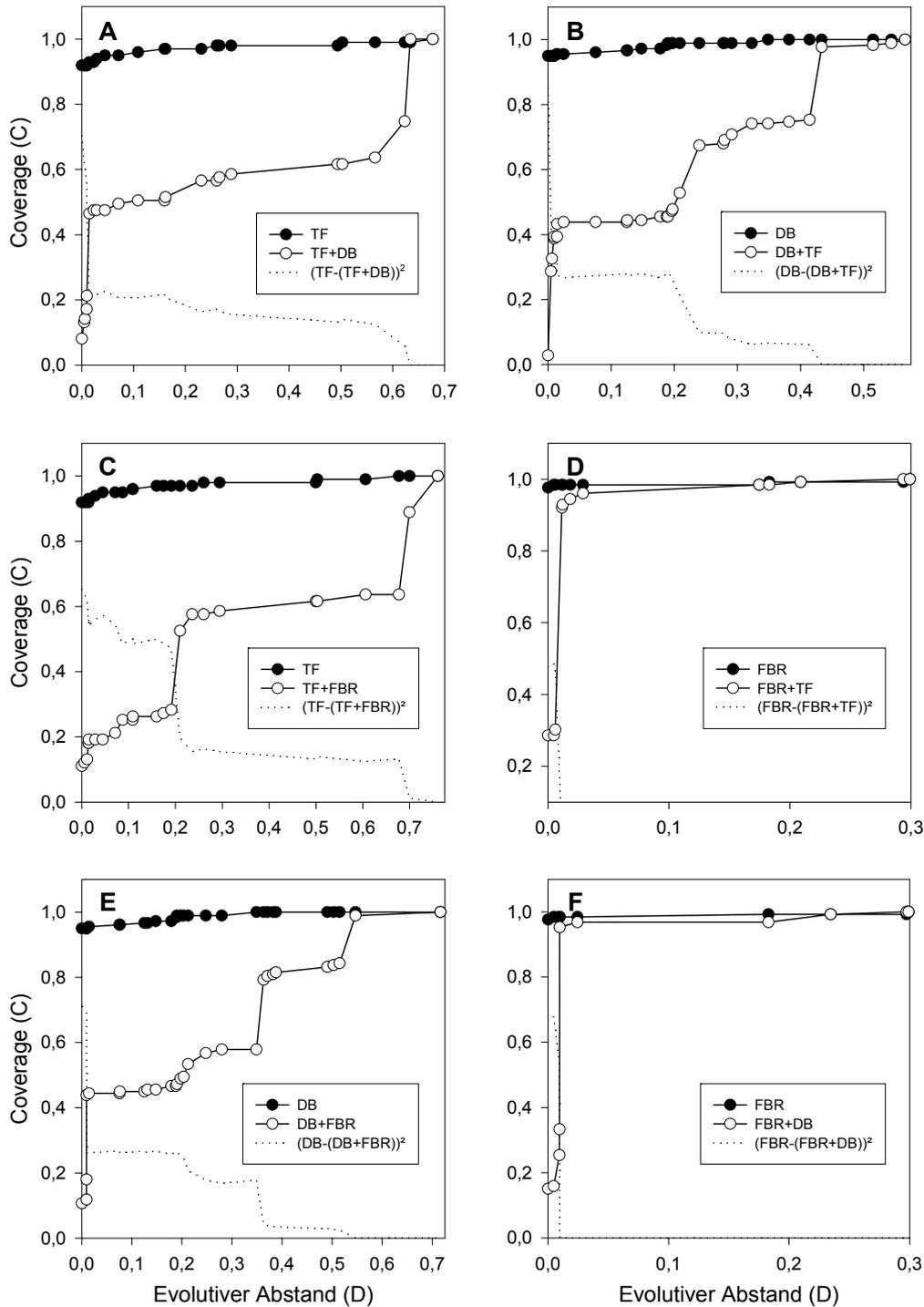


Abb. 41: Libshuff-Vergleich der *narG*-Genbibliotheken aus TF, DB und FBR. A-F: Paarweiser Vergleich von homologer und heterologer Coverage, C. Die der Analyse zugrunde liegende „Distance Matrix“ wurde mit dem Softwareprogramm ARB auf Basis der Aminosäuresequenz nach der Neighbor-Joining-Methode mit Kimura-Korrektur berechnet. Sie entspricht dem in den Diagrammen dargestellten evolutiven Abstand, D. Bei allen Vergleichen sind homologe und heterologe Kurve signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$).

3.2.3.2.1.5 Phylogenetische Analyse

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen *narG*-Gensequenzen stellen ein ca. 700 bp langes Fragment des vollständigen *narG*-Gens (ca. 3,7 - 3,9 kb) dar. Da sich dieses Teilstück als zu kurz für eine stabile Stammbaumberechnung erwies (Daten nicht gezeigt), wurden zunächst ausschließlich auf Vollsequenzen basierende Bäume berechnet. Anschließend wurden dem Konsensusbaum die Teilsequenzen von Klonen und Isolaten hinzugefügt, ohne die Baumtopologie zu verändern (siehe Kap. 2.7.10). Auf Basis von Nukleinsäuren unter Verwendung eines Wobble-Filters (siehe Kap. 2.7.10) berechnete Bäume unterschieden sich in ihrer Topologie nicht von auf Aminosäureebene berechneten Bäumen (Daten nicht gezeigt). Dies legitimiert die aus „ARB-technischen Gründen“ vorteilhafte Verwendung von Nukleinsäuresequenzen unter Ausschluss der dritten Base jedes Codons für die phylogenetische Analyse eines funktionellen Gens.

Die aus allen drei Biofiltern (TF, DB und FBR) erhaltenen Klone konnten zu 31 verschiedenen Clustern mit einer Sequenzähnlichkeit von $\geq 90\%$ auf Aminosäureebene zusammengefasst werden (Abb. 42). 5 der Cluster (= 16%) enthielten Sequenzen aus allen drei Teilsystemen, 2 (= 7%) beherbergten Sequenzen aus zwei verschiedenen Teilsystemen. Der Großteil (24 Stück bzw. 77%) umfasste jedoch nur Sequenzen aus jeweils einem Teilsystem.

Die einzelnen Kloncluster zeigten mehr oder weniger große Ähnlichkeit zu *narG*-Sequenzen beschriebener Spezies innerhalb der α -, β -, γ -, δ - oder ϵ -*Proteobacteria*, sowie der *Actinobacteria*. Zu der *Firmicutes* gehörige Sequenzen wurden nicht gefunden. Auffällig war, dass innerhalb der γ -*Proteobacteria* fast nur Klone aus dem DB zu finden waren, bei den *Actinobacteria* mit einer Ausnahme (Cluster 27) nur Klone aus dem TF. Dagegen waren bei den α - und β -*Proteobacteria* Klone aus allen Teilsystemen gleichermaßen vertreten.

Ähnlichkeiten zu bekannten Spezies von $\geq 90\%$ auf Aminosäureebene traten nur bei Cluster 3 (99 - 100% Ähnlichkeit zu *Thiomicrospira denitrificans*), 7 (maximal 96% Ähnlichkeit zu *Pseudomonas*-Isolaten; 94% Ähnlichkeit zu *Pseudomonas* sp. M1), 23 (90% Ähnlichkeit zu *Denitromonas*-Isolaten D2-1 und D12-45.1), 26 (94% Ähnlichkeit zu *Microbacterium* sp. D1-15) und 28 (97% Ähnlichkeit zu *Mycobacterium* sp. D9-3) auf.

Eine taxonomische Zuordnung aufgrund von *narG*-Gensequenzähnlichkeiten ist jedoch mit Vorsicht zu behandeln. Denn wie der Stammbaum (Abb. 42) zeigt, ist z. B. keine klare Trennung zwischen α - und β -Proteobakterien ersichtlich. Die zu den ϵ -*Proteobacteria* gehörige Spezies *Thiomicrospira denitrificans* kommt innerhalb der γ -*Proteobacteria* zu liegen, während die δ -proteobakteriellen Spezies *Desulfuromusa kysingii*, *Aneromyxobacter dehalogenans*, *Geobacter*

lovleyi und *G. metallireducens* mit der tiefabzweigenden Art *Thermus thermophilus* und den Nitritoxidierer-Genera *Nitrobacter* (α -*Proteobacteria*) und *Nitrococcus* (γ -*Proteobacteria*) clustern.

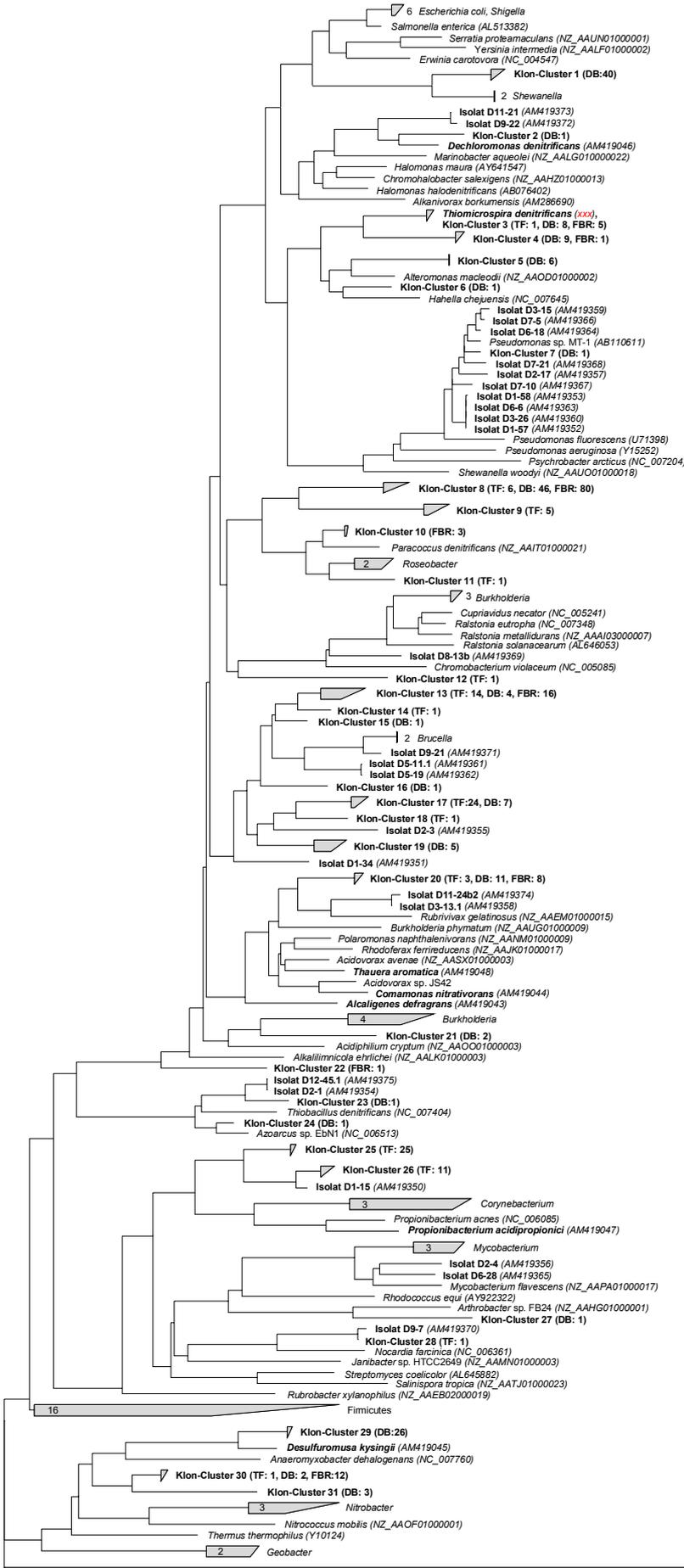


Abb. 42: Konsensusbaum vollständiger und partieller narG-Gensequenzen. Als Grundlage diente ein mit der Tree-Puzzle-Methode ausschließlich aus Vollsequenzen berechneter Baum, dem die Teilsequenzen hinzugefügt wurden, ohne die Baumtopologie zu verändern. Alle Berechnungen wurden auf Nukleinsäureebene unter Verwendung eines Wobble-Filters durchgeführt. Sequenzen oder Sequenzgruppen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sind fett gedruckt. Im einzelnen handelt es sich um Sequenzen, die aus von der DSMZ bezogenen Reinkulturen amplifiziert wurden, um Sequenzen von eigenen Isolaten (als „Isolat“ gekennzeichnet), sowie um Klone aus TF, DB und FBR (zu Clustern mit $\leq 10\%$ Sequenzunterschied auf Aminosäureebene zusammengefasst und als „Klon-Cluster“ gekennzeichnet). Von jedem Kloncluster wurden - soweit vorhanden - für die Darstellung drei repräsentative Sequenzen ausgewählt. Die Angaben in Klammern stellen bei Datenbanksequenzen und eigenen Sequenzen von Reinkulturen die „Accession Numbers“ dar, bei den Klonclustern geben sie Auskunft über Herkunft und Anzahl der in einem Cluster zusammengefassten Klone. Maßstab: 10% Sequenzunterschied.

3.2.3.2.2 *nosZ*

Eine *nosZ*-Genbibliothek wurde, um den Arbeitsaufwand im Rahmen zu halten, nur für eines der drei Teilsysteme angelegt (Rezakhani, unveröffentlicht). Die Wahl fiel auf eine Probe aus dem DB, da hier die meiste Denitrifikationsaktivität zu erwarten war.

3.2.3.2.2.1 *Abschätzung der Zahl der OTUs*

Da das RFLP-Screening für die *nosZ*-Genfragmente nicht richtig funktionierte, wurde eine Vielzahl von Klon-Inserts (ca. 90 Stück) vollständig sequenziert. Die Sequenzen wurden in ARB importiert, in Aminosäuresequenzen übersetzt und aligned. Anschließend wurde mit den Klonsequenzen (auf Aminosäureebene) eine „Similarity Matrix“ errechnet und mit dem Software-Tool DOTUR analysiert (Tab. 34).

Basierend auf einem maximalen evolutiven Abstand von 1% ergab sich bei einer Anzahl von 33 OTUs eine Coverage von 75%, während die geschätzte Anzahl an Genotypen von 40 bis 93 reichte. Bei einem maximalen evolutiven Abstand von 10% ließen sich die Klonsequenzen zu 17 OTUs zusammenfassen. Die Coverage betrug dann 93%, die geschätzte Anzahl von Genotypen reichte von 18 - 23.

Tab. 34: Mit DOTUR ermittelte Anzahl an OTUs, Coverages sowie verschiedene Schätzparameter der *nosZ*-Genbibliothek aus dem DB bei einem maximalen evolutivem Abstand (D) von 1 bzw. 10% auf Aminosäureebene.

D^a (%)	Anzahl der OTUs	C^b (%)	Geschätzte Anzahl von Genotypen ^c		
			ACE	Boot	Chao
≤ 1	33	75	93	40	67
≤ 10	17	93	22	18	23

^a D = evolutiver Abstand in %

^b C = Coverage der Genbibliothek in %

^c durch verschiedene Schätzparameter ausgedrückt; ACE = "abundance-based coverage estimator", Boot = "Bootstrap", Chao = "bias-corrected Chao1".

Analog zur Auswertung der *narG*-Genbibliotheken (siehe Kap. 3.2.3.2.1.2) wurde für diese beiden OTU-Definitionen zusätzlich die kumulative Anzahl der OTUs als Funktion der gescreenten Klone aufgetragen und durch Anpassung einer Hyperbel der Fit-Parameter A bestimmt (Abb. 43). Für $D \leq 1\%$ belief sich die geschätzte Anzahl an OTUs auf 52, für $D \leq 10\%$ auf 20, was in den Bereich der mit DOTUR berechneten Schätzparameter fällt.

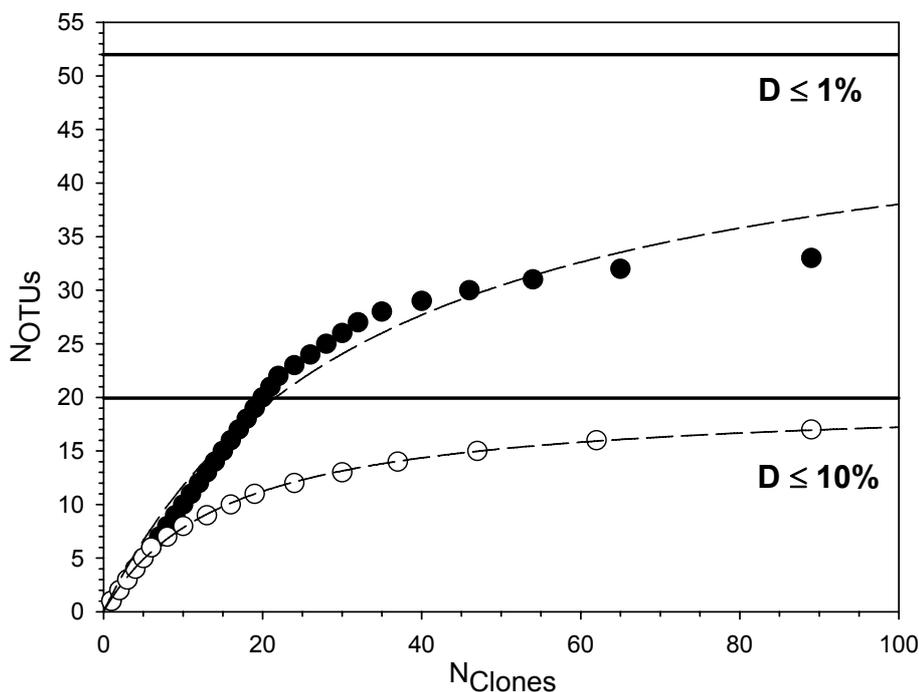


Abb. 43: Anzahl der in der *nosZ*-Genbibliotheken detektierten OTUs in Abhängigkeit von der Zahl der gescreenten Klone. Die Asymptoten der Regressionen (deterministisches Modell; siehe Kap. 2.8.1.1) stellen einen Schätzwert für die maximal zu erwartende Anzahl an OTUs dar und sind als horizontale Linien aufgetragen. Eine OTU umfasst hier Klone mit $\leq 1\%$ bzw. $\leq 10\%$ Sequenzunterschied auf Aminosäureebene.

Insgesamt zeigt dies, dass bei einer OTU-Definition von $D \leq 1\%$ die Diversität der *nosZ*-Genbibliothek bei weitem noch nicht erfasst war, während sich bei $D \leq 10\%$ schon allmählich eine Sättigung einstellte.

3.2.3.2.2 Rarefaction-Analyse

Wie die Rarefaction-Analyse zeigt, war die Zahl der zu erwartenden OTUs bei gleichem Probenumfang bei einer Zusammenfassung aller Klone mit einem evolutiven Abstand von $\leq 10\%$ deutlich geringer als bei der Zusammenfassung aller Klone mit einem evolutiven Abstand von $\leq 1\%$ (Abb. 44). Signifikant (95%-Niveau) war dieser Unterschied ab einem Probenumfang von ca. 40 Klonen. Während bei einem maximalen evolutiven Abstand von $\leq 1\%$ die Kurve auch gegen Ende noch nahezu linear anstieg, war die Kurve bei einem Abstand von $\leq 10\%$ gegen Ende zu schon stark abgeflacht. Dies verdeutlicht nochmals, dass bei $D \leq 1\%$ als Grundlage für die OTU-Definition noch lange keine Sättigung erreicht war, während der Probenumfang bei $D \leq 10\%$ bereits ausreichte, um einen Großteil der Diversität in der Genbibliothek zu erfassen.

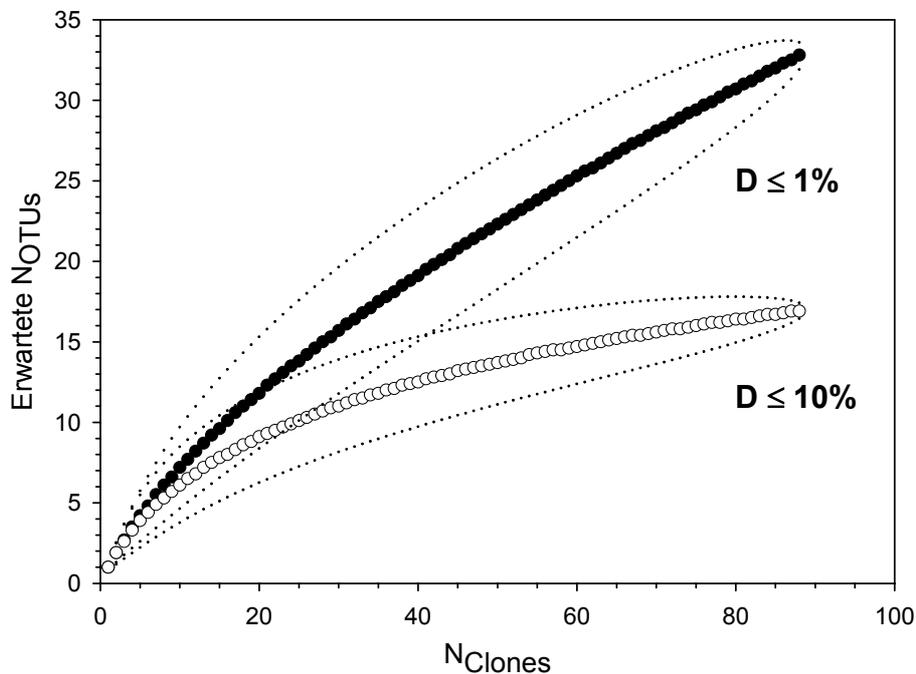


Abb. 44: Rarefaction-Analyse der *nosZ*-Genbibliothek aus dem DB bei unterschiedlicher OTU-Definition. Die Punktwolken um die Kurven stellen die 95%-Konfidenzintervalle dar. Zu einer OTU sind hier Sequenzen mit einem Unterschied von maximal 1 bzw. 10% auf Aminosäureebene zusammengefasst.

3.2.3.2.3 Phylogenetische Analyse

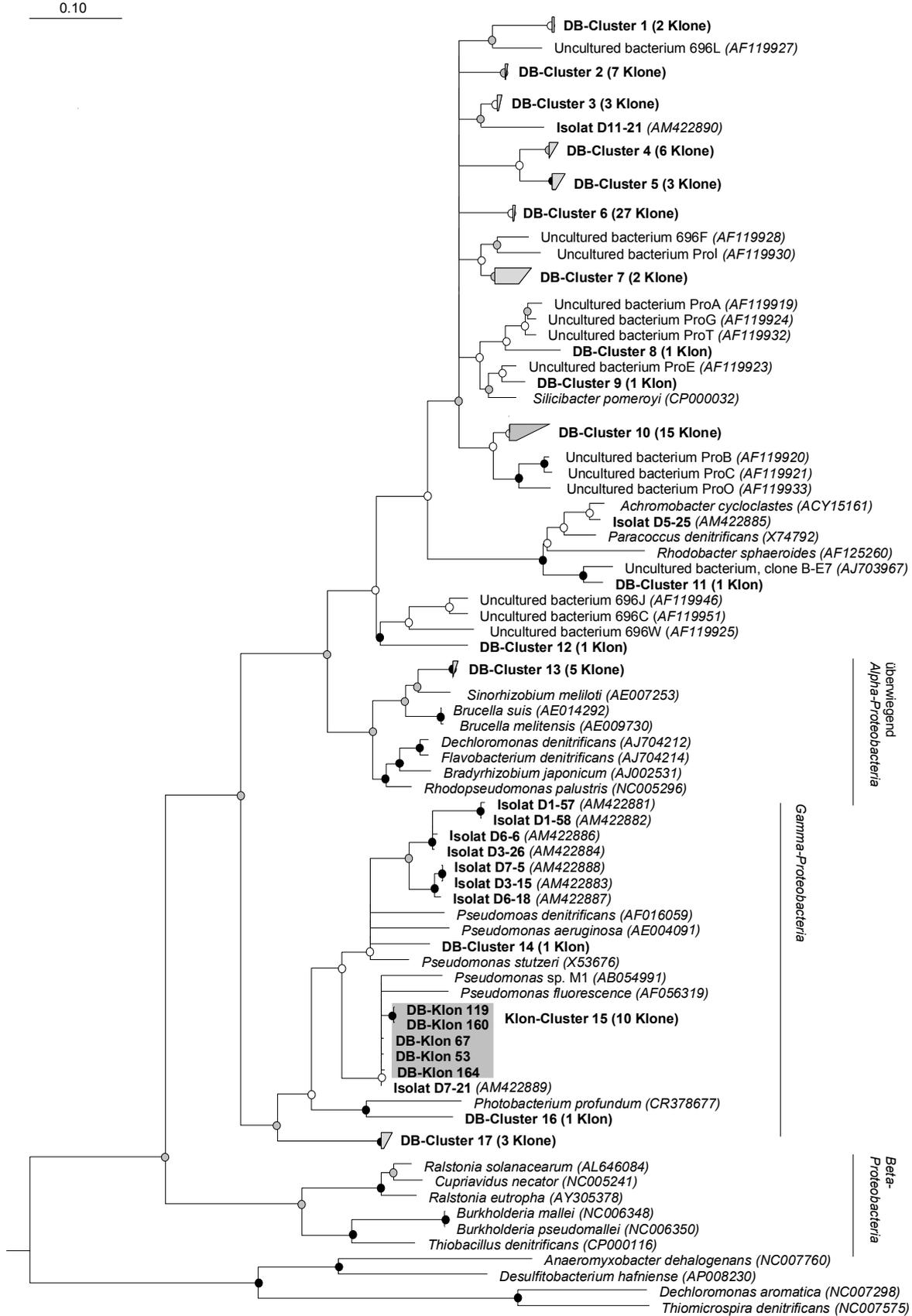
Im Stammbaum kamen 12 der 17 Klongruppen aus dem DB (Abb. 45) innerhalb einer Gruppe zu liegen, die als „ α -Proteobacteria mariner Herkunft“ bezeichnet wurde. Diese enthielt Klonsequenzen überwiegend marinen Ursprungs sowie einige Sequenzen beschriebener Alphaproteobakterien mit ebenfalls meist mariner Herkunft und ließ sich in drei Subcluster unterteilen. Gruppen 1 - 10 clusterten mit einer Gruppe mariner Klonsequenzen, die ursprünglich als „CLEM Group“ bezeichnet wurde (Scala & Kerkhof, 1999) und die mit *Silicibacter pomeroyi* (Gonzales et al., 2003) mittlerweile auch einen beschriebenen Vertreter enthält (= Subcluster 1). Klongruppe 11 war am nächsten verwandt zu einem Klon aus einem deutschen Gartenboden (Horn et al., 2006). Die nächsten kultivierten Verwandten waren *Achromobacter cycloclastes* und *Paracoccus denitrificans* (=Subcluster 2). Klongruppe 12 war am ähnlichsten zu einem Klon aus der „LEO Group“ und zwei Sequenzen aus der „CULTURED Group“ von Scala und Kerkhof (1999) (= Subcluster 3).

Gruppe 13 war am nächsten verwandt zu *Sinorhizobium meliloti* und gehört damit zu einem Cluster, das überwiegend Alphaproteobakterien und gleichzeitig meist typische Bodenbakterien umfasst.

Die restlichen vier Klongruppen gehörten dem Cluster „ γ -Proteobacteria“ an. 2 Gruppen zeigten enge Verwandtschaft zu verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies, wobei Cluster 15 nahezu identisch zu dem Isolat D7-21 war. Gruppe 16 war am nächsten verwandt zu *Photobacterium profundum*. Gruppe 17 gehörte ebenfalls noch zum „ γ -Cluster“, zweigte aber vor allen bekannten Spezies ab.

Wie bei der *narG*-Phylogenie (siehe Kap. 3.2.3.2.1.5) gibt auch hier die Lage im Stammbaum zwar einen Anhaltspunkt für die taxonomische Einordnung einer Klongruppe, darf aber nicht als feststehende Tatsache angesehen werden.

0.10



Alpha-Proteobacteria (größtenteils marine Herkunft)

überwiegend
Alpha-Proteobacteria

Gamma-Proteobacteria

Beta-Proteobacteria

Sonstige

Abb. 45: *nosZ*-Stammbaum. Der dargestellte Baum wurde mit der Tree-Puzzle-Methode berechnet und entspricht weitestgehend dem Konsensus aus mit Neighbor Joining-, Maximum Likelihood- und Parsimonitäts-Methode erhaltenen Bäumen. Die Berechnung erfolgte mit *nosZ*-Teilsequenzen (ca. 1100 bp) auf Nukleinsäureebene unter Verwendung eines Wobble-Filters. Die Markierungen an den Verzweigungsstellen symbolisieren die Bootstrap-Werte (Prozent von 1000 Bootstraps) und sind folgendermaßen abgestuft: Schwarz: $\geq 90\%$, grau: $\geq 75\%$, weiß: $\geq 50\%$. Isolat- und Klonsequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sind fett gedruckt. Klone mit $\leq 10\%$ Sequenzunterschied auf Aminosäureebene sind zu Clustern zusammengefasst. Bei größeren Klonclustern sind nur einige repräsentative Sequenzen dargestellt. Die Angaben in Klammern stellen bei Datenbank- und Isolatsequenzen die „Accession Numbers“ dar, bei den Klonclustern geben sie die Anzahl der enthaltenen Klone an. Maßstab: 10% Sequenzunterschied.

3.2.4 Vergleich kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden

Auf Ebene der funktionellen Gene *narG* und *nosZ* war ein direkter Vergleich zwischen Genbibliotheken und Isolatsequenzen möglich. Allerdings gab es für keines der beiden Gene die erhofften Übereinstimmungen zwischen Klon- und Isolatsequenzen.

Bei der *narG*-Gensequenzanalyse wiesen lediglich Klon-Cluster 7 (max. 96% Ähnlichkeit zu *Pseudomonas/Pseudoxanthomonas*-Isolaten), Cluster 13+14+15 (teilweise gerade noch 80% Ähnlichkeit zu D5-19 (*Pseudoxanthomonas*), D5-11.1 (*Marteella*) und D9-21 (*Ochrobactrum*)), Cluster 23 (90% Ähnlichkeit zu *Denitromonas*-Isolaten D2-1 und D12-45.1), Cluster 26 (94% Ähnlichkeit zu D1-15 (*Microbacterium*)) und Cluster 28 (97% Ähnlichkeit zu D9-7 (*Mycobacterium*)) größere Aminosäureähnlichkeit zu Isolatsequenzen auf (Tab. 35 und Kap. 3.2.3.2.1.5, Abb. 42). 100%-ige Sequenzübereinstimmungen wurden überhaupt nicht gefunden. Darüber hinaus konnte auch nur von ca. 50% der nachweislich nitratreduzierenden Isolate ein *narG*-Genfragment amplifiziert werden (siehe Kap. 3.2.3.1.2, Tab.32).

Für *nosZ* gab es nur bei den *Pseudomonaden* eine Überlappung zwischen Klon- und Isolatsequenzen (siehe Kap. 3.2.3.2.2.3, Abb. 45). Auch hier konnte von ca. 50% der vollständig denitrifizierenden Isolate ein *nosZ*-Genfragment amplifiziert werden. Allerdings handelte es sich dabei - mit 2 Ausnahmen - nur um *Pseudomonas*- und *Pseudoxanthomonas*-Spezies (siehe Kap. 3.2.3.1.2, Tab.32).

Tab. 35: Vergleich von narG-Klonsequenzen mit Isolat- und Datenbanksequenzen.

Groß-Cluster ^a	Klon-Cluster ^b	TF Anzahl	DB Anzahl	FBR Anzahl	Datenbanksequenzen und DSMZ-Kulturen	eigene Isolate
A	1		40		<i>Shewanella</i> sp.	
B	2		1			
C	3,4	1	17	6	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	
D	5,6		7		<i>Alteromonas maleodii</i>	
E	7		1		<i>Pseudomonas</i> sp. M1	<i>Pseudomonas</i> - u. <i>Pseudoxanthomonas</i> -Isolate
F	8	6	46	80		
G	9	5				
H	10			3	<i>Paracoccus denitrificans</i>	
I	11	1			<i>Roseobacter denitrificans</i>	
J	12	3				
K	13,14,15	15	5	16		<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. D5-19, <i>Martelia</i> sp. D5-11.1, <i>Ochrobactrum</i> sp. D9-21 ^c
L	16		1			
M	17,18	25	7			
N	19		5			
O	20	3	11	8	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	
P	21		2			
Q	22			1		
R	23,24		2		<i>Azoarcus</i> sp.	<i>Denitromonas</i> sp. D2-1 u. D12-45.1
S	25,26	36				<i>Microbacterium</i> sp. D1-15
T	27		2			
U	28	2				<i>Mycobacterium</i> sp. D9-7
V	29		26		<i>Desulfuromusa kysingii</i>	
W	30	1	2	12		
X	31		3			

^a ≥ 80% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene

^b ≥ 90% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene

^c nur teilweise ≥ 80% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene

3.2.5 Einfluss von Sulfid

3.2.5.1 ¹⁵N-Inkubationsexperiment mit DB-Proben

Um den Einfluss von Sulfid auf Denitrifikation und DNRA zu untersuchen, wurden Batch-Inkubationen von DB-Schlamm mit ¹⁵N-markiertem Nitrat und verschiedenen Sulfidkonzentrationen durchgeführt (Schwermer et al., unveröffentlicht). Das zugegebene Nitrat war nach 4 bis 5 h fast vollständig verbraucht (Abb. 46). Bei geringen Sulfidkonzentrationen (30 u. 70 µM)

wurden am Ende des Experiments ca. 90% des Nitrat-N in N_2 wiedergefunden. Bei einer mittleren Sulfidkonzentration von $600 \mu\text{M}$ wurde intermediär N_2O gebildet, das aber nach 8 h wieder vollständig abgebaut war. Bei der höchsten Sulfidkonzentration ($1600 \mu\text{M}$) konnte ein Großteil des gebildeten N_2O nicht mehr weiter zum N_2 reduziert werden und machte am Ende des Experiments immer noch einen Anteil von nahezu 60% aus. Der Anteil des in N_2 wiedergefundenen Nitrat-N betrug dagegen nur ca. 20%.

Der Anteil von Nitrat-N, das in Ammonium wiedergefunden wurde, stieg mit zunehmender Sulfidkonzentration von ca. 10% ($30 \mu\text{M}$ und $70 \mu\text{M}$ H_2S) auf ca. 20% (600 u. $1600 \mu\text{M}$ H_2S).

Hohe Sulfidkonzentrationen führten, vermutlich durch unvollständige Denitrifikation, somit zu verstärkter N_2O -Bildung. Außerdem war eine leichte Shift von Denitrifikation zu DNRA festzustellen.

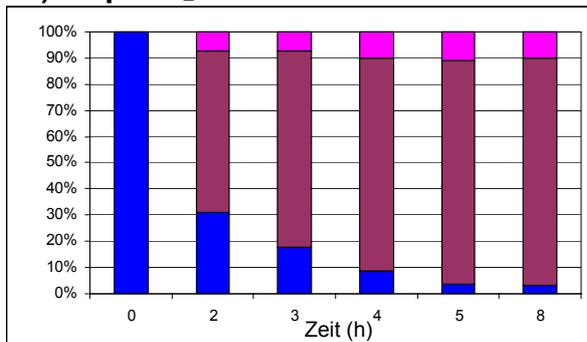
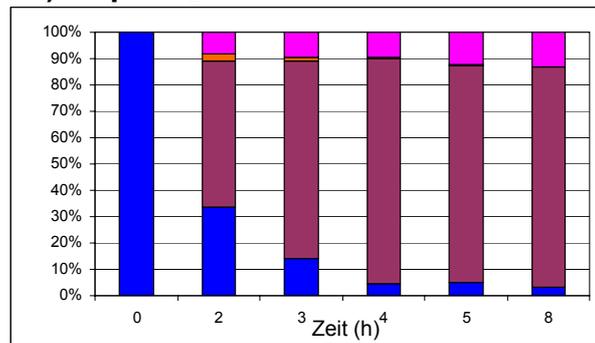
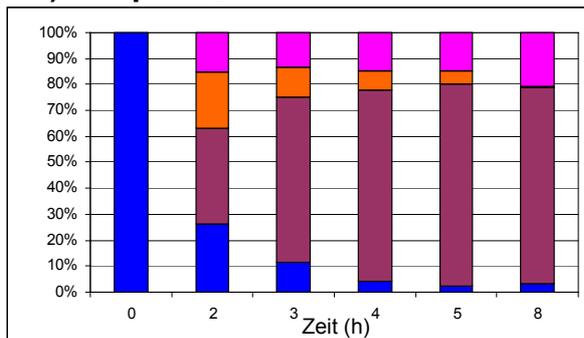
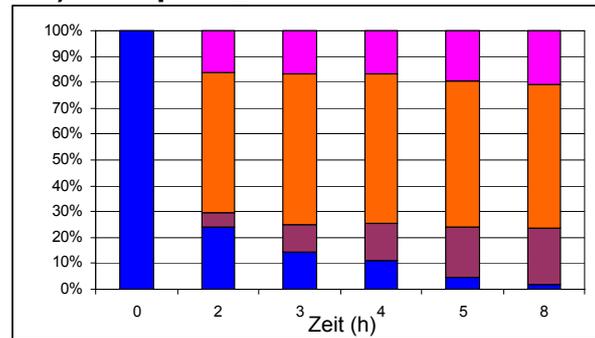
A) $30 \mu\text{M}$ H_2S B) $70 \mu\text{M}$ H_2S C) $600 \mu\text{M}$ H_2S D) $1600 \mu\text{M}$ H_2S 

Abb.46: Nitratumsatz in Batch-Inkubationen (DB-Schlamm) mit $^{15}\text{N-NO}_3^-$ und steigenden Sulfidkonzentrationen über die Zeit. NO_x (■), N_2 (■), N_2O (■) und NH_4^+ (■).

3.2.5.2 Isolate

In einem Vorversuch wurden ein oder mehrere Vertreter jeder Isolatgruppe auf die Fähigkeit getestet, unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Sulfid (0 - 5000 μM) zu wachsen. An ausgewählten Isolaten wurden anschließend zum einen Wachstum und Nitratumsatz in Gegenwart von Sulfid verfolgt (= „Langzeiteffekt“). Zum anderen wurde der Effekt von Sulfidpeaks (= „akuter Effekt“) durch die Zugabe von Sulfid zu bereits wachsenden Kulturen untersucht.

3.2.5.2.1 Vorversuche

Im Laufe der Vorversuche zeigte sich, dass einige der Isolate kaum bis gar nicht unter anaeroben, nitratreduzierenden Bedingungen wachsen konnten (Tab. 36). Sie kamen somit für die weiteren Versuche nicht in Betracht.

Die Sulfidtoleranz der getesteten Isolate reichte von nicht vorhanden (Wachstum nur ohne Sulfid im Medium) bis stark ausgeprägt (geringes Wachstum sogar noch bei einer Sulfidkonzentration von 5000 μM). Bei einigen Isolaten schien sich die Zugabe von 500 - 1000 μM Sulfid sogar wachstumsfördernd auszuwirken (höhere End- OD_{660}). Beobachtet wurde dieses Phänomen in unterschiedlicher Ausprägung bei den Gruppen 5 (*Pseudaminobacter*), 7 (*Devosia*), 15 (*Hydrogenophaga*), 21 (*Pseudomonas*), 24 (*Pseudomonas*), 26 (*Pseudoxanthomonas*), 27 (*Aquimonas*), 29 (*Cytophaga*) und 31 (*Vitellibacter*).

Die Auswahl von Isolaten für die späteren Versuche erfolgte nach den Kriterien Gruppenzugehörigkeit, Stoffwechselweg und Endprodukt der Nitratumsetzung sowie der unterschiedlichen Sulfidtoleranz.

Tab. 36: Ergebnisse der Vorversuche zur Sulfidtoleranz und Auswahl für die nachfolgenden Versuche.

Gr.	Isolat	Nächster Verwandter	16S rRNA-Sequenz-ähnlichkeit	Stoffwechselweg/ Endprodukt ^a	Wachstum ^b bei Sulfidkonz. [µM]:						Auswahl für Hauptversuche ^c
					0	50	100	500	1000	5000	
Alphaproteobacteria											
1	D5-11.1	<i>Marteella mediterranea</i>	99%	NR	x	x	x	x	x	-	17
2	D9-21	<i>Ochrobactrum aqua-oryzae</i>	100%	Deni; N ₂	x	x	x	x	-	-	7, D
3	D2-13b	<i>Shinella granuli</i>	99%	Deni; N ₂	x	x	x	-	-	-	8
	D11-29	"	99%	Deni; N ₂	x	-	x	x	-	-	-
4	D11-69	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	96%	NR	-	x	-	-	-	-	-
5	D5-18	<i>Pseudaminobacter</i> sp.	97%	NR	-	-	-	-	x	-	20
	D8-46	"	97%	NR	-	-	-	-	-	-	-
6	D12-37.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
7	D11-73	<i>Devosia riboflavina</i>	96%	NR	-	-	-	x	-	-	-
8	D1-6	<i>Paracoccus solventivorans</i>	97%	NR	x	x	-	-	-	-	18
9	D1-19	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	95%	NR	-	-	-	-	-	-	-
	D3-7bb	"	95%	NR	-	-	-	-	-	-	-
10	D5-6.1	<i>Rhodobacter litoralis</i>	97%	NR	-	-	-	-	-	-	-
	D5-41	"	97%	Deni; NO ₂ ⁻ zu N ₂	-	-	-	-	-	-	-
11	D9-3	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	94%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	5, F
	D11-58	"	95%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	-
12	D8-16	<i>Stappia stellulata</i>	98%	NR	-	-	-	-	-	-	-
	D11-55	"	98%	Deni; N ₂	x	-	-	-	-	-	14
13	D2-3	" <i>Cand. Alysiosphera europ.</i> "	90%	DNR(A)?	-	-	-	-	-	-	-
14	D1-34	<i>Tistrella mobilis</i>	99%	DNR(A)?	x	x	x	-	x	-	16, H
Betaproteobacteria											
15	D3-13.1	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	97%	NR	-	-	-	x	-	-	-
	D11-24b2	"	98%	NR	-	-	-	-	x	-	-
16	D9-5	<i>Bordetella trematum</i>	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
17	D8-13b	<i>Massilia timonae</i>	99%	Deni; N ₂	-	-	-	-	-	-	-
18	D1-68	<i>Denitromonas indolicum</i>	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	6
	D2-1	"	99%	Deni; N ₂ , N ₂ O	x	x	x	x	x	x	-
	D12-45.1	"	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	-
Gammaproteobacteria											
19	D10-48	<i>Rheinheimera baltica</i>	97%	NR	-	-	-	-	-	-	-
20	D7-10	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	99%	Deni; N ₂ O	x	x	x	-	-	-	-
21	D3-8	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	98%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	1

Gr.	Isolat	Nächster Verwandter	16S rRNA-Sequenz-ähnlichkeit	Stoffwechselweg/ Endprodukt ^a	Wachstum ^b bei Sulfidkonz. [µM]:						Auswahl für Hauptversuche ^c
					0	50	100	500	1000	5000	
	D7-21	"	97%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	-
22	D3-15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	3, B
23	D6-18	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , ...	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	x	-
24	D1-57	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	2, A
	D1-58	"	"	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	-
	D3-26	"	"	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	-	-
25	D2-17	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99%	NR	x	x	-	-	x	-	10
26	D3-22	<i>Pseudoxanth. mexicana</i>	99%	NR	-	x	-	-	x	-	-
	D3-23	"	99%	Deni; N ₂	x	-	-	-	-	-	13, C
	D5-19	"	99%	NR	x	x	x	-	-	-	9, E
	D7-5	"	99%	Deni; N ₂	x	x	x	x	x	x	4
	D11-27	"	99%	Deni; N ₂	-	-	-	-	-	-	-
27	D9-22	<i>Aquimonas voraii</i>	99%	Deni; N ₂ O	-	-	-	x	x	-	-
	D11-21	"	99%	Deni; N ₂	x	x	x	-	-	-	12
	D11-34A	"	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
Bacteroidetes											
28	D12-42.1	<i>Flexibacter aggregans</i>	99%	Deni; N ₂	x	-	-	-	-	-	15, G
29	D11-24b1	<i>Cytophaga sp.</i>	94%	NR	-	-	-	-	x	-	-
30	D10-6.1	<i>Muricauda aquimarina</i> , ...	97%	NR	?	?	?	?	?	?	-
31	D7-13	<i>Vitellibacter vladivostokensis</i>	99%	NR	-	-	-	-	x	-	-
Firmicutes											
32	D1-61.1	<i>Enterococcus sanguinicola</i>	99%	NR	x	x	x	x	x	-	19
33	D1-54	<i>Bacillus firmus</i>	99%	Deni; N ₂ O	x	x	-	x	-	-	11
34	D1-52	<i>Bacillus cereus</i> , ...	99%	DNR(A)?	x	x	x	-	-	-	-
Actinobacteria											
35	D9-7	<i>Mycobacterium peregrinum</i> , ...	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
36	D6-28	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	96%	NR	x	-	x	-	-	-	-
37	D2-4	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98%	NR	x	-	-	-	x	-	-
	D2-6	<i>Rhodococcus zopfii</i>	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
	D3-18	<i>Rhodococcus zopfii</i> , ...	99%	NR	x	x	x	-	x	-	-
38	D1-15	<i>Microbacterium aurum</i>	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-
39	D7-38	<i>Microbacterium chocolatum</i> , ...	99%	NR	?	?	?	?	?	?	-
40	D9-23	<i>Microbacterium koreense</i> , ...	98%	NR	?	?	?	?	?	?	-
41	D1-50	<i>Leucobacter chromiireducens</i>	99%	NR	-	-	-	-	-	-	-

- ^a Deni: Denitrifikation, nachgewiesen durch N₂- und/oder N₂O-Bildung; NR: Nitratreduktion, nachgewiesen durch Nitratverbrauch und (teilweise) Nitritbildung, möglicherweise auch Reduktion zu Ammonium (nicht getestet)
- ^b als positiv bewertet, wenn mindestens eine OD₆₆₀ von knapp 1,5 erreicht wurde
- ^c Nummern von 1 - 21: Auswahl für Untersuchung der „Langzeitwirkung“, Buchstaben von A - H: Untersuchung des „akuten Sulfideffekts“
- ^d ?: nicht getestet

3.2.5.2.2 Wachstum und Nitratumsatz unter sulfidischen Bedingungen („Langzeitwirkung“)

Um den längerfristigen Einfluss von Sulfid auf Reinkulturen aus der Aquakultur zu untersuchen, wurden 20 nitratreduzierende/denitrifizierende Isolate (s. o., Tab. 36) in Medium mit Sulfidkonzentrationen von 0 - 1000 bzw. 5000 µM inkubiert und Wachstum und Nitratumsatz über die Zeit verfolgt.

Die Reaktion der einzelnen Isolate reichte von hoch sensitiv bis sehr sulfidtolerant. Generell führten steigende Sulfidkonzentrationen zu einer Verminderung des Wachstums, bis dieses schließlich ganz zum Erliegen kam (Abb. 47 u. Tab. 37).

Bei den vollständig denitrifizierenden Isolaten war - in Abhängigkeit von der individuellen Sulfidempfindlichkeit der einzelnen Stämme - mit zunehmender Sulfidkonzentration ein Anstieg in der N₂O-Produktion zu beobachten (Abb. 47 u. Tab. 38).

Bei etlichen Isolaten war die Bildung geringer Mengen Ammonium festzustellen. Es bestand jedoch kein Zusammenhang mit der Sulfidkonzentration. Da es sich auch nur um sehr geringe Konzentrationen handelte (maximal 200 µM, meist deutlich weniger), ist fraglich, ob das Ammonium aus dem dissimilatorischen Abbau von Nitrat zu Ammonium stammt. Weit wahrscheinlicher ist die Herkunft aus dem Abbau von Aminosäuren, die durch die Zugabe von Hefeextrakt in geringen Mengen im Medium enthalten waren.

Alle untersuchten, nicht-denitrifizierenden Isolate (= potentielle Kandidaten für DNRA) setzten Nitrat nur zu Nitrit um. Zwar waren auch hier nach Beendigung des Versuchs bei einigen Kulturen geringe Mengen Ammonium im Medium nachweisbar, diese rührten aber wahrscheinlich aus dem Aminosäureabbau her (s. o.). N₂O wurde höchstens in Spuren gebildet. Ein „Sulfideffekt“ war nicht zu beobachten.

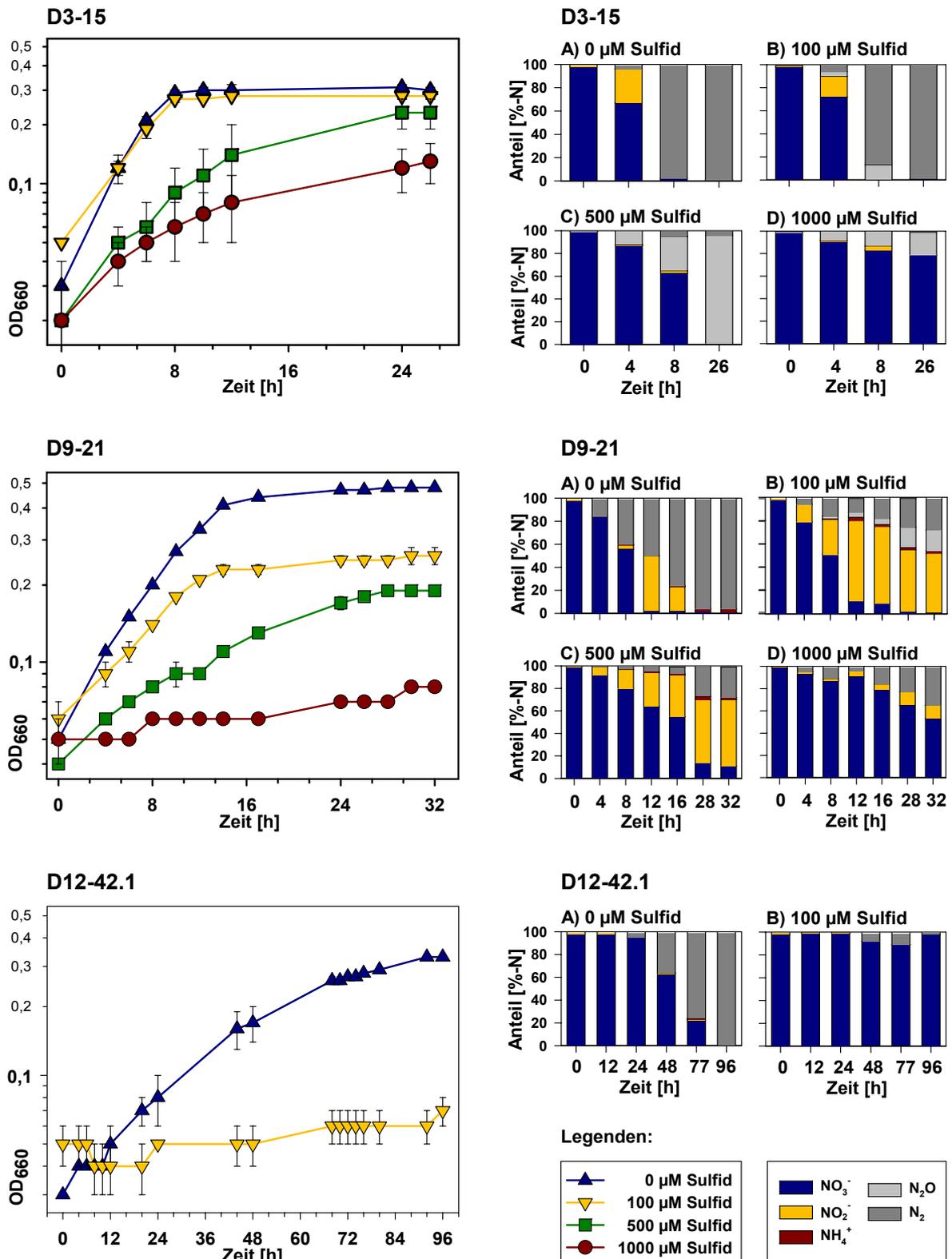


Abb. 47: Beispiele für Wachstum (linke Seite) und Nitratumsatz (rechte Seite) denitrifizierender Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen. Alle Messungen erfolgten in Triplicaten. Oben: Große Sulfidtoleranz, Mitte: Mäßige Sulfidtoleranz, Unten: Keine Sulfidtoleranz.

Tab. 37: Wachstum der 20 getesteten Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen.

Nr.	Isolat	Na ₂ S [µM]	Wachstums- rate µ (MW)	Verdopplungs- zeit t _d (MW)	End-OD ₆₆₀ (MW)
1	D3-8	0	0,23 ± 0,01	3,1 ± 0,2	0,15 ± 0,00
		100	0,17 ± 0,02	4,1 ± 0,5	0,14 ± 0,00
		500	0,11 ± 0,06	7,6 ± 3,9	0,24 ± 0,03
		1000	0,09 ± 0,04	8,1 ± 3,0	0,31 ± 0,05
2	D1-57	0	0,37 ± 0,01	1,9 ± 0,0	0,32 ± 0,01
		100	0,27 ± 0,01	2,6 ± 0,1	0,30 ± 0,00
		500	0,15 ± 0,03	4,6 ± 0,7	0,33 ± 0,05
		1000	0,09 ± 0,04	9,7 ± 5,8	0,38 ± 0,03
3	D3-15	0	0,29 ± 0,05	2,4 ± 0,4	0,31 ± 0,01
		100	0,22 ± 0,01	3,1 ± 0,1	0,28 ± 0,01
		500	0,16 ± 0,03	4,4 ± 0,9	0,23 ± 0,04
		1000	0,13 ± 0,04	5,8 ± 1,7	0,14 ± 0,03
4	D7-5	0	0,42 ± 0,05	1,7 ± 0,2	0,31 ± 0,02
		100	0,25 ± 0,03	2,8 ± 0,4	0,29 ± 0,02
		500	0,17 ± 0,03	4,2 ± 0,9	0,24 ± 0,01
		1000	0,08 ± 0,03	9,8 ± 3,9	0,13 ± 0,05
5	D9-3	0	0,11 ± 0,01	6,4 ± 0,4	0,34 ± 0,01
		100	0,09 ± 0,01	7,7 ± 0,5	0,37 ± 0,00
		500	0,03 ± 0,00	23,4 ± 1,5	0,27 ± 0,00
		1000	0,04 ± 0,00	18,1 ± 2,2	0,12 ± 0,01
6	D1-68	0	0,23 ± 0,03	3,0 ± 0,3	0,28 ± 0,01
		100	0,19 ± 0,02	3,7 ± 0,5	0,30 ± 0,01
		500	0,13 ± 0,03	5,4 ± 1,0	0,32 ± 0,00
		1000	0,05 ± 0,01	14,1 ± 2,2	0,37 ± 0,02
7	D9-21	0	0,17 ± 0,00	4,1 ± 0,0	0,48 ± 0,00
		100	0,12 ± 0,02	6,0 ± 0,9	0,26 ± 0,02
		500	0,07 ± 0,01	10,7 ± 1,1	0,19 ± 0,00
		1000	0,02 ± 0,00	35,9 ± 2,2	0,08 ± 0,00

Nr.	Isolat	Na ₂ S [µM]	Wachstums- rate µ (MW)	Verdopplungs- zeit t _d (MW)	End-OD ₆₆₀ (MW)
11	D1-54	0	0,17 ± 0,01	4,1 ± 0,2	0,56 ± 0,00
		100	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,05 ± 0,00
		500	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,08 ± 0,02
		1000	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,00
12	D11-21	0	0,04 ± 0,00	17,1 ± 0,1	0,24 ± 0,01
		100	0,01 ± 0,00	92,0 ± 48,6	0,03 ± 0,00
		500	0,01 ± 0,00	56,1 ± 6,5	0,05 ± 0,00
		1000	0,01 ± 0,01	109,6 ± 92,0	0,07 ± 0,02
13	D3-23	0	0,09 ± 0,00	8,0 ± 0,3	0,37 ± 0,00
		100	0,00 ± 0,00	128,9 ± 56,9	0,07 ± 0,00
14	D11-55	0	0,03 ± 0,00	26,5 ± 2,9	0,26 ± 0,00
		100	0,00 ± 0,00	151,5 ± 42,4	0,05 ± 0,00
15	D1242.1	0	0,04 ± 0,00	17,9 ± 0,9	0,33 ± 0,00
		100	0,01 ± 0,00	81,3 ± 8,4	0,07 ± 0,01
16	D1-34	0	0,06 ± 0,01	11,5 ± 1,1	0,19 ± 0,00
		100	0,05 ± 0,00	14,8 ± 0,7	0,17 ± 0,01
		500	0,02 ± 0,01	47,2 ± 18,2	0,05 ± 0,01
		1000	0,01 ± 0,00	71,5 ± 23,7	0,03 ± 0,00
17	D5-11.1	0	0,05 ± 0,01	15,8 ± 3,2	0,12 ± 0,00
		100	0,05 ± 0,02	17,1 ± 6,5	0,13 ± 0,00
		500	0,01 ± 0,01	61,1 ± 27,3	0,04 ± 0,02
		1000	0,01 ± 0,00	65,6 ± 6,3	0,02 ± 0,00

Fortsetzung Tab. 37: Wachstum der 20 getesteten Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen.

Nr.	Isolat	Na ₂ S [µM]	Wachstumsrate µ (MW)	Verdopplungszeit t _d (MW)	End-OD ₆₆₀ (MW)
8	D2-13b	0	0,09 ± 0,00	7,4 ± 0,2	0,35 ± 0,01
		50	0,01 ± 0,00	55,2 ± 2,9	0,21 ± 0,08
		100	0,01 ± 0,00	106,4 ± 59,6	0,09 ± 0,01
		250	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,08 ± 0,00
		500	0,01 ± 0,01	68,3 ± 30,8	0,06 ± 0,00
9	D5-19	0	0,06 ± 0,00	11,8 ± 0,1	0,29 ± 0,00
		50	0,04 ± 0,01	16,1 ± 3,0	0,23 ± 0,02
		100	0,04 ± 0,00	15,6 ± 1,4	0,26 ± 0,08
		250	0,05 ± 0,01	15,6 ± 4,0	0,23 ± 0,01
10	D2-17	0	0,10 ± 0,01	6,8 ± 0,9	0,08 ± 0,00
		50	0,14 ± 0,03	5,2 ± 1,2	0,09 ± 0,00
		100	0,13 ± 0,04	5,6 ± 1,4	0,09 ± 0,01
		500	0,05 ± 0,01	14,9 ± 2,8	0,07 ± 0,01
		1000	0,05 ± 0,02	19,3 ± 12,8	0,05 ± 0,01
18	D1-6	0	nicht gewachsen!		
		50			
		100			
		500			
19	D1-61.1	0	0,32 ± 0,01	2,1 ± 0,1	0,24 ± 0,00
		100	0,23 ± 0,04	3,2 ± 0,6	0,24 ± 0,00
		500	0,12 ± 0,03	6,1 ± 1,4	0,18 ± 0,01
		1000	0,10 ± 0,01	6,8 ± 0,5	0,16 ± 0,02
		5000	0,05 ± 0,01	15,9 ± 5,3	0,06 ± 0,01
20	D5,18	0	nicht gewachsen!		
		100			
		500			
		1000			

Tab. 38: Maximale N_2O - und N_2 -Bildungsraten der 20 getesteten Isolate in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen sowie Konzentrationen an N_2O und N_2 nach Beendigung des Wachstums. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Nr.	Isolat	Na_2S [μM]	N_2O -Bildungsrate (MW) [mmol $N_2O-N/l \cdot h$]	N_2 -Bildungsrate (MW) [mmol $N_2-N/l \cdot h$]	Endkonz. N_2O-N (MW) [mM]	Endkonz. N_2-N (MW) [mM]
1	D3-8	0	0,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	3,47 \pm 0,50
		100	0,04 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03	0,37 \pm 0,29	3,09 \pm 0,54
		500	0,05 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	2,54 \pm 1,05	1,39 \pm 1,26
		1000	0,04 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	2,26 \pm 1,00	0,72 \pm 0,35
2	D1-57	0	0,00 \pm 0,00	1,09 \pm 0,09	0,00 \pm 0,00	3,76 \pm 0,50
		100	0,10 \pm 0,15	0,84 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00	3,69 \pm 0,41
		500	0,46 \pm 0,15	0,23 \pm 0,31	2,46 \pm 2,07	1,32 \pm 2,38
		1000	0,07 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	3,19 \pm 0,49	0,35 \pm 0,37
3	D3-15	0	0,00 \pm 0,00	0,77 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	3,48 \pm 0,81
		100	0,05 \pm 0,08	0,63 \pm 0,16	0,00 \pm 0,00	3,45 \pm 0,29
		500	0,16 \pm 0,06	0,01 \pm 0,00	3,56 \pm 0,23	0,14 \pm 0,28
		1000	0,07 \pm 0,04	0,01 \pm 0,02	1,09 \pm 0,71	0,00 \pm 0,29
4	D7-5	0	0,00 \pm 0,00	0,58 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00	3,59 \pm 0,40
		100	0,12 \pm 0,17	0,65 \pm 0,23	0,03 \pm 0,05	4,43 \pm 0,52
		500	0,16 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	4,15 \pm 0,15	0,56 \pm 0,52
		1000	0,02 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,54 \pm 0,32	0,43 \pm 0,49
5	D9-3	0	0,00 \pm 0,00	0,15 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	4,42 \pm 0,65
		100	0,09 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,25 \pm 0,20	4,35 \pm 0,64
		500	0,05 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	2,89 \pm 0,27	0,88 \pm 0,77
		1000	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,57 \pm 0,11	0,97 \pm 0,60
6	D1-68	0	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	2,77 \pm 0,31	1,77 \pm 0,67
		100	0,15 \pm 0,00	0,12 \pm 0,05	3,81 \pm 0,07	1,84 \pm 1,02
		500	0,24 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	4,08 \pm 0,16	1,33 \pm 0,61
		1000	0,12 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04	3,34 \pm 0,05	1,80 \pm 0,61
7	D9-21	0	0,00 \pm 0,00	0,30 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	4,58 \pm 0,65
		100	0,06 \pm 0,02	0,09 \pm 0,04	1,04 \pm 0,22	1,62 \pm 0,65
		500	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	1,62 \pm 0,62
		1000	0,00 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	1,51 \pm 0,71
8	D2-13b	0	0,06 \pm 0,01	0,29 \pm 0,03	0,19 \pm 0,05	3,47 \pm 1,01
		50	0,04 \pm 0,03	0,28 \pm 0,08	1,97 \pm 1,62	2,44 \pm 1,02
		100	0,00 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,06	1,72 \pm 0,61
		250	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	1,21 \pm 0,61
		500	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	1,34 \pm 0,62
9	D5-19	0	0,07 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	2,72 \pm 0,53	1,28 \pm 1,27
		50	0,04 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	1,82 \pm 0,34	0,66 \pm 0,83
		100	0,04 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	2,20 \pm 0,55	0,59 \pm 0,79
		250	0,04 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	2,31 \pm 0,55	0,98 \pm 0,80

Nr.	Isolat	Na ₂ S [μM]	N ₂ O-Bildungsrate (MW) [mmol N ₂ O-N/l*h]	N ₂ -Bildungsrate (MW) [mmol N ₂ -N/l*h]	Endkonz. N ₂ O-N (MW) [mM]	Endkonz. N ₂ -N (MW) [mM]
10	D2-17	0	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,64
		50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,60
		100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,61
		500	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,62 ± 0,60
		1000	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,69 ± 0,75
11	D1-54	0	0,18 ± 0,09	0,01 ± 0,00	4,03 ± 1,12	0,22 ± 0,16
		100	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,94 ± 0,08	0,16 ± 0,24
		500	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,13
		1000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,09
12	D11-21	0	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	3,86 ± 0,17
		100	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,30
		500	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,17
		1000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,15
13	D3-23	0	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,00 ± 0,00	3,81 ± 0,32
		100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,35 ± 0,36
14	D11-55	0	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,80 ± 0,14	1,33 ± 0,32
		100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,21
15	D12-42.1	0	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01	3,44 ± 0,16
		100	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,18
16	D1-34	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,12 ± 0,14
		100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,13
		500	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,26
		1000	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,34
17	D5-11.1	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,35
		100	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,34
		500	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,32
		1000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,44
18	D1-6	0	nicht gewachsen!			
		100	nicht gewachsen!			
		500	nicht gewachsen!			
		1000	nicht gewachsen!			
19	D1-61.1	0	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,21
		100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,26
		500	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,41
		1000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,36
		5000	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,49
20	D5-18	0	nicht gewachsen!			
		100	nicht gewachsen!			
		500	nicht gewachsen!			
		1000	nicht gewachsen!			

3.2.5.2.3 Effekt von Sulfidpeaks („akuter Effekt“)

Um den akuten Effekt von Sulfid auf die Nitratreduktion u./o. Denitrifikation zu testen, wurden ausgewählte Isolate (siehe Kap. 3.2.5.2.1, Tab. 36) etwa in der Mitte ihrer exponentiellen Wachstumsphase einer niedrigen und einer hohen Sulfidkonzentration (i. d. R. 100 und 1000 μM) ausgesetzt und der Effekt auf Wachstum und Nitratumsatz beobachtet.

Je nach individueller Empfindlichkeit der untersuchten Isolate wuchsen diese nach der Sulfidzugabe mit kaum verminderter Geschwindigkeit weiter, zeigten sich in ihrem Wachstum beeinträchtigt oder stellten das Wachstum vollständig ein (Abb. 48, Tab. 39). Generell beeinträchtigte die nachträgliche Sulfidzugabe das Wachstum weniger als die Sulfidzugabe vor Beginn des Experiments.

Bei den nach Sulfidzugabe noch wachsenden Kulturen war als Reaktion auf die Sulfidgabe ein sofortiger Anstieg in der N_2O -Konzentration feststellbar (Abb.48, Tab. 40). In Abhängigkeit von der Sulfidkonzentration und der individuellen Sulfidtoleranz der verschiedenen Stämme war dieser Effekt reversibel und das intermediär gebildete N_2O konnte anschließend noch zu N_2 umgesetzt werden. Bei hohen Sulfidkonzentrationen blieb bis zum Ende des Experiments ein hoher N_2O -Level bestehen.

Bei dem einzigen getesteten nicht-denitrifizierenden Isolat (H, D1-34) war Nitrit das Endprodukt. N_2O -Bildung wurde nicht festgestellt.

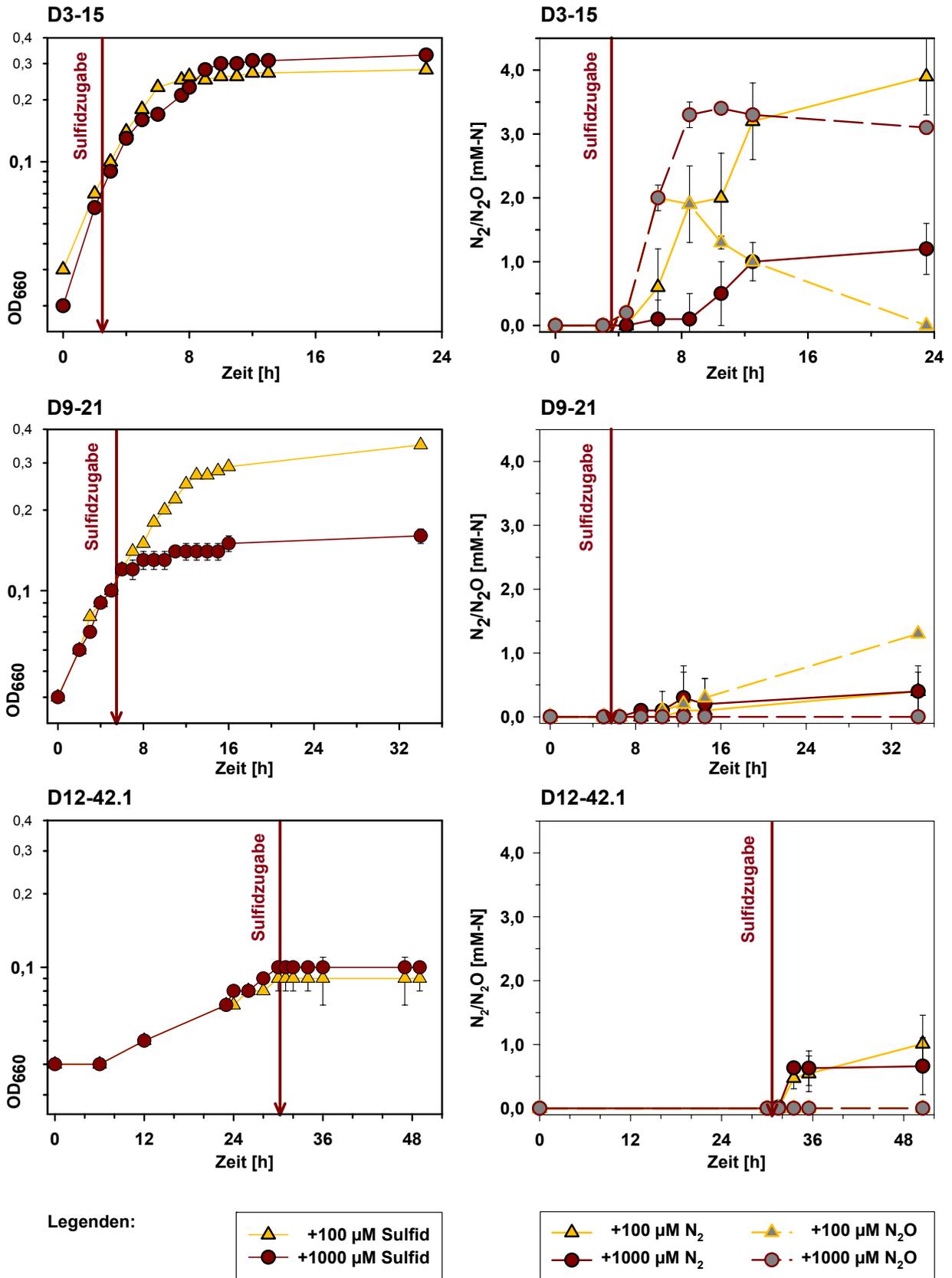


Abb. 48: Beispiele für die Reaktion von Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase auf die Sulfidzugabe. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Linke Seite: Wachstum, rechte Seite Gasproduktion. Oben: Große Sulfidtoleranz, Mitte: mäßige Sulfidtoleranz, Unten: keine Sulfidtoleranz.

Tab. 39: Reaktion (Wachstum) der 8 getesteten Isolate auf die Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Nr.	Isolat	Na ₂ S [μM]	Wachstums-	Verdopplungs-	Wachstums-	Verdopplungs-	End-OD ₆₆₀ (MW)
			rate μ (MW)	zeit t _d (MW)	rate μ (MW)	zeit t _d (MW)	
			vor Sulfidzugabe		nach Sulfidzugabe		
A	D1-57	100	0,43 ± 0,06	1,6 ± 0,2	0,43 ± 0,01	1,6 ± 0,1	0,30 ± 0,01
		1000	0,35 ± 0,01	2,0 ± 0,0	0,25 ± 0,01	2,8 ± 0,1	0,34 ± 0,01
B	D3-15	100	0,41 ± 0,07	1,7 ± 0,3	0,29 ± 0,04	2,4 ± 0,4	0,28 ± 0,01
		1000	0,37 ± 0,03	1,9 ± 0,1	0,22 ± 0,01	3,2 ± 0,1	0,33 ± 0,01
C	D3-23	100	0,08 ± 0,01	8,8 ± 1,4	0,03 ± 0,01	30,3 ± 11,8	0,12 ± 0,01
		1000	0,09 ± 0,01	7,7 ± 1,0	0,03 ± 0,01	26,1 ± 10,5	0,12 ± 0,02
D	D9-21	100	0,17 ± 0,00	4,0 ± 0,1	0,13 ± 0,00	5,4 ± 0,1	0,35 ± 0,00
		1000	0,18 ± 0,01	3,8 ± 0,3	0,04 ± 0,01	18,9 ± 3,3	0,16 ± 0,01
E	D5-19	100 1000	kaum gewachsen; deshalb Experiment nicht durchgeführt!				
F	D9-3	100	0,11 ± 0,01	6,3 ± 0,6	0,10 ± 0,01	6,8 ± 0,3	0,31 ± 0,00
		1000	0,11 ± 0,01	6,1 ± 0,7	0,10 ± 0,01	7,0 ± 0,4	0,38 ± 0,01
G	D12-42.1	100	0,03 ± 0,00	21,9 ± 1,7	0,01 ± 0,00	77,1 ± 7,6	0,10 ± 0,01
		500	0,04 ± 0,01	18,6 ± 2,7	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,10 ± 0,00
H	D1-34	100	0,05 ± 0,00	13,8 ± 0,4	0,04 ± 0,00	16,1 ± 1,5	0,17 ± 0,00
		1000	0,05 ± 0,00	14,2 ± 1,1	0,02 ± 0,00	32,5 ± 1,9	0,13 ± 0,01

Tab. 40: Reaktion (N_2O - und N_2 -Bildungsraten und N_2O - und N_2 -Konzentrationen nach Beendigung des Wachstums) der 8 getesteten Isolate auf die Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Nr.	Isolat	Na ₂ S [μM]	N ₂ O-Bildungsrate (MW) [mmol N ₂ O-N/l*h]	N ₂ -Bildungsrate (MW) [mmol N ₂ -N/l*h]	Endkonz. N ₂ O-N (MW) [mM]	Endkonz. N ₂ -N (MW) [mM]
A	D1-57	100	0,52 ± 0,03	0,65 ± 0,11	0,00 ± 0,00	4,65 ± 0,94
		1000	0,59 ± 0,02	0,06 ± 0,08	2,63 ± 0,14	1,47 ± 0,31
B	D3-15	100	0,94 ± 0,09	0,34 ± 0,04	0,00 ± 0,00	3,91 ± 0,61
		1000	0,92 ± 0,03	0,21 ± 0,06	3,12 ± 0,07	1,15 ± 0,41
C	D3-23	100	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,53
		1000	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,70 ± 0,45
D	D9-21	100	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,01	1,28 ± 0,04	0,43 ± 0,39
		1000	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,34
E	D5-19	100 1000	kaum gewachsen; deshalb Experiment nicht durchgeführt!			
F	D9-3	100	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,74 ± 0,09	3,50 ± 2,10
		1000	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,48 ± 0,03	1,80 ± 1,33
G	D12-42.1	100	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,01 ± 0,45
		500	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,45
H	D1-34	100	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,25
		1000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,33

4 Diskussion

4.1 Nitrifikation

4.1.1 Diskrepanz zwischen Klonierungsansatz, DGGE und FISH

Beim Vergleich der anfangs erhaltenen Sequenzinformation aus den Klonbibliotheken mit den FISH-Ergebnissen ergaben sich Schwierigkeiten, da die beiden Ansätze ein sehr unterschiedliches Bild der Nitrifikantenpopulation lieferten (siehe Kap. 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Diese Diskrepanzen beruhten auf unvollständiger DNA-Extraktion, Unterschieden in der Amplifikationseffizienz verschiedener DNA-Fragmente während der PCR („PCR-Bias“) und einer Sondenfehlpaarung (s. u.). Die Verkettung all dieser Umstände sowie das völlige Fehlen der FISH-dominanten AOB in den ersten Klonbibliotheken (siehe Kap. 3.1.2.2, Abb. 15) mag extrem erscheinen. In vielen Studien kämen solche Probleme jedoch gar nicht ans Licht, da nicht der vollständige Zyklus von DNA-Extraktion über Klonierung und Sequenzierung bis hin zur Entwicklung spezifischer Sonden und letztendlich der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (= „full cycle rRNA approach“; Amann et al., 1995) durchlaufen und somit der Kreis nicht geschlossen wird. Ohne eine Überprüfung von Sequenzdaten in situ (z. B. mit FISH) einerseits und die Verknüpfung von quantitativen FISH-Daten mit über (Klon)sequenzen definierten Populationen andererseits bleiben Artefakte oder falsche Gewichtungen somit leicht unentdeckt.

In der vorliegenden Studie konnte das Fehlen von *Nitrosomonas* sp. Nm143 in den ersten 16S rRNA- und *amoA*-Klonbibliotheken auf die unzureichende Effizienz von DNA-Extraktionsmethode A zurückgeführt werden, da mit der verbesserten Extraktionsmethode B beide Genfragmente detektiert werden konnten. Es ist bekannt, dass die Wahl der DNA-Extraktionsmethode einen Einfluss auf das Ergebnis mikrobieller Diversitätsstudien hat (z. B. Krsek & Wellington, 1999; Miller et al., 1999; Martin-Laurent et al., 2001) und dass besonders Aggregate bildende AOB schwer zu extrahieren sind (Juretschko et al., 1998; Schramm, unveröffentlichte Daten). Basierend auf mikroskopischen Beobachtungen und dem Erfolg enzymatischer Lyse (Methode B, diese Arbeit; Burrel et al., 2001; Itoi et al., 2006) lässt sich spekulieren, dass eine dicke EPS-Hülle die Zellen von *Nitrosomonas* sp. Nm143 vor mechanischer Lyse (Methode A, diese Arbeit) schützte.

Auch nach Anwendung der verbesserten Methode zur DNA-Extraktion spiegelten weder die 16S rRNA- noch die *amoA*-Genbibliothek das in situ Verhältnis der verschiedenen AOB-Spezies

wider. Da die beiden Gene für *Nitrosomonas* sp. Nm143 und *N. marina* diametral entgegengesetzte Anteile erbrachten, ist die wahrscheinlichste Erklärung eine unterschiedliche Ausprägung von „PCR-Bias“ (z. B. von Wintzingerode et al., 1997; Polz & Cavanaugh, 1998; Mahmood et al., 2006) für die Amplifikation von 16S rRNA- und *amoA*-Genfragmenten. Darüber hinaus kann eine unterschiedliche Kopienzahl von 16S rRNA- und *amoA*-Genen bei verschiedenen AOB zusätzlich zu der in den Klonbibliotheken beobachteten Schiefelage beitragen.

Auf der anderen Seite legt die Hybridisierung der Sonde NEU23a (Wagner et al., 1995) mit einer Nicht-Zielsequenz nahe, dass eine *in silico* Überprüfung publizierter Sonden manchmal nicht ausreicht, um ihre Spezifität sicherzustellen. Wenn neue Sequenzen verfügbar werden, können erneut empirische Tests erforderlich sein.

Warum die DGGE-Analyse keinerlei Aufschluss über die unterschiedliche Effizienz der verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden geben konnte (siehe Kap. 3.1.2.1, Abb. 14), lässt sich nicht endgültig klären. Denkbar ist, dass die *Nitrosomonas* sp. Nm143-spezifischen Banden unter Banden anderer Spezies mit zufällig gleicher Lauflänge „verborgen“ waren (Smalla et al., 2001) und deshalb kein Unterschied im Bandenmuster sichtbar wurde, egal ob *amoA*-Genfragmente von *Nitrosomonas* sp. Nm143 vorhanden waren oder nicht. Eine andere Möglichkeit ist, dass der offensichtlich vorhandene „PCR-Bias“, der zu einer bevorzugten Amplifikation des *amoA*-Genfragments aus *Nitrosomonas marina* führte (siehe Ergebnis der Genbibliotheken, Kap. 3.1.2.2, Abb. 15), durch die GC-Klammer noch verstärkt wurde und das *amoA*-Genfragment von *Nitrosomonas* sp. Nm143 nicht stark genug amplifiziert wurde, um auf dem Gel in Erscheinung zu treten.

Insgesamt zeigt dies, dass jede Methode für sich ihre Probleme und Unzulänglichkeiten birgt. Deshalb empfiehlt es sich, um - wie in diesem Fall für die Ammonium- und Nitritoxidierer angestrebt - ein möglichst umfassendes und verlässliches Bild von einer mikrobiellen Population *in situ* zu erhalten, nicht auf die Fähigkeiten einer Methode allein zu vertrauen, sondern, wenn möglich, verschiedene Herangehensweisen miteinander zu kombinieren, um so eine Plausibilitätsprüfung der erhaltenen Ergebnisse vornehmen zu können.

4.1.2 Populationsstruktur der Nitrifikantengemeinschaft

Die Nitrifikantengemeinschaft des hier untersuchten marinen Biofilms unterschied sich deutlich von den Gemeinschaften in den bisher bekannten Süßwassersystemen (Wagner & Loy, 2002; Wagner et al., 2002), wobei es sich hier sowohl um kommunale Kläranlagen als auch um

Versuchsreaktoren im Labormaßstab handelte. Wie zu erwarten, wurden überwiegend halotolerante und halophile Arten gefunden, die aus mariner Umgebung oder Brackwasserhabitaten stammten. Allerdings gab es auch Ausnahmen, wie etwa die Mitglieder der *Nitrosomonas communis/nitrosa*-Gruppe bei den AOB und die *Nitrospira moscoviensis*-verwandten Spezies bei den NOB.

Mit einem Anteil von 6,7% aller *Bacteria* waren die *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten Spezies die häufigsten AOB im Tropfkörperbiofilm der Aquakultur. Diese Lineage wurde vor noch nicht allzu langer Zeit basierend auf einigen wenigen Isolat- und Klonsequenzen aus verschiedenen Küstenregionen beschrieben (Purkhold et al., 2003). Innerhalb der letzten beiden Jahre wurden weitere zur *Nitrosomonas* sp. Nm143-Linage gehörige Sequenzen in Proben aus Ästuaren (Bernhard et al., 2005; Freitag et al., 2006), der Bucht von Tokio (Urakawa et al., 2006) und einer marinen Aquakultur (Itoi et al., 2006) identifiziert. Der nächste kultivierte Verwandte zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Klonsequenzen war das Isolat *Nitrosomonas* sp. NS20 (Sequenzähnlichkeit auf 16S rRNA-Ebene 98-99%, auf *amoA*-Ebene 97%). Es wurde aus einem stark verschmutzten und eutrophierten Bereich der Bucht von Tokio, Japan isoliert (Urakawa et al., 2006). Trotz ihrer Herkunft aus verschiedenartigen Habitaten scheinen AOB der *Nitrosomonas* sp. Nm143-Lineage einen moderaten Salzbedarf (Brackwasser- bis Küstenregionen) und eine Vorliebe für niedrige bis mäßige Ammoniumkonzentrationen (5 - 300 µM) gemeinsam zu haben. Die in der Aquakultur gefundenen *Nitrosomonas* sp. Nm143-ähnlichen AOB scheinen deshalb gut an die Bedingungen in dem marinen Biofilter angepasst zu sein. Angesichts der weiten Verbreitung dieser Art ist es denkbar, dass ihr Auftreten in anderen abwasserbehandelnden Systemen bisher nur weitestgehend übersehen oder falsch eingeordnet wurde, da entweder ihre DNA mit der verwendeten Extraktionsmethode nicht extrahiert werden konnte und/oder die irreführenden positiven Hybridisierungsergebnisse mit Sonde NEU23a auf die Anwesenheit von *Nitrosomonas europaea/eutropha*-verwandten Arten hindeuteten (s. o.).

Die zweite in situ relevante AOB-Spezies (2,2 % aller *Bacteria*), *Nitrosomonas marina* Cluster 2, konnte mit mehreren Klonsequenzen (Burrell et al., 2001; Grommen et al., 2005) und einem Isolat (*Nitrosomonas* sp. Is343; Bollmann et al., unveröffentlicht) in Verbindung gebracht werden, die alle aus Habitaten verschiedener Salinität, jedoch durchgängig niedriger Ammoniumkonzentration stammten. Deshalb weist das Vorkommen dieser *Nitrosomonas marina*-ähnlichen AOB vermutlich eher auf niedrige Ammoniumkonzentrationen als auf einen bestimmten Salzgehalt hin.

Angesichts der (leicht unterschiedlichen) Spanne an Lebensräumen, in denen die beiden Gruppen nachgewiesen wurden, lässt sich vermuten, dass beide Arten unter den normalerweise niedrigen Ammoniumkonzentrationen in der Marikultur gut wachsen können, dass die *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandten Spezies während der wiederkehrenden Substratpeaks nach dem Füttern aber möglicherweise einen leichten Vorteil haben. Die Koexistenz multipler AOB-Populationen in Biofilmen als Folge von fluktuierenden Substrat-(oder Sauerstoff-)konzentrationen wurde bereits mehrfach postuliert (Daims et al., 2001b; Gieseke et al., 2001, 2003). Ein ursächlicher Zusammenhang konnte aber bisher noch nicht endgültig nachgewiesen werden.

Weitere, allerdings nur in sehr geringer Zahl vorgefundene β -AOB (zusammengenommen < 1% der *Bacteria*) waren Mitglieder der Lineages *N. cryotolerans*, *N. europaea/Nc. mobilis*, *N. communis/nitrosa* und *Nitrosospira*. Die beiden Gruppen *N. cryotolerans* und *N. europaea/Nc. mobilis* umfassen halophile und halotolerante Arten. *N. cryotolerans* wurde ursprünglich im Katsina Bay, Alaska (Jones et al., 1988) isoliert. Seither wurde das Vorkommen dieser Gruppe nur von einer marinen Aquakultur berichtet (Tal et al., 2003), die dem hier untersuchten System sehr ähnlich ist. Mitglieder der Lineage *N. europaea/Nc. mobilis* stellten dagegen die dominante Spezies in einer Reihe verschiedener Systeme dar. Dabei handelte es sich beispielsweise um Aquarien verschiedener Salinität (Hovanec et al., 1998; Burrell et al., 2001), nitrifizierende Biofilme (Schramm et al., 1996; Okabe et al., 1999) und Belebtschlamm (Mobarry et al., 1996; Wagner et al., 1996; Juretschko et al., 1998 und 2002). Ein allen Systemen gemeinsamer Parameter waren hohe bis sehr hohe Ammoniumkonzentrationen im Bereich von mehreren mM. Die Vorliebe für Habitate mit hohen Ammoniumkonzentrationen ist eine mögliche Erklärung, warum Mitglieder dieser Gruppe sich in dem hier untersuchten System mit seinen sehr niedrigen Ammoniumkonzentrationen (durchschnittlich 30 μ M) nicht durchsetzen konnten. Typische Habitate für *N. communis* und *N. nitrosa* sind Böden bzw. eutrophierte Gewässer (Koops et al., 2003); letztere Art wurde auch gelegentlich in mariner Umgebung oder in Kläranlagen gefunden. Bei den Vertretern der *N. communis/nitrosa*-Gruppe könnte es sich deshalb - ebenso wie bei den *Nitrosospira moscoviensis*-verwandten NOB (s. u.) - um Überbleibsel aus der Anlaufphase des Systems handeln, als dieses noch mit Süßwasser betrieben wurde. Gleiches gilt für Angehörige des Genus *Nitrosospira*, die v. a. in Böden verbreitet sind und gelegentlich auch im Süßwasser vorkommen (Koops et al. 2003). In verschiedenen molekularen Studien wurden Nitrosospiren auch in mariner Umgebung detektiert (z. B. Hollibaugh et al., 2002; Freitag & Prosser, 2004; Molina et al., 2007). Es existieren jedoch keine marinen Isolate und von den kultivierten Stämmen ist kein Salzbedarf bekannt (Koops et al., 2003).

Der maximale genetische Abstand innerhalb der betaproteobakteriellen AOB beträgt ca. 89% (Koops et al., 2003). 90% 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit zu *Nitrosospira briensis* und die für AOB-Aggregate typische Morphologie (siehe Kap. 3.1.2.3, Abb. 21G) machten die Vertreter der „potentiellen AOB“ deshalb zu Kandidaten für eine neue AOB-Gruppe. Weitere Sequenzen dieser Gruppe wurden bereits zuvor in für Nitrifikanten typischen Habitaten wie Boden, Bioreaktoren und Belebtschlamm gefunden (LaPara et al., 2000; Juretschko et al., 2002; Kim et al., 2007). Allerdings sprechen das Fehlen einer tiefabzweigenden betaproteobakteriellen *amoA*-Sequenz und die nicht nachweisbare CO₂-Fixierung unter nitrifizierenden Bedingungen (s. u.) eher gegen die Fähigkeit dieser Gruppe zur Nitrifikation.

Vor kurzem wurden zu den *Crenarchaeota* gehörige Ammoniumoxidierer (AOA) mit der Nitrifikation in marinen Systemen in Verbindung gebracht (Hallam et al., 2006; Beman & Francis, 2006). Verschiedene *amoA*-Sequenzen wurden in marinen Proben und auch schon in Belebtschlamm detektiert (Francis et al., 2005; Park et al., 2006). In dem hier untersuchten System war die *amoA*-Diversität sehr gering und selbst unter der Annahme, dass alle mit CARD-FISH detektierten *Crenarchaeota* (0,1% des gesamten Biovolumens) tatsächlich auch Ammoniumoxidierer waren, wäre ihr Beitrag zur gesamten Ammoniumoxidation nur von geringer Bedeutung. Allerdings waren die Klonsequenzen aus der Marikultur näher mit dem aus einem Meerwasser-aquarium stammenden Isolat „*Cand. Nitrosopumilus maritimus*“ (Könnecke et al., 2005) verwandt (97% Ähnlichkeit auf Nukleinsäureebene) als alle anderen *amoA*-Sequenzen von *Crenarchaeoten*, die bisher aus Umweltproben amplifiziert wurden.

Die dominanten NOB (17,5% aller *Bacteria*) waren nahe verwandt zu dem marinen Nitritoxidierer *Nitrospira marina*. Sequenzen dieser als *Nitrospira* Lineage IV bezeichneten Gruppe (Daims et al., 2001a) wurden zuvor schon in Salzwasseraquarien (Hovanec et al., 1998) und einem marinen Biofilter (Tal et al., 2003) identifiziert. Darüber hinaus fanden sich auch einige wenige Aggregate einer mehr *N. moscoviensis*-verwandten Gruppe, die bisher nur in Süßwassersystemen gefunden wurden (z. B. Schramm et al., 1998). Die hohe Abundanz der *N. marina*-ähnlichen NOB (nahezu zweimal das Biovolumen der AOB, was - durch ihre geringere Größe bedingt - verglichen mit den AOB eine ungefähr vierfache Zellzahl bedeutet) ähnelt der Situation in Süßwasserhabitaten mit geringen Ammoniumkonzentrationen (Schramm et al., 1999; Altmann et al., 2003), wo Süßwasserarten von *Nitrospira* den AOB zahlenmäßig ebenfalls weit überlegen waren. Diese zahlenmäßige Dominanz verschiedener Nitrospiren über die Ammoniumoxidierer ist deshalb möglicherweise ein generelles Merkmal ammoniumlimitierter Systeme.

Zusammenfassend beherbergte der marine Biofilter eine sehr diverse Nitrifikantengemeinschaft aus überwiegend halotoleranten und halophilen Arten, die sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von den bisher bekannten Süßwassergemeinschaften unterschied und gut an die niedrigen Ammoniumkonzentrationen im System angepasst zu sein schien. Erstmals wurden *Nitrosomonas* sp. Nm143-verwandte Arten als dominante AOB-Spezies in einem Biofilter ausgemacht. Darüber hinaus war - im Verhältnis zur Größe der AOB-Population - die Abundanz der *Nitrospira marina*-verwandten NOB-Population ungewöhnlich hoch. Die Ursache für die Koexistenz zweier AOB-Populationen könnte in den fluktuierenden Substratkonzentrationen zu suchen sein.

4.1.3 Aktivität der Nitrifikantengemeinschaft

4.1.3.1 In situ-Kinetik

Die kombinierte N-Oxidationsaktivität des marinen nitrifizierenden Biofilms war vergleichbar mit der von Süßwassersystemen, wo - in Abhängigkeit von Substratkonzentration etc. - lokale Nitrifikationsraten von unter 10 bis etwa 100 $\mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ gemessen wurden (z. B. Schramm et al., 1996; Okabe et al., 1999a; Schramm et al., 1999; Gieseke et al., 2003; Okabe et al., 2004).

Wie die beobachtete Aktivität ohne externe Zugabe von Ammonium zeigt, barg der Biofilm selbst eine endogene Ammoniumquelle. Dabei kann es sich um an der Biofilmmatrix adsorbiertes (Nielsen et al., 1996) und/oder um durch Biomasseabbau endogen nachgeliefertes Ammonium handeln. Die Aktivität ging durch langzeitige Inkubation in ammoniumfreiem Medium zwar zurück, verschwand jedoch nie völlig, was auf den allmählichen Verbrauch von adsorbiertem Ammonium und/oder die Erschöpfung der Vorräte an leicht abbaubaren Substanzen, die als Ammoniumquellen dienen können, hindeutet.

Die Hypothese von der Existenz einer Population mit hoher und einer Population mit niedrigerer Ammoniumaffinität (siehe Kap. 1.4 u. 4.1.2) konnte durch die Kinetik der Ammoniumoxidation nicht erhärtet werden. Am besten wurde die Reaktion durch die Kombination einer Ein-Enzym-Michaelis-Menten-Kinetik mit einem eindimensionalen Diffusionsreaktionsmodell beschrieben (siehe Kap. 3.1.3.1.2). Die Anwendung einer Zwei- oder Mehr-Enzym-Kinetik hatte dagegen keine bessere Korrelation zur Folge. Statt einer deutlichen Verlagerung der Aktivität von einer Population mit hoher Substrataffinität und niedriger maximaler Umsatzgeschwindigkeit

keit (v_{\max}) zu einer Population mit geringerer Affinität und hoher maximaler Geschwindigkeit, sprechen die gemessenen Raten eher für eine „gemischte“ Reaktion der einzelnen Populationen, die graduell unterschiedlich zur Gesamtumsatzrate beitragen. Dieser relative Beitrag hing dabei vermutlich von der ihnen eigenen Kinetik sowie der Position der Zellen im Biofilm ab.

Wie die gemittelte in situ-Kinetik zeigt, reagierte die Nitrifikantengemeinschaft über einen weiten Konzentrationsbereich sehr dynamisch auf das angebotene Substrat. Der lineare Bereich der Kinetik reichte über die Ammoniumkonzentrationen, wie sie in der Anlage normalerweise vorlagen, weit hinaus und deckte auch die gemessenen Spitzenkonzentrationen von über 100 μM (Gelfand et al., 2003) noch ab. Der nitrifizierende Biofilter schien folglich in der Lage zu sein, sowohl mit den normalerweise sehr geringen Ammoniumkonzentrationen zurechtzukommen als auch die periodisch auftretenden Peaks gut zu bewältigen.

Schon in der Vergangenheit wurden $K_M(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$ -Werte für verschiedene Isolate und Umweltproben bestimmt. Sie lagen bei 70 μM für Mischkulturen aus Brackwassersedimenten (Knowles et al., 1965) und zwischen 75 μM (*Nitrosomonas oligotropha*) und 750 μM (*Nitrosomonas europaea/eutropha*) für AOB-Isolate, die ebenfalls aus einem Brackwasserhabitat stammten (Stehr et al., 1995). Für die marine Art *Nitrosococcus oceani* wurde ein K_M von 200 μM gemessen (Montoya et al., 2002). Für Reinkulturen verschiedener *Nitrospira*-Stämme wurden K_M -Werte von 170 bis 320 μM angegeben (Jiang & Bakken, 1999). In situ wurde für einen Biofilm mit *Nitrospira* sp. als dominanter AOB-Population dagegen ein K_M von 40 μM ermittelt (Schramm et al., 1999). Der in dem hier untersuchten marinen Biofilm bestimmte K_M -Wert liegt mit knapp 300 μM im Zentrum des bekannten Datenspektrums, erscheint angesichts der geringen Ammoniumkonzentrationen im System jedoch relativ hoch. Ein möglicher Grund sind Vorkommen und Beitrag zur Ammonium-/Nitritoxidation mehrerer AOB- und NOB-Populationen, die jeweils unterschiedlich auf sich verändernde Substratkonzentrationen reagierten. Die zellspezifischen Ammoniumoxidationsraten, die für die Mischpopulation von *Nitrosomonas* sp. Nm143 und *Nitrosomonas marina* bestimmt wurden (ca. 0,4 bis 3,7 $\text{fmol Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$; v_{\max} ca. 4,1 $\text{fmol Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$), liegen im Bereich dessen, was für *Nitrosococcus mobilis* in Belebtschlamm (Wagner et al., 1996) und *Nitrospira* sp. in einem Fließbettreaktor (Schramm et al., 1999) ermittelt wurde, und kommen den für eine *Nitrosomonas marina*-Reinkultur angegebenen Werten von 0,9 - 4,9 $\text{fmol gebildetem NO}_2^- \text{Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Glover, 1985) sehr nahe.

Die für den marinen Biofilm gemessene in situ-Kinetik steht folglich im Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien, auch wenn die ermittelten Werte für K_M und v_{\max} angesichts der meist sehr niedrigen NH_4^+ -Konzentrationen in der Aquakultur relativ hoch erscheinen. Mögli-

cherweise ist jedoch genau dies der Grund, dass das System sehr flexibel auf Schwankungen in der Ammoniumkonzentration reagieren und auch Spitzenwerte nach dem Füttern abfangen kann. Die postulierte Nischendifferenzierung in eine hoch affine und eine weniger affine AOB-Population wurde von der Kinetik der Ammoniumoxidation nicht unterstützt.

4.1.3.2 Aktivität einzelner Populationen

Auch das MAR-FISH-Experiment zeigte nicht die postulierte Nischendifferenzierung bezüglich der Substrataffinität in eine hoch affine und eine weniger affine AOB-Population (siehe Kap. 1.4 u. 4.1.2). Stattdessen demonstrierte es, dass beide AOB-Populationen schon bei geringen Ammoniumkonzentrationen gleichermaßen aktiv waren (siehe Kap. 3.1.3.2). Damit unterstützt es die Interpretation der Mikrosensordaten als „gemischte“ Antwort der einzelnen Stämme, die graduell unterschiedlich zur Gesamtumsatzrate beitragen (s. o.).

Für die Gruppe der potentiellen AOB konnte keine Kohlenstoffaufnahme in Gegenwart von NH_4^+ nachgewiesen werden. Da diese Gruppe sehr kleine Aggregate bildet, die darüber hinaus meist in nächster Nähe zu AOB- und NOB-Clustern mit starken MAR-Signalen lagen, besteht eine geringe Chance, dass schwache Signale von diesen Zellen übersehen wurden. Da auch keine tiefabzweigende *amoA*-Sequenz detektiert wurde (s. o.), handelt es sich bei dieser Gruppe aber höchstwahrscheinlich nicht um Ammoniumoxidierer.

Da zum Zeitpunkt der Durchführung der MAR-Experimente keine Informationen über die im Tropfkörper vorherrschenden Ammoniumkonzentrationen vorlagen, orientierten sich die für die MAR-Inkubationen eingesetzten NH_4^+ -Konzentrationen an den Ergebnissen der Mikrosensormessungen. In diesem Zusammenhang wurden eine Substratkonzentration weit unterhalb des beobachteten $K_M(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$ von 294 μM und eine Konzentration im Sättigungsbereich (50 μM bzw. 2000 μM NH_4^+) gewählt. Angesichts der sehr viel geringeren in situ vorherrschenden Ammoniumkonzentrationen besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Populationen feiner waren, als die gewählten Inkubationsbedingungen zeigen konnten. Darüber hinaus waren statt einiger Tage (Lee et al., 1999; Nielsen et al., 1999) Expositionszeiten von mehreren Wochen erforderlich, bis ein MAR-Signal beobachtet werden konnte. Diese langen Expositionszeiten lassen sich auf die geringe Aktivität des eingesetzten, radioaktiv markierten Bicarbonats (220 kBq pro μmol CO_3^{2-}) zurückführen. Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf die anhand des MAR-Signals beobachtete, relative Aktivität der einzelnen Nitrifikantenpopulationen zueinander haben.

Trotz dieser experimentellen Schwierigkeiten und der Möglichkeit, dass sehr feine Unterschiede zwischen den beiden dominierenden AOB-Populationen nicht erfasst werden konnten, war das MAR-FISH-Experiment geeignet, den Aktivitätsbereich der wichtigsten AOB- und NOB-Populationen aufzuzeigen. Die fehlenden Unterschiede zwischen *Nitrosomonas* sp. Nm143- und *N. marina*-verwandter Population sprachen - wie auch die in situ-Kinetik - gegen die Hypothese der zeitlichen Einnischung in Abhängigkeit von der gerade vorherrschenden Substratkonzentration. Die Aktivität der „potentiellen AOB“ konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Nur drei (*Nitrosomonas* sp. Nm143, *Nitrosomonas marina*, Cluster 2 und *Nitrospira marina*) der mindestens 10 verschiedenen, im Biofilm detektierten Nitrifikantenpopulationen waren von ihrer Quantität her auch in situ relevant. Um zu diesem Ergebnis zu kommen waren wiederholte Runden von DNA-Extraktion, PCR, Klonierung, Sequenzierung und FISH-Analyse erforderlich.

Das Auftreten von zwei in situ relevanten AOB-Populationen zusammen mit den wechselnden Operationsbedingungen (normalerweise sehr niedrige Ammoniumkonzentrationen von $\sim 20 \mu\text{M}$ und wiederkehrende Peaks nach dem Füttern) legte die unterschiedliche Einnischung der Populationen hinsichtlich ihrer Substrataffinität nahe (s. o.). Dieser Hypothese zufolge müsste es eine Population mit hoher Substrataffinität und dafür geringerer maximaler Umsatzgeschwindigkeit geben, was ihr einen Vorteil während der normalerweise vorherrschenden sehr geringen Ammoniumkonzentrationen verschaffen würde. Eine zweite Population mit etwas geringerer Substrataffinität, dafür aber höherer maximaler Umsatzgeschwindigkeit, wäre dagegen während der periodisch wiederkehrenden Substratpeaks im Vorteil (siehe Kap. 1.4).

Weder die Kinetik der Ammoniumoxidation (s. o.) noch das MAR-FISH-Experiment (s. o.) bestätigen jedoch diese Hypothese. Da es auch kein Muster in der räumlichen Verteilung der beiden Populationen innerhalb des Biofilms (wie z. B. eine Population an der Oberfläche, eine in tieferen Schichten) gab (siehe 3.1.2.3.2), ist weiter unklar, wie und warum es zur Koexistenz dieser beiden Populationen kommt. Möglicherweise leben beide Artengruppen hinsichtlich mehrerer Faktoren am Rande ihrer physiologischen Möglichkeiten in einem Überlappungsbereich, wo keine von beiden die Oberhand gewinnen kann. Um dem nachzugehen ist eine zwei- oder mehrdimensionale Betrachtungsweise erforderlich. Zukünftige Studien müssen deshalb neben der Reaktionskinetik auch andere Faktoren wie z. B. Wachstumsertrag, Grundenergiebedarf, Widerstandsfähigkeit gegenüber Grazern oder Anfälligkeit für Viren berücksichtigen.

Dennoch scheint gerade diese gemischte Nitrifikantenpopulation mit ihrer flexiblen Reaktion auf Ammonium über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg gut geeignet, um den Systemanforderungen gerecht zu werden. Denn sie vermag einerseits mit sehr niedrigen Ammoniumkonzentrationen auszukommen und andererseits auch Spitzenkonzentrationen, wie sie beispielsweise nach dem Füttern auftreten, abzufangen. Die gemessene in situ-Kinetik deutet ferner darauf hin, dass der Tropfkörper auch noch höhere Konzentrationen, als sie bisher im System gemessen wurden, verkraften könnte. Dies stellt einen wichtigen Punkt für den sicheren Betrieb der Aquakultur dar, in der es gilt, das Auftreten von für Fische toxischen NH_3 -Konzentrationen auf alle Fälle zu vermeiden.

4.2 Nitratreduzierende Prozesse

4.2.1 Bedeutung der verschiedenen Prozesse

Denitrifikationsaktivität wurde in allen drei Biofiltern gefunden. In einem ^{15}N -Tracerexperiment wurden im DB ca. 30 - 60% des Nitrat-N über den Prozess der Denitrifikation zu N_2 umgesetzt (Kap. 3.2.1). Dabei waren die Anteile im oberen Teil der Schlammschicht (50 - 60%) deutlich höher als unten nahe des Bodens (30 - 40%). Im FBR betrug der Anteil des in diesem Experiment zum N_2 umgesetzten Nitrats durchgängig knapp 20%. N_2O -Bildung wurde kaum festgestellt. Da auch keine Anzeichen für Anammox vorlagen (s. u.), ist anzunehmen, dass das restliche Nitrat über den Prozess der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) umgesetzt und/oder durch Assimilation vorübergehend in Biomasse festgelegt wurde. Andersherum bedeutet die Tatsache, dass Nitrat-N bestenfalls zu 50 - 60% über Denitrifikation aus dem System entfernt wurde, dass ein erheblicher Teil des Stickstoffs das System nicht verließ und über kurz oder lang als Ammonium in den Kreislauf zurückgeführt wurde, was mit der Zeit zu einer erheblichen N-Akkumulation führen müsste. Hingegen zeigten frühere Messungen über längere Zeiträume, dass TAN-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen im Fischbecken sich nach anfänglichen Schwankungen auf einem Level von rund 0,5, 0,2 bzw. 30 mg N/l einpendelten (Gelfand et al., 2003). Folglich scheint die Denitrifikationsaktivität auszureichen, um ein Gleichgewicht zwischen N-Zufuhr, internem Umsatz und Entfernung herzustellen und die Nitratkonzentrationen auf kontrolliert hohem Level zu halten.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Anteile der Denitrifikation im oberen und unteren Teil der Schlammschicht des DB ist die normalerweise vorliegende Stratifikation von sauerstoffabhängigen Prozessen in der Wassersäule und dem obersten Teil der Schlammschicht über Nitratreduktion/Denitrifikation hin zu Sulfatreduktion, Fermentation und DNRA in größerer Tiefe (Cytryn et al., 2003). In einer Probe aus dem oberen Bereich ist daher eher mit Vorkommen und Aktivität fakultativer Organismen zu rechnen, die auf Nitratreduktion umschalten können, wenn die Bedingungen anaerob werden. Unten ist dagegen eher die Aktivität obligat anaerober Organismen mit fermentativem Metabolismus zu erwarten, die oft zur DNRA befähigt sind (Tiedje, 1988; Zumft, 1997). Folglich wurden mit der separaten Beprobung im oberen und im unteren Bereich der Schlammsäule möglicherweise die Aktivität und die Reaktion auf Nitrat zweier unterschiedlicher mikrobieller Populationen erfasst. Darüber hinaus könnten auch Alter und Beschaffenheit des Schlammes (z. B. leichter verfügbare C-Quellen in frischerem Schlamm)

einen Einfluss auf die ablaufenden Prozesse haben (Cytryn et al., 2003). Ein direkter Einfluss von Sulfid auf das Verhältnis von Denitrifikation zu DNRA (siehe Kap. 4.2.3) ist in diesem Fall dagegen unwahrscheinlich, da das Sulfid vor Beginn des Experiments durch Begasung mit N_2 weitestgehend ausgetrieben wurde und auch keine verstärkte N_2O -Bildung festzustellen war, die normalerweise mit der Gegenwart von Sulfid einhergeht (s. u.). Bei obigem Versuch handelt es sich auch nur um ein einmalig durchgeführtes Experiment, das nicht vollkommen verallgemeinert werden kann. In einem späteren Experiment an DB-Schlamm aus dem Nachfolgesystem (Mischprobe), das eigentlich zur Untersuchung des Einflusses von Sulfid durchgeführt wurde (Schwermer et al., unveröffentlicht; s. u.), lag der Anteil des zu N_2 umgewandelten Nitrat in Gegenwart geringer Sulfidkonzentrationen mit 80 - 90% z. B. deutlich höher als in dem ersten Tracerexperiment (s. o.). Der Anteil von gebildetem Ammonium wurde hier mit 10 - 20% bemessen. Insgesamt zeigen die ^{15}N -Experimente, dass im DB sowohl Denitrifikation als auch DNRA eine signifikante Rolle spielen. Darüber hinaus liefern sie (grobe) Richtwerte zur Größenordnung beider Prozesse, wobei das Verhältnis von Denitrifikation und DNRA zueinander aber von vielen Faktoren abhängig zu sein scheint und über die Zeit stark variieren kann.

Die im FBR anhand des ^{15}N -Tracerexperiments festgestellte relativ geringe Denitrifikationsaktivität (s. o.) hängt möglicherweise direkt mit dem vorherigen Austreiben des Sulfids zusammen. Denn in dem stark C-limitierten FBR ist die nitratabhängige Sulfidoxidation ein unter anaeroben Bedingungen nachweislich in hohem Maße ablaufender Prozess (Cytryn et al., 2005b). Es ist also wahrscheinlich, dass in Gegenwart der üblichen Sulfidkonzentrationen eine wesentlich höhere Denitrifikationsaktivität festzustellen gewesen wäre als unter den experimentellen Bedingungen.

Wie aus den Mikrosensorprofilen ersichtlich (Kap. 3.1.3.1, Abb. 22), fand auch in den tieferen Schichten des Tropfkörperbiofilms Denitrifikation statt. Der unter sauerstofflimitierten Bedingungen gemessene Nitratverbrauch kann vom Prozess der Nitrifizierendenitrifikation (Poth & Focht, 1985; Poth, 1986; Freitag et al., 1987; Bock et al., 1995; Schmidt & Bock, 1997) herrühren, er kann aber auch auf das Konto der im Tropfkörper nachgewiesenen Denitrifikanten gehen (s. u.). Unter in situ-Bedingungen spielt die Denitrifikationsaktivität im TF-Biofilm aber wahrscheinlich höchstens lokal eine Rolle, da bei den üblichen Ammoniumkonzentrationen und Biofilmdicken kaum Sauerstofflimitationen auftreten sollten (Kap. 3.1.3.1, Abb. 22).

Anammox wurde in zahlreichen Brackwasserhabitaten, marinen Systemen (Thamdrup & Dalsgaard, 2002; Dalsgaard et al., 2003; Kuypers et al., 2003 u. 2005; Trimmer et al., 2003 u. 2006; Rysgaard et al., 2004; Meyer et al., 2005; Tal et al., 2005; Thamdrup et al., 2006) und

kürzlich auch in Süßwasserhabitaten (Penton et al., 2006; Schubert et al., 2006) nachgewiesen. Ursprünglich entdeckt wurde der Prozess in Bioreaktoren zur Abwasserbehandlung (van de Graaf et al., 1995; Mulder et al., 1995), wo er mittlerweile gezielt zur Stickstoffentfernung eingesetzt wird (z. B. Strous et al., 1997; Toh et al., 2002; Egli et al., 2003; Dapena-Mora et al., 2004; Wang & Jing, 2005; Yang et al., 2007). Dabei handelte es sich bis vor kurzem ausschließlich um Süßwassersysteme. Kürzlich wurde der Anammox-Prozess jedoch auch erfolgreich auf Abwässer mit hoher Salinität angewandt (Dapena-Mora et al., 2006). Darüber hinaus gelang die Anpassung einer ursprünglichen Süßwasserpopulation an saline Bedingungen (Kartal et al., 2006). Auch von einer marinen Aquakultur wurde das Vorkommen von Anammox-Bakterien berichtet (Tal et al., 2003; Tal et al., 2006). Allerdings ist hier noch nicht untersucht, wie relevant dieser Prozess unter in situ-Bedingungen tatsächlich ist. Im Rehovot-System wurden dagegen keine Hinweise auf den Anammox-Prozess gefunden (Kap. 3.2.1). Ein möglicher Grund dafür sind die teilweise sehr hohen Sulfidkonzentrationen (Cytryn et al., 2003), die sich inhibierend auf den Anammox-Prozess auswirken (Kalyuzhnyi et al., 2006; Dapena-Mora et al., 2007).

Insgesamt lässt sich sagen, dass nitratreduzierende Prozesse (Denitrifikation und DNRA) in allen drei Biofiltereinheiten vorhanden waren. Sie spielten v. a. in DB und FBR eine Rolle, während sie im TF unter in situ-Bedingungen vermutlich vernachlässigbar gering waren. Die Anteile der Denitrifikation an der gesamten Nitratreduktion in DB und FBR waren teilweise geringer als erwartet, was sich mit der Wahl der experimentellen Bedingungen und/oder räumlichen und zeitlichen Schwankungen im System erklären lässt. Insgesamt schien die Denitrifikationsaktivität jedoch ausreichend, um ein Gleichgewicht zwischen N-Zufuhr und -Entfernung aufrecht zu erhalten. Anammox konnte nicht nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die Inhibition des Anammox-Prozesses durch Sulfid.

4.2.2 Verantwortliche Organismen

4.2.2.1 Kultivierungsabhängige Analyse

4.2.2.1.1 Erfolg des Kultivierungsexperiments

Der Erfolg kultivierungsabhängiger Studien hängt maßgeblich von der Eignung der angewandten Techniken ab. Um Nitratreduzierer und Denitrifikanten aus dem System zu isolieren wurde deshalb versucht, einerseits selektive Bedingungen für diese Gruppe zu schaffen, anderer-

seits die in situ-Situation in der Aquakultur mit einzubeziehen. Da Denitrifikationsaktivität schwerpunktmäßig im DB erwartet wurde (Cytryn et al., 2003), orientierte sich die Wahl von Medien und Inkubationsbedingungen an den dort vorherrschenden Bedingungen. Berücksichtigt wurden Faktoren wie pH-Wert, in situ vorherrschende Nitratkonzentrationen und das Spektrum an potentiell vorhandenen C-Quellen (siehe Kap. 3.2.2.1, Tab. 26). Durch die aerobe Probenahme und die teils aerobe Behandlung bei der Kultivierung wurden mikroaerophile und strikt anaerobe Organismen von vornherein aus der Analyse ausgeklammert. Dies schien jedoch gerechtfertigt, da es sich bei den meisten Denitrifikanten um fakultative Organismen handelt (Zumft, 1992 u. 1997). Darüber hinaus herrschten in keinem der Teilsysteme vollständig anaerobe Bedingungen und die Organismen waren deshalb auch in situ sehr wahrscheinlich immer wieder dem Einfluss von Sauerstoff ausgesetzt (Cytryn et al., 2003 u. 2005b; TF: Mikrosensormessungen siehe Kap. 3.1.3.1).

Durch die Wahl von Nitrat für Inkubation und Screening wurden Arten, die erst ausgehend von Nitrit denitrifizieren können, größtenteils nicht mit erfasst. Andererseits war dieser Schritt nötig, um auch diejenigen Gruppen zu erfassen, die nur zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit befähigt sind. Wie sich im Nachhinein herausstellte, war ferner der Test auf Gasproduktion nur bei einigen ausgewählten Vertretern jeder per RFLP-Screening festgelegten Gruppe (siehe Kap. 2.6.2) möglicherweise unzureichend, um die Fähigkeit bzw. Unfähigkeit der gesamten Gruppe zur Denitrifikation zu belegen. Denn innerhalb mancher Gruppen war diese Eigenschaft sehr variabel (siehe Kap. 3.2.2.3), so dass einige Artengruppen möglicherweise „nur“ als Nitratreduzierer eingestuft wurden, obwohl sie auch Denitrifikanten enthielten. Insgesamt erwiesen sich die angewandten Methoden jedoch als geeignet, um eine Vielzahl von Nitratreduzierern und Denitrifikanten aus der Aquakultur zu gewinnen.

Was die Ausbeute an „echten“ Denitrifikanten betrifft, hatten die angewandten Kultivierungs- und Screeningstrategien keine so hohe Erfolgsquote wie die im Rahmen einer groß angelegten, auf die effektive Kultivierung von Denitrifikanten abzielende Studie entwickelten Techniken (Heylen et al., 2006a). Dort waren 40 - 80% der Isolate Denitrifikanten. Im Endeffekt wurden 53 verschiedene Artengruppen identifiziert, während es in der Aquakultur nur 15 waren. Berücksichtigt man jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit auch Arten mit erfasst werden sollten, die Nitrat nur zu Nitrit (oder weiter zu Ammonium) reduzierten, erbrachten die verwendeten Methoden ebenfalls einen Anteil von gut 60% positiver Isolate und die Ausbeute an verschiedenen Arten (41 Stück) war bei einer Anzahl von insgesamt 780 gescreenten Isolaten sogar etwas höher als eine Ausbeute von 53 Arten bei einer Anzahl von rund 1180 gescreenten Isolaten.

Mit 66% aller Arten überwogen - wie in vergleichbaren Arbeiten (s. u.) - auch hier die Proteobakterien. Insgesamt wurde eine ähnliche Bandbreite phylogenetischer Gruppen gefunden wie bei Heylen et al., 2006a. In anderen Arbeiten war das kultivierte Artenspektrum dagegen deutlich geringer und beschränkte sich mit wenigen Ausnahmen auf einige Gruppen innerhalb der *Proteobacteria* (z. B. Magnusson et al., 1998; Labbé et al., 2003; Yoshie et al., 2004a; Goregues et al., 2005). In einem Fall wurden sogar fast nur Pseudomonaden isoliert, während sich mit kultivierungsunabhängigen Methoden die *Betaproteobacteria* als die wichtigste Gruppe erwiesen und Pseudomonaden in situ kaum eine Rolle spielten (Lee et al., 2002).

Während in Proben aus kommunalen Kläranlagen Betaproteobakterien die wichtigste Gruppe bildeten (Magnusson et al., 1998; Heylen et al., 2006a), spielten in einem marinen Aquarium und in Reaktoren zur Behandlung saliner Abwässer Gammaproteobakterien die größere Rolle (Yoshie et al., 2001 u. 2006b; Labbé et al. 2003). Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen von auf in situ-Techniken basierenden Studien (Snaidr et al., 1997; Juretschko et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshie et al., 2004a; Ginige et al., 2005). Auch aus marinen Sedimenten wurden überwiegend Gammaproteobakterien isoliert (Goregues et al., 2005). In der marinen Aquakultur waren von der Anzahl der isolierten Spezies her dagegen die *Alphaproteobacteria* mit 34% die wichtigste Gruppe. Erst dann kamen die *Gammaproteobacteria* (22%), gefolgt von den *Actinobacteria* (17%), den *Betaproteobacteria* und *Bacteroidetes* (jeweils 10%) und *Firmicutes* (7%).

Trotz einiger Einschränkungen erwies sich der Kultivierungsansatz folglich als geeignet, um eine Vielzahl nitratreduzierender und denitrifizierender Arten aus der Aquakultur zu isolieren. Wie in vergleichbaren Studien überwogen auch hier die Proteobakterien. Insgesamt wurde jedoch ein breites Spektrum verschiedener phylogenetischer Gruppen identifiziert. Während in kommunalen Kläranlagen, d. h. in Süßwassersystemen, die Betaproteobakterien die wichtigste Gruppe darstellten und in verschiedenen Salzwassersystemen die Gammaproteobakterien am wichtigsten zu sein schienen, überwogen hier - an der Artenzahl gemessen - die Alphaproteobakterien.

4.2.2.1.2 Verteilung auf verschiedene Teilsysteme, Medien und Verdünnungsstufen

Vetreter der meisten Gruppen wurden aus mehr als einem der Teilsysteme isoliert, was angesichts der ständigen Zirkulation des Wassers aus dem Fischpool über die beiden Filterschleifen und zurück (siehe Kap. 2.1) auch nicht verwunderlich ist. Für einige der häufiger isolierten Arten

waren jedoch deutliche Schwerpunkte in der Verteilung auf die drei untersuchten Teilsysteme zu beobachten (siehe Kap. 3.2.2.2, Abb.27), was in Verbindung mit den Eigenschaften der verschiedenen Teilsysteme (siehe Kap. 2.1) und den Substraten, von denen die betreffenden Artengruppen isoliert wurden (s. u.), erste Hinweise auf ihre vermutliche Funktion geben kann. Während Pseudomonaden überwiegend im DB gefunden wurden, stammte z. B. die Gattung *Denitromonas* schwerpunktmäßig aus TF und FBR. Die verschiedenen *Rhodobacter*-verwandten Spezies wurden hauptsächlich aus dem FBR isoliert. Gleiches gilt für Mitglieder der Gattung *Hydrogenophaga*. *Actinobacteria* und *Firmicutes* fehlten im FBR dagegen völlig.

Auch hinsichtlich der verwendeten Medien waren mehr oder weniger deutliche Präferenzen für verschiedene Substrate zu erkennen (siehe Kap. 3.2.2.2, Abb.28). *Firmicutes* wurden beispielsweise nur von M6 isoliert, was vermuten lässt, dass diese Arten eine Rolle beim Abbau organischer Substanz im DB spielen. Die „*Cand. Rhodobacter denitrificans*“-Gruppe und andere eher selten gefundene Isolate wurden ausschließlich von M5 (Thiosulfatmedium) gewonnen. Möglicherweise handelte es sich dabei um langsamer wachsende Arten, die in den anderen, nährstoffreicheren Medien überwachsen wurden, unter C-limitierten Bedingungen (wie sie auch im FBR vorherrschen, Cytryn et al., 2005b) aber offensichtlich einen Vorteil hatten und/oder sogar Thiosulfat/Sulfid nutzen konnten.

Über die in situ-Relevanz der kultivierten Arten lässt sich nur bedingt eine Aussage treffen. Bei allen 30 Verdünnungsreihen fand Wachstum und - soweit sich das sagen lässt - auch Nitratverbrauch bis zur höchsten Verdünnungsstufe von 10^{-9} statt. Ein Großteil (90%) der gefundenen Artengruppen kam bis einschließlich Verdünnung 10^{-6} vor. Bis einschließlich Verdünnung 10^{-7} waren es noch 83%, bis Verdünnung 10^{-8} 63%. In Verdünnungsstufe 10^{-9} waren immerhin noch 41% der Isolate zu finden. Mit Ausnahme der *Bacteroidetes* waren hier auch noch Vertreter aller gefundenen phylogenetischen Großgruppen (Kap. 3.2.2.2, Abb.29) und noch 8 der insgesamt 15 denitrifizierenden Spezies vertreten.

In Summe wurden die meisten der identifizierten Artengruppen aus mehr als einem der drei untersuchten Teilsysteme isoliert. Jedoch waren z. T. deutliche Präferenzen für verschiedene Teilsysteme und/oder Medien erkennbar, was erste Vermutungen über das bevorzugte Habitat mancher Arten sowie ihre Funktion in der Aquakultur zulässt. Obwohl sich nicht sagen lässt, wo die Obergrenzen für den Prozess der Nitratreduktion/Denitrifikation und das Wachstum generell in den Biofilterproben anzusetzen sind, lässt das Vorkommen von Nitratreduzierern und Denitrifikanten bis in sehr hohe Verdünnungsstufen darauf schließen, dass den isolierten Arten zumindest auch teilweise eine Bedeutung in situ zukommt.

4.2.2.1.3 Vergleich der Isolate aus der Aquakultur mit dem Artenspektrum anderer Biofilter

4.2.2.1.3.1 Denitrifizierende Isolate

Ein Teil der in der Aquakultur gefundenen Denitrifikanten wurde bereits zuvor aus Biofiltern zur Abwasserbehandlung isoliert. Dabei handelt es sich um Angehörige der Gattungen *Ochrobactrum*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Enterococcus*. Sie wurden bisher überwiegend in Süßwasserreaktoren identifiziert (Magnusson et al., 1998; Wagner et al., 2002; Heylen et al., 2006a), im Fall von *Paracoccus* und *Pseudomonas* aber auch schon aus Salzwassersystemen isoliert (Labbé et al., 2003; Yoshie et al., 2001 bzw. 2004a u. 2006a).

Weitere für Abwasserhabitats typische Denitrifikanten der Genera *Thauera*, *Azoarcus*, *Dechloromonas* und *Zoogloea* (bzw. inzwischen *Shinella* (An et al., 2006)) (Fam. *Rhodocyclaceae*), *Comamonas*, *Acidovorax* und *Simplicispira* (Fam. *Comamonadaceae*), *Alcaligenes* (bzw. inzwischen *Castellaniella* (Kämpfer et al., 2006)) und *Achromobacter* (Fam. *Alcaligenaceae*) und *Hyphomicrobium* (Fam. *Hyphomicrobiaceae*) (z. B. Magnusson et al., 1998; Etchebere et al., 2001b u. 2002; Khan et al., 2002; Wagner et al., 2002; Ginige et al., 2005; Heylen et al., 2006a; Yoshie et al., 2006a) wurden über den Kultivierungsansatz in der Aquakultur dagegen nicht gefunden.

Mit molekularbiologischen Methoden konnte das Vorkommen einiger dieser Arten allerdings auch in den Biofiltern der Aquakultur nachgewiesen werden. Im Zuge eines allgemeinen 16S rRNA-basierten DGGE-Screenings und eines Screenings auf potentiell sulfidoxidierende Arten wurden Sequenzen von *Alcaligenes* und *Azoarcus* bzw. von *Thauera* identifiziert (Cytryn et al., 2003; Cytryn et al., 2005a, 2005b); als Nebenprodukt bei einer eigentlich auf β -AOB abzielenden PCR wurden ebenfalls *Azoarcus*-verwandte Sequenzen gefunden (siehe Kap. 3.1.2.2.1). Ein wesentliches Merkmal der beschriebenen *Thauera*- und *Azoarcus*-Spezies ist die Fähigkeit zum Abbau von Aromaten und anderer schwer abbaubarer Verbindungen unter denitrifizierenden Bedingungen (Anders et al., 1995; Etchebere et al., 2001b; Mechichi et al., 2002). In diesem Zusammenhang könnten sie deshalb auch in dem Aquakultursystem eine Rolle spielen. Dass aromatische Verbindungen als Substrate in dem Kultivierungsexperiment nicht berücksichtigt wurden, ist zugleich eine mögliche Erklärung, warum diese Arten mit dem Kultivierungsansatz nicht erfasst wurden.

Weitere Denitrifikanten, die speziell aus mit industriellen Abwässern mittlerer und hoher Salinität beschickten Reaktoren isoliert und dort als in situ relevant erachtet wurden, gehörten den Gattungen *Colwellia*, *Halomonas*, *Marinobacter* und *Vibrio* innerhalb der *Gammaproteobacteria*

an (Yoshie 2001 bzw. 2004a; Yoshie et al., 2006a). Mit Ausnahme von *Marinobacter* (und hier nur über kultivierungsunabhängige Methoden; Cytryn et al., 2005a) waren Hinweise auf diese Arten in der Aquakultur ebenfalls nicht vorhanden. Allerdings unterschieden sich die Bedingungen in der Aquakultur in Salzgehalt und anderen Faktoren (Hirata et al., 2001; Yoshie et al., 2006a) auch erheblich von denen der oben genannten Reaktoren.

Andererseits wurden aus der Aquakultur auch einige denitrifizierende Arten isoliert, über deren Rolle als Denitrifikanten in Biofiltern bisher nur spekuliert wurde, deren Fähigkeit zur Denitrifikation bisher noch nicht belegt war und/oder die erstmals in einem Biofilter gefunden wurden. Die als „*Rhodobacter maritimus*“ und „*Rhodobacter denitrificans*“ bezeichneten, denitrifizierenden Isolate D5-41 und D9-3 + D11-58 (siehe Kap. 3.2.2.4.12) waren nahe verwandt zu Klonen aus Belebtschlamm (Juretschko et al., 2002) und denitrifizierenden Biofilmen (Satoh et al., 2006). Darüber hinaus wurden zu den Isolaten teilweise sehr ähnliche Sequenzen auch im System von Rehovot identifiziert, wo ihr Auftreten zum Teil mit der nitratabhängigen Sulfidoxidation korreliert war (Cytryn et al., 2005a, 2005b). Die Spezies *Shinella granuli* wurde zwar aus einem Bioreaktor isoliert (An et al. 2006), die Fähigkeit zur Denitrifikation wurde bisher aber nicht festgestellt. Auch *Pseudoxanthomonas mexicana* wurde unter anderem aus einem Biofilter zur Abwasserbehandlung isoliert (Thierry et al., 2004). Anders als bisher bekannt konnten einige in der Aquakultur gefundenen Isolate jedoch ausgehend von Nitrat (und nicht erst mit Nitrit) denitrifizieren und das Endprodukt war meist N₂, nicht N₂O. Die Arten *Massilia timonae* (la Scola et al., 1998), *Stappia stellulata* (Rüger & Höfle, 1992; Uchino et al., 1998), *Aquimonas voraii* (Saha et al., 2005) und *Flexibacter aggregans* (Lewin, 1970 bzw. *Flexithrix dorotheae* (Hosoya & Yokota, 2007)) wurden hier erstmals mit dem Denitrifikationsprozess in Biofiltern in Verbindung gebracht. Zu letzterer Gattung verwandte Sequenzen wurden parallel auch über 16SrRNA-basierte DGGE im System detektiert (Cytryn et al., 2005b). Von den beiden *Denitromonas*-Isolaten „*D. indolicum*“ aus marinem Sediment und „*D. aromatica*“ aus Belebtschlamm (Yip et al. bzw. Manome et al., beide unveröffentlicht) existieren bisher keine Speziesbeschreibungen und den Datenbankeinträgen in Genbank ist bezüglich der Fähigkeit zur Denitrifikation nichts zu entnehmen.

Teilweise wurden aus der Aquakultur also „klassische“ Denitrifikanten isoliert, wie sie regelmäßig in Kläranlagenbiofiltern gefunden werden. Ein Teil dieser Gruppen fehlte jedoch auch völlig. Dafür wurden andererseits auch einige teilweise neue Arten isoliert, die erstmals mit dem Denitrifikationsprozess in Biofiltern in Verbindung gebracht werden konnten.

4.2.2.1.3.2 Nitratreduzierende Isolate

Die nächsten Verwandten vieler Isolate, bei denen hier Nitratreduktion zu Nitrit nachgewiesen wurde, stammen ebenfalls aus Abwasserhabitaten.

Ein erstes Beispiel ist die Art *Tistrella mobilis*, für die auch die Fähigkeit zur Nitratreduktion zu Nitrit bereits bekannt war (Shi et al., 2002). Auch das Genus *Hydrogenophaga* wurde bereits zuvor mit der Abwasserbehandlung assoziiert (Amann et al., 1996; Kämpfer et al., 2005). Die meisten der bisher beschriebenen Arten reduzierten Nitrat; teilweise war auch die Fähigkeit zur Denitrifikation und zur Oxidation von Thiosulfat vorhanden (Willems et al., 1989; Contzen et al., 2000; Kämpfer et al., 2005). Darüber hinaus wurden im FBR auch mittels DGGE *Hydrogenophaga*-verwandte 16S rRNA-Sequenzen gefunden und ihr Vorkommen mit nitratabhängiger Sulfidoxidation korreliert (Cytryn et al., 2005a, 2005b). Anhand der isolierten Spezies wurde die Fähigkeit zur Nitratreduktion bestätigt. Es wurden aber keine denitrifizierenden Isolate identifiziert. Ferner zeigten die auf diese Eigenschaft getesteten Isolate geringes Wachstum in Gegenwart von Nitrat und Sulfid (siehe Kap. 3.2.5.2.1, Tab. 36). Um diese Fähigkeit endgültig zu belegen wären aber weitere Tests erforderlich gewesen.

Bei den gefundenen Vertretern der *Rhizobiales* (*Mesorhizobium* und *Pseudaminobacter* (*Phyllobacteriaceae*), *Devosia* (*Hyphomicrobiaceae*) und *Martelella* (*Aurantimonadaceae*)) handelt es sich um typische Wurzelsymbionten (z. B. Jarvis et al., 1997; de Lajudie et al., 1998; Gao et al., 2004) und freilebende Boden- und/oder (Salz)wasserbewohner (z. B. Kämpfer et al., 1999; Rivas et al., 2005; Yoo et al., 2006; Yoon et al., 2007). Einzelne Arten wie z. B. ein Vertreter der *Phyllobacteriaceae* (Labbé et al., 2003) oder Mitglieder der Gattungen *Rhizobium* und *Sinorhizobium* (Heylen et al., 2006a) wurden aber auch schon aus Bioreaktoren isoliert.

Die innerhalb der *Bacteroides* identifizierten, nitratreduzierenden Isolate waren verwandt zu *Muricauda aquimarina*/ *M. flaccescens* bzw. *Vitellibacter vladivostokensis*. Diese Arten wurden als strikt aerobe Organismen aus Salzwasserhabitaten beschrieben; die Fähigkeit zur Nitratreduktion war nicht vorhanden oder wurde nicht untersucht (Nedashkovskaya et al., 2003; Yoon et al., 2005). Eine *Muricauda*-verwandte Sequenz wurde im FBR auch über kultivierungsunabhängige Analyse (16S rRNA-basierte DGGE) gefunden (Cytryn et al., 2005b).

Die aus der Aquakultur isolierten *Actinobacteria* mit Fähigkeit zur Nitratreduktion gehörten vorwiegend zu den Gattungen *Microbacterium* und *Rhodococcus*. Bei den bisher beschriebenen *Microbacterium*-Arten handelt es sich um obligat aerobe, meist halotolerante Organismen, die v. a. in Böden weit verbreitet sind (Takeuchi & Hatano, 1998a u. 1998b). Darüber hinaus gibt es

auch einige klinische Isolate sowie Isolate aus mariner Umgebung und Abwasser. Typische Habitate für Mitglieder des Genus *Rhodococcus* sind Bioreaktoren und (belastete) Böden, wo ihnen eine wichtige Rolle im Abbau (toxischer) aromatischer Verbindungen zukommt (z. B. Briglia et al., 1996; Yoon et al., 2000a u. 2000b). Von vielen Arten war die Fähigkeit zur Nitratreduktion ebenfalls bereits bekannt (Yoon et al., 2000b; Zhang et al., 2002; Matsuyama et al., 2003).

Wie bei den Denitrifikanten wurde auch unter den nur nitratreduzierenden Isolaten eine Mischung aus Arten gefunden, die bereits früher mit Abwasserhabitaten assoziiert worden waren, und solchen, die erstmals aus einem Biofilter isoliert wurden. Teilweise war die Fähigkeit zu Nitratreduktion bereits bekannt, teilweise wurde sie hier erstmals festgestellt. Besonders interessant ist der Zusammenhang zwischen Nitratreduktion und Sulfidoxidation bei dem Genus *Hydrogenophaga*, der jedoch erst noch eingehender untersucht werden müsste.

4.2.2.1.3.3 Isolate mit Fähigkeit zur DNRA

Isolate mit der Fähigkeit zu DNRA wurden nicht gefunden. Dies liegt vermutlich daran, dass es sich hierbei zumeist um strikt anaerobe Organismen handelt (Tiedje, 1988), zu deren Isolation das Vorgehen bei Probennahme, Transport und Kultivierung mit den zwischenzeitlich immer wieder oxischen Bedingungen nicht geeignet war (s. o.).

4.2.2.1.4 Charakterisierung neuer Bakterienarten aus der Aquakultur

Als mit der Charakterisierung begonnen wurde, war die 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit der Isolate D2-3, D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 zu den nächsten kultivierten und beschriebenen Verwandten < 97 %, im Fall von D2-3 sogar erheblich geringer. Daher wurden die fünf Isolate als potentiell neue Arten oder sogar Genera betrachtet und charakterisiert. In der Zwischenzeit wurde die 16S rRNA-Sequenz von einer neuen *Rhodobacter*-Spezies, vorgeschlagen als „*Rhodobacter litoralis*“, publik gemacht (Accession Number AY563033; Bae, J.-W., unveröffentlicht). Diese wies gerade 97% Ähnlichkeit zu der 16S rRNA-Sequenz des Isolats D5-41 auf. Da jedoch bisher von dieser Art noch keine Speziesbeschreibung veröffentlicht wurde, ist es schwierig Vergleiche zu ziehen. Daher wird hier auch D5-41 als eigene Art vorgeschlagen.

4.2.2.1.4.1 *Geminicoccus roseus* Stamm D2-3^T

4.2.2.1.4.1.1 Vergleich mit verwandten Arten

Die ähnlichste 16S rRNA-Sequenz zu D2-3 war eine Klonsequenz aus dem Zebrafischdarm (99% Ähnlichkeit; Accession Number: DQ814256; Rawls et al., 2006). Darüber hinaus bestand phylogenetische Verwandtschaft (\pm 90% Sequenzähnlichkeit) zu einer Gruppe filamentbildender Alphaproteobakterien (siehe Kap. 3.2.2.4.3, Abb. 32), die mit dem Problem der Blähschlamm-bildung in Kläranlagen in Verbindung gebracht wurden (Levantesi et al., 2004). Der einzige kultivierte Vertreter dieser Gruppe ist „*Candidatus Alysiosphaera europeae*“. Die Kultivierung dieser Art gelang bisher allerdings nur in Cokultur mit einer Hefe (Snaidr et al., 2002). Deshalb sind Informationen über diese Gruppe nur begrenzt vorhanden. Kürzlich wurde die rein morphologische Beschreibung (Levantesi et al., 2004) jedoch durch einige physiologische Charakteristika erweitert, die mittels in situ-Techniken bestimmt wurden (Kragelund et al., 2006). Ein Vergleich anhand der verfügbaren Merkmale (Tab. 41, Spezies 1 u. 2) zeigte, dass nur geringe morphologische und physiologische Ähnlichkeit zwischen dem Isolat D2-3 und der Gruppe der filamentösen Alphaproteobakterien um „*Candidatus Alysiosphaera europeae*“ bestand.

Weitläufiger verwandte Genera (< 88% Sequenzähnlichkeit) waren *Rhodothalassium*, *Azospirillum*, *Rhodocista*, *Stella*, *Iquilinus*, *Tistrella*, *Acidiphilium*, *Craurococcus*, *Paracraurococcus* und *Roseococcus*.

Einige dieser Genera gehören zu den aeroben, anoxygenen Phototrophen (= aerobic anoxygenic phototrophs, AAnPs). Vertreter dieser Gruppe wurden aus mariner Umgebung, Süßwasser- und Bodenproben isoliert. Sie enthalten in der Regel Carotenoide und Bacteriochlorophyll *a* (Yurkov, 2006). Ihr Photosyntheseapparat ist für gewöhnlich nur schwach ausgebildet und ermöglicht normalerweise nur geringes lichtabhängiges, heterotrophes Wachstum. Die Fähigkeit zur CO₂-Fixierung wurde nicht beobachtet. Mit Ausnahme einer zu den *Betaproteobacteria* gehörenden Art (Suyama et al., 1999) und einem kürzlich beschriebenen marinen Gammaproteobakterium (Fuchs et al., 2007), gehören alle bisher beschriebenen AAnPs den *Alphaproteobacteria* an (Yurkov, 2006). Wie für Vertreter der AAnPs typisch, waren am Licht gewachsene Kulturen von D2-3 durch Carotenoide stark pigmentiert (Kap. 3.2.2.4.9, Abb. 37). Die Exposition am Licht führte zu einer Wachstumssteigerung um ca. 25% (Kap. 3.2.2.4.4, Abb. 34B). Geringe Konzentrationen an Bacteriochlorophyll *a* waren - unabhängig von der Inkubation am Licht oder im Dunkeln - vorhanden (Kap. 3.2.2.4.9, Abb. 37). D2-3 unterschied sich morphologisch und physiologisch jedoch deutlich von den phylogenetisch nächstverwandten AAnPs (Tab. 41, Spezies 1

u. 5, 6). Darüber hinaus ist, bei einem gängigen Richtwert von 95% 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit für die Genusdefinition (Roselló-Mora & Amann, 2001), eine phylogenetische Verwandtschaft von ca. 88% auch schon sehr gering.

Mit anderen, phylogenetisch etwa gleich weit entfernten Nicht-AAAnP-Genera bestand noch geringere morphologische und physiologische Verwandtschaft (Tab. 41, Spezies 1 u. 3, 4).

Die großen phylogenetischen und phänotypischen Unterschiede zu den nächst verwandten Genera (Tab. 41) machen deutlich, dass D2-3 ein neues Genus von aerob, anoxigen Phototrophen innerhalb der α -1 *Proteobacteria* definiert. Als Name für das Isolat D2-3 wird *Geminicoccus roseus* gen. nov., sp. nov. vorgeschlagen.

Tab. 41: Eigenschaften von D2-3^T und verwandten Genera der Alphaproteobacteria.

Spezies: 1, D2-3^T; 2, „*Ca. Alysiosphaera europaea*“; 3, *Rhodotalassium salexigens* WS68^T; 4, *Azospirillum lipoferum* BR11115^T; 5, *Craurococcus roseus* NS130^T; 6, *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T. Daten zu Spezies 2-6 wurden Levantesi et al. (2004), Kragelund et al. (2006), Imhoff (2005), Baldani et al. (2005), Saitoh et al. (1998) und Hiraishi et al. (1998) entnommen; Spezies 2, Schlüsse auf Substrataufnahme und Nitratreduktion (via Substrataufnahme unter nitratreduzierenden Bedingungen) wurden aus Mikroautoradiographie-Experimenten abgeleitet. + = Reaktion positiv, ± = Reaktion variabel, - = Reaktion negativ; n. a. = nicht anwendbar; n. b. = nicht berichtet.

Eigenschaften	Bakterienspezies					
	1	2	3	4	5	6
16S rRNA Sequenz-ähnlichkeit (%) zu D2-3 ^T	n. a.	90,8	88,1	87,7	87,6	87,6
Zellform	kokkenförmig	scheibenförmig/ rundlich	stäbchen- bis spiralförmig	vibroid	kokkenförmig	stäbchenförmig
Reproduktionstyp	binäre Teilung	n. b.	binäre Teilung	n. b.	binäre Teilung	n. b.
Filamentbildung	-	+	-	-	-	-
Durchmesser (µm)	1,5-2,1	1,1-1,6	0,6-0,7 x 1-6	1,0-1,7	0,8-2,0	0,5-0,8 x 1,0-1,5
Gram-Färbung	-	±	- / ±	-	-	-
Beweglichkeit	-	n. b.	+	+	-	±
Salzbedarf *	+	-	+	-	-	-
Optimale Temperatur (°C)	30-35	n. b.	40	37	28-32	25-30
Optimaler pH	8,0	n. b.	6,6-7,4	5,7-6,8	7,5	3,0-3,5
DNA G+C-Gehalt (mol%)	60,3 ± 0,1	n. b.	64,0	69-70	70,5	62,9-63,5
<i>Art des Wachstums: **</i>						
Anaerob phototroph	-	n. b.	+	-	-	-
Aerob phototroph	+	n. b.	-	-	+	+
Autotroph	-	-	±	-	-	+
Fermentation	-	n. b.	n. b.	+	-	-
<i>Verwendete C-Quellen:</i>						
Acetat	+	+	+	n. b.	-	-
Citrat	-	n. b.	+	n. b.	-	+
Fruktose	+	n. b.	-	+	+	+
Fumarat	-	n. b.	n. b.	+	+	-
Glukose	-	+	+	+	+	+
Glutamat	-	n. b.	+	n. b.	+	+
Lactat	+	n. b.	-	+	+	-
Malat	-	n. b.	n. b.	+	+	+
Mannose	+	+	n. b.	+	n. b.	-
Propionat	+	n. b.	n. b.	n. b.	-	-
Pyruvat	+	+	+	n. b.	+	-
Rhamnose	-	n. b.	n. b.	+	+	-
Ribose	-	n. b.	n. b.	+	+	+
Succinat	-	n. b.	+	+	-	-
Xylose	-	n. b.	n. b.	n. b.	+	+
<i>Alternative Elektronenakzeptoren:</i>						
Nitrat	+***	+	n. b.	+	+	-
Nitrit	-	-	n. b.	+	-	-

* Seesalz im Fall von D2-3, Seesalz oder NaCl im Fall von *Rhodothalassium salexigens*

** Alle Spezies wachsen auch chemoheterotroph unter aeroben Bedingungen

*** Nitritbildung, aber kein sichtbares Wachstum

4.2.2.1.4.1.2 Beschreibung von *Geminococcus roseus* gen. nov., sp. nov.

***Geminococcus* (Ge.mi.ni.coc'cus. L. masc. Subst. *geminus*, Zwilling; N. L. masc. Subst. *coccus* Korn, Beere; N. L. masc. Subst. *Geminicoccus*, zwei kugelförmige Zellen).** Gram-negative Kokken, die meist paarweise vorliegen. Aerob, heterotroph phototroph. Halophil. Gehört (basierend auf 16S rRNA-Gensequenzanalyse) zu den α -1 *Proteobacteria*. Der „Type Strain“ ist *G. roseus* D2-3^T.

***Geminicoccus roseus* (ro.se'us. L. masc. Adj. *roseus*, rosenfarben, rosa).** Besitzt zusätzlich zu den in der Genusbeschreibung genannten Eigenschaften die im Folgenden aufgezählten Merkmale: Der Zelldurchmesser beträgt 1,5 - 2,1 μ M. Im Licht gewachsene Kolonien sind rosa, der Koloniedurchmesser beträgt 1 - 3 mm. Enthält Carotenoide und Bacteriochlorophyll *a*. Membranen enthalten Cytochrome vom Typ *b*, Cytochrome vom Typ *a* und *c* treten möglicherweise auch auf. Wächst von 15 - 45 °C und pH 5,5 - 11,0; optimales Wachstum findet bei 30 - 35 °C und pH 8,0 statt. Die Verdopplungszeit unter optimalen Bedingungen ist 5 h. Benötigt Seesalz zum Wachsen. Wächst mit Acetat, Arabinose, Cellobiose, Fruktose, Lactat, Maltose, Mannose, Pepton, Propanol, Propionat, Pyruvat und Tartrat. Nicht als Substrate verwendet werden Alanin, Amygdalin, Asparagin, Butanol, Butyrat, Casamino Acids, Citrat, Fumarat, Ethanol, Glukose, Glutamat, Inosit, Lactose, Malat, Mannit, Melibiose, Methanol, Oxalat, Rhamnose, Saccharose, Sorbit, Succinat oder Xylose. Gelatine wird hydrolysiert. Acetoinbildung findet statt, nicht aber Indolbildung. Katalase und Urease positiv. Cytochrom *c*-Oxidase, β -Galactosidase, Arginin-Dihydrolase, Lysin- und Ornithin-Decarboxilase und Tryptophan-Desaminase negativ. Nitratreduktion zu Nitrit, aber nicht mit der Fähigkeit zu anaerobem Wachstum verbunden. Nitrit, Sulfat oder Eisen(III) dienen nicht als alternative Elektronenakzeptoren. Kein fermentatives Wachstum. Der G+C-Gehalt beträgt $60,3 \pm 0,1$ mol%. Der „Type Strain“ (D2-3^T = DSM 18922^T = ATCC BAA-1445^T) wurde aus dem Biofilter einer marinen Aquakultur mit Wasserrückführung in Rehovot, Israel isoliert.

4.2.2.1.4.2 *Rhodobacter*-verwandte Spezies

4.2.2.1.4.2.1 Vergleich mit verwandten Arten

Die beiden sehr ähnlichen Isolate D9-3 und D11-58 waren phylogenetisch am nächsten verwandt (97 - 98% Sequenzähnlichkeit) zu einer Gruppe von Klonen, die aus Belebtschlamm amplifiziert wurden (Accession Numbers: AF234715, AF234725, AF234729, AF234741 u. AF234761; Juretschko et al., 2002). Die nächsten kultivierten Verwandten aller vier Isolate D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 waren verschiedenen Spezies der Genera *Rhodobacter*, *Rhodovulum* und *Rhodobaca* (Kap. 3.2.2.4.3, Abb. 33). Bei den Isolaten D1-19, D9-3 und D11-58 betrug die Sequenzähnlichkeit zu den nächstverwandten Spezies 95 - 96%. Eine eindeutige phylogenetische Zuordnung zu einem der drei genannten Genera war nicht möglich. D5-41 bildete dagegen ein stabiles Cluster mit „*Rba. litoralis*“ und *Rba. veldkampii*; die Sequenzähnlichkeit zu beiden Arten betrug rund 97%.

Die drei Genera *Rhodobacter*, *Rhodobaca* und *Rhodovulum* wurden als bevorzugt anaerob, photoheterotroph wachsende Bakterien mit charakteristischer Pigmentierung beschrieben (Imhoff, 2006). Einzige Ausnahme ist die Spezies *Rhodobacter massiliensis*, die als aerob chemoheterotroph charakterisiert wurde. Mittlerweile gibt es deshalb Bestrebungen, diese Art zusammen mit der kürzlich beschriebenen Spezies „*Haematobacter missouriensis*“ als „*H. massiliensis*“ in das neue Genus „*Haematobacter*“ einzuordnen (Helsel et al., 2007). Während das Genus *Rhodobacter* bisher nur Süßwasserspezies mit optimalem Wachstum bei neutralem pH und in Abwesenheit von NaCl enthält (Imhoff, 2005a), handelt es sich bei den Vertretern des Genus *Rhodovulum* um marine Bakterien, die zum Wachstum NaCl benötigen (Imhoff, 2005b). Das Genus *Rhodobaca* zeichnet sich durch Wachstum bei höheren Temperaturen, alkalischem pH und in Gegenwart niedriger Salzkonzentrationen aus (Imhoff, 2005c).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit wurden die Isolate D1-19, D5-41, D9-3 und D11-58 vorläufig dem Genus *Rhodobacter* zugeordnet. Sie wuchsen jedoch kaum bis gar nicht unter anaeroben, photoheterotrophen Bedingungen (siehe Kap. 3.2.2.4.7) und waren - egal unter welchen Bedingungen - kaum pigmentiert. Bei allen vier Spezies wirkten sich geringe bis mittlere Salzkonzentrationen (NaCl oder Seesalz) wachstumsfördernd aus; D5-41 wuchs sogar nur in Gegenwart von Seesalz.

Die großen morphologischen und physiologischen Diskrepanzen zwischen den vier Isolaten und ihren, phylogenetisch gesehen, nächsten Verwandten (Tab. 42) lassen die Zuordnung zum

Genus *Rhodobacter* allerdings fraglich erscheinen. Weitere Untersuchungen, v. a. zum phototrophen Wachstum der Isolate, müssen deshalb erst noch zeigen, ob die Einordnung in das Genus *Rhodobacter* gerechtfertigt ist oder ob es sich - zumindest teilweise - um neue Genera handelt.

Tab. 42: Eigenschaften von D1-19^T, D5-41^T, D9-3^T, D11-58 und einiger phylogenetisch nahe verwandter Spezies. Die Angaben zu *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides*, *Rba. veldekampii*, *Rba. massiliensis*, *Rhv. strictum* und *Rhb. bogoriensis* wurden Hiraiishi & Ueda (1995), Milford et al. (2000), Imhoff (2005a, 2005b und 2005c), Greub & Raoult (2003) und Helsel et al. (2007) entnommen. + = Reaktion positiv, - = Reaktion negativ, ± = Reaktion variabel, ~ = Reaktion unbedeutend erforderlich, aber verbessertes Wachstum, n.b. = nicht bestimmt oder - im Fall von aus der Literatur entnommenen Angaben - zumindest nicht angegeben, n.a. = nicht anwendbar.

Eigenschaften	Spezies									
	D1,19 ^T	D5,41 ^T	D9,3 ^T	D11,58	<i>Rba. azotoformans</i> KA25 ^T	<i>Rba. sphaeroides</i> ATCC 17023 ^T	<i>Rba. veldekampii</i> Hansen 51 ^T	<i>Rba. massiliensis</i> strain Fromboise ^T	<i>Rhv. strictum</i> MB-G2 ^T	<i>Rhb. bogoriensis</i> LBB1 ^T
Zellform	stäbchenförmig	stäbchenförmig	stäbchenförmig	stäbchenförmig	ei- bis stäbchenförmig	kugel- bis eiförmig	ei- bis stäbchenförmig	ei- bis stäbchenförmig	ei- bis stäbchenförmig	ei- bis stäbchenförmig
Zelldurchmesser (µm)	0,5-0,8 x 1,5-2,5	ca. 0,6 x 1,5-2,9	ca. 0,5 x 1,1-1,9	ca. 0,5 x 1,1-1,9	0,6-1,0 x 0,9-1,5	2,0-2,5 x 2,5-3,5	0,6-0,8 x 1,0-1,3	n.b.	0,6-1,0 x 1,0-2,5	0,8-1,0 x 0,8-1,5
Reproduktionsart	binäre Teilung	binäre Teilung	binäre Teilung	binäre Teilung	binäre Teilung	binäre Teilung	binäre Teilung	n.b.	binäre Teilung	binäre Teilung
Gram-Färbung	-	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
Beweglichkeit	- ^a	- ^a	- ^a	+	+	+	-	-	+	+
Farbe:										
Phototrophe Kultur (flüssig)	(beige bis leicht bräunlich)	(beige bis leicht bräunlich)	n.a.	n.a.	gelbgrün bis gelbbraun	grünbraun bis dunkelbraun	gelbbraun bis braun oder rot	n.b.	gelbgrün bis gelbbraun	gelb bis gelbbraun
Aerobe Kultur ^b	durchscheinend weißl. bis bräunl.	durchscheinend gelbl. bis bräunl.	durchscheinend gelblich	Durchscheinend gelblich	rosa bis rot	rot	rot	nicht pigmentiert	rosa bis rot	rosa bis rot
Temperaturoptimum (°C)	30-40	25-40	30-40	30-40	30-35	30-34	30-35	n.b.	30-35	39
pH-Optimum	7,0-8,5	6,5-8,5	6,5-7,0	6,5-7,0	7,0-7,5	7,0	7,5	n.b.	8,0-8,5	9,0
Salzbedarf ^c , ggf. Optimum (%)	~ 1,0-3,0 ^A , 0,25-1,0 ^B	+; 1,0 ^B	~ 0,5-2,0 ^A , 2,0-3,0 ^B	~ 0,25-2,0 ^A , 2,0-3,0 ^B	- ^d	- ^d	-	n.b.	+; 0,8-1,0 ^A	~ 1,0-2,0 ^A
DNA G+C-Gehalt (mol%)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	69,5-70,2 (HPLC)	68,4-69,9 (Bd)	64,4-67,5 (T _m)	n.b.	67,3-67,7 (HPLC)	58,8 (T _m)
Art des Wachstums:										
photoheterotroph	((+))	((+))	?	?	+	+	+	n.b.	+	+
photoautotroph	n.b. ^e	n.b. ^e	n.b. ^e	n.b. ^e	+	+	+	n.b.	+	-
chemoheterotroph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fermentativ	-	-	-	-	n.b.	-	n.b.	-	n.b.	-

4.2.2.1.4.2.2 Beschreibung von *Rhodobacter aggregans* sp. nov.

***Rhodobacter aggregans* (ag'gre.gans. L. V. aggregare, zusammenkleben, -ballen; L. Part. präs. aggregans, Ansammlungen, Aggregate bildend).** Gram-negative Stäbchen von 0,5 - 0,8 x 1,5 - 2,5 µm Größe. Bevorzugt aerobes, chemoheterotrophes Wachstum. Unter anaeroben, photoheterotrophen Bedingungen findet nur sehr langsames Wachstum statt. Aerob auf Platte gewachsene Kolonien sind 2 - 3 mm groß und durchscheinend weißlich bis bräunlich gefärbt. In Flüssigmedium besteht starke Neigung zur Aggregatbildung. Anaerob, photoheterotroph gewachsene Aggregate erscheinen beige bis leicht gelblich-bräunlich. Wachstum findet von 15 - 40 °C und von pH 6.0 - 10.0 statt; die Optima sind 30 - 40 °C und pH 7,0 - 8,5. Salz (Rotes Meer Salz oder NaCl) ist wachstumsfördernd (Optimum: Seesalz: 0,25 - 1,0%, NaCl: 1,0 - 3,0%) und wird auch in einer Konzentration von 5% noch toleriert. Die Verdopplungszeit unter optimalen Bedingungen beträgt 4 h. Unter aeroben, chemotrophen Bedingungen verwendete Substrate sind Acetat, Alanin, Asparagin, Butyrat, Casamino Acids, Fruktose, Fumarat, Glutamat, Lactat, Malat, Propanol, Propionat, Succinat und Xylose. Nicht verwendet werden Amygdalin, Arabinose, Butanol, Cellobiose, Citrat, Ethanol, Glukose, Inosit, Maltose, Mannose, Mannit, Melibiose, Methanol, Oxalat, Pepton, Pyruvat, Rhamnose, Saccharose, Sorbit und Tartrat. Gelatine wird hydrolysiert. Acetoin- und Indolbildung finden nicht statt. Katalase und Urease positiv. Cytochrom *c*-Oxidase, β-Galactosidase, Arginin-Dihydrolase, Lysin- und Ornithin-Decarboxilase und Tryptophan-Desaminase negativ. Nitrat, Nitrit, Sulfat oder Eisen(III) dienen nicht als alternative Elektronenakzeptoren. Kein fermentatives Wachstum. Der „Type Strain“ D1-19^T (=DSM18939^T = ATCC BAA-1446^T) stammt aus dem Biofilter einer marinen Aquakultur mit Wasserrückführung in Rehovot, Israel.

4.2.2.1.4.2.3 Beschreibung von *Rhodobacter maritimus* sp. nov.

***Rhodobacter maritimus* (L. masc. Adj. maritimus, aus dem Meer, marin, maritim).** Bei den Einzelzellen handelt es sich um Gram-negative, unbewegliche Stäbchen von ca. 0,6 x 1,5 - 2,9 µm. Auf Platte werden 1 - 1,5 mm große, durchscheinend gelbliche bis bräunliche Kolonien gebildet. In Flüssigkultur neigt der Stamm zur Flockenbildung. Bevorzugt chemoheterotrophes Wachstum. Unter anaeroben, photoheterotrophen Bedingungen erfolgt nur sehr geringes Wachstum. Die Farbe der unter diesen Bedingungen gebildeten Aggregate ist beige bis gelblich-bräunlich. Das Isolat wächst bei Temperaturen von 15 - 40 °C und pH-Werten von 5,5 - 9,5; op-

timales Wachstum bei 25 - 40 °C und pH 6,5 - 8,5. Unter Optimalbedingungen beträgt die Verdopplungszeit 3,8 h. Benötigt Seesalz (getestet 0,25 - 5%; Optimum: 1,0%) zum Wachsen. Wächst chemoheterotroph mit Acetat, Alanin, Butyrat, Casamino Acids, Citrat, Fruktose, Fumarat, Glutamat, Lactat, Malat, Propionat, Succinat und Xylose. Nicht verwendet werden Amygdalin, Arabinose, Asparagin, Butanol, Cellobiose, Ethanol, Glukose, Inosit, Lactose, Maltose, Mannose, Mannit, Melibiose, Methanol, Oxalat, Pepton, Propanol, Pyruvat, Rhamnose, Saccharose, Sorbit und Tartrat. Acetoinbildung findet statt, nicht aber Indolbildung. Urease-, Katalase-, Cytochrom *c*-Oxidase- und Tryptophan-Desaminase-Aktivität vorhanden. β -Galactosidase-, Arginin-Dihydrolase-, Lysin- und Ornithin-Decarboxilase-Aktivität fehlen. Denitrifikation ausgehend von Nitrit. Nitrat, Sulfat und Eisen(III) dienen nicht als alternative Elektronenakzeptoren. Fermentation findet nicht statt. Der „Type Strain“ D5-41^T (= DSM18849^T = ATCC BAA-1449^T) wurde aus dem Biofilter einer marinen Aquakultur mit Wasserrückführung in Rehovot, Israel, isoliert.

4.2.2.1.4.2.4 Beschreibung von *Rhodobacter denitrificans* sp. nov.

***Rhodobacter denitrificans* (de.ni.tri'fi.cans. L. Präp. de weg von; L. Subst. nitrum Soda; N. L. von denitrifico denitrifizieren; N. L. Part. prä.s. denitrificans denitrifizierend).** Gram-negative, teilweise bewegliche Stäbchen von ca. 0,5 x 1,1 - 1,9 μ m. Auf Platte Bildung von ca. 0,5 bis max. 1 mm großen, durchscheinend gelblichen Kolonien. Bevorzugt chemoheterotropes Wachstum. Anaerob photoheterotrophes Wachstum nicht eindeutig nachgewiesen. Wächst von 10 - 40 °C und pH 5,5 - 9,0; Optima sind 30 - 40 °C und pH 6,5 und 7,0. Die Verdopplungszeit unter optimalen Bedingungen ist knapp 5 h. Salz (Rotes Meer Salz oder NaCl) ist wachstumsfördernd (getestet: 0 - 5%; Optima: Seesalz: 2,0 - 3,0, NaCl: 0,5 - 2,0). Unter chemoheterotrophen Bedingungen verwendete Substrate sind Acetat, Alanin, Butyrat, Casamino Acids, Cellobiose, Fruktose, Fumarat, Glutamat, Lactat, Malat, Maltose, Mannose, Propionat, Rhamnose und Succinat. Wächst nicht mit Amygdalin, Arabinose, Asparagin, Butanol, Citrat, Ethanol, Glukose, Inosit, Lactose, Mannit, Melibiose, Methanol, Oxalat, Pepton, Propanol, Pyruvat, Saccharose, Sorbit, Tartrat und Xylose. Hydrolysiert Gelatine. Keine Acetoin- und Indolbildung. Katalase-, Cytochrom *c*-Oxidase-, β -Galactosidase- und Tryptophan-Desaminase-Aktivität vorhanden. Urease-, Arginin-Dihydrolase-, Lysin- und Ornithin-Decarboxilase-Aktivität fehlen. Denitrifikation ausgehend von Nitrat oder Nitrit. Sulfat und Eisen(III) dienen nicht als alternative Elektronenakzeptoren. Keine Fermentation. Der „Type Strain“ ist D9-3^T (=DSM18921^T = ATCC BAA-

1447^T). Er stammt aus dem Biofilter einer marinen Aquakultur mit Wasserrückführung in Rehovot, Israel.

4.2.2.2 Kultivierungsunabhängige Analyse anhand funktioneller Gene

Da es sich bei den Nitratreduzierern/Denitrifikanten um eine phylogenetisch sehr diverse Gruppe handelt (siehe Kap. 1.2.2.2.1), sind 16S rRNA-basierte Methoden für die molekularbiologische Erfassung dieser Gruppe ungeeignet. Deshalb werden zur kultivierungsunabhängigen Analyse gerne funktionelle Gene herangezogen, die für verschiedene am Denitrifikationsprozess beteiligte Enzyme codieren (siehe Kap. 1.2.2.2.3). In dieser Arbeit fiel die Wahl auf *narG* und *nosZ*, d. h. ein Enzym ganz am Anfang und eines ganz am Ende der Denitrifikationsabfolge. Dies sollte einerseits die möglichst vollständige Erfassung aller Organismengruppen ermöglichen, die zu Nitratreduktion befähigt sind (inklusive Nitratreduktion nur bis zu Nitrit oder auch weiter zum Ammonium), andererseits zur spezifischen Identifikation von Denitrifikanten führen, die mit der Bildung von N₂ zur endgültigen Entfernung des Stickstoffs aus dem System beitragen.

Die aus allen drei Teilsystemen (TF, DB und FBR) amplifizierten und sequenzierten *narG*-Gensequenzfragmente ließen sich in 31 Klon-Cluster ($\geq 90\%$ Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene) einteilen. Diese wiesen z. T. nur sehr geringe Ähnlichkeit zueinander auf (Minimalwert ca. 30% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene) und entstammten - unter dem Vorbehalt, dass *NarG*- und 16S rRNA-Phylogenie nicht immer übereinstimmen - den α -, β -, γ -, δ - und ϵ -*Proteobacteria* sowie den *Actinobacteria* (siehe Kap. 3.2.3.2.1.5). Anders als bei der kultivierungsabhängigen Analyse (s. o.) gab es nur wenige Überschneidungen zwischen den drei untersuchten Teilsystemen. Nur 23% der insgesamt identifizierten Klongruppen wurde in zwei oder drei Teilsystemen gleichzeitig gefunden (siehe Kap. 3.2.4, Tab. 35). Der Großteil (77%) hingegen wurde jeweils nur aus einem der Teilsysteme amplifiziert. Im FBR war die Anzahl der identifizierten Gruppen (10 OTUs) deutlich geringer als in den beiden anderen Teilsystemen (18 bzw. 24 OTUs) (siehe Kap. 3.2.3.2.1.2, Tab. 33). Darüber hinaus wurde die FBR-Genbibliothek sehr stark von einer einzigen Klongruppe (Klon-Cluster 8; 64% der insgesamt gescreenten Klone) dominiert, während die Anteile der größten Klongruppen in DB (ebenfalls Cluster 8; 26% der gescreenten Klone) und TF (Cluster 25; 25% der Klone) bei einer insgesamt etwas gleichmäßigeren Verteilung deutlich geringer waren (siehe Kap. 3.2.3.2.1.5, Abb. 42 u. Kap. 3.2.4, Tab. 35). Ein möglicher Grund für die - an den *narG*-Genbibliotheken gemessen - relativ

geringe Diversität im FBR ist, dass die Verhältnisse in diesem Teilsystem die Etablierung einer v. a. auf die sauerstoff- oder nitratabhängige Sulfidoxidation (Cytryn et al., 2005b; Cytryn et al., 2006) spezialisierten Artengemeinschaft bedingten, während etwa im DB Raum für eine Vielzahl verschiedener Prozesse nebeneinander war (Cytryn et al., 2003).

Oft bestand nur geringe Ähnlichkeit zwischen Klonsequenzen und Sequenzen beschriebener Arten, die aus öffentlich zugänglichen Datenbanken stammten oder von DSMZ-Kulturen und eigenen Isolaten gewonnen wurden (siehe Kap. 3.2.3.2.1.5). Die einzige (fast) 100%-ige Übereinstimmung bestand zwischen Kloncluster 3 und *Thiomicrospira denitrificans*, einer Art, die auch mit 16S rRNA-basierten Methoden in der Aquakultur detektiert wurde (Cytryn et al., 2005a, 2005b). Einige Gruppen wiesen immerhin eine Sequenzähnlichkeit von $\geq 80\%$ auf Aminosäureebene zu bekannten Spezies auf (siehe Kap. 3.2.4, Tab. 35). Ähnlich oder sogar noch extremer war die Situation für *nosZ*. Hier war Klon-Cluster 15 nahezu identisch zu dem *Pseudomonas*-Isolat D7-21. Dies war jedoch der einzige Fall von großer Ähnlichkeit einer *nosZ*-Klongruppe zu einer bekannten Spezies (siehe Kap. 3.2.3.2.2.3).

Sofern es sich um Organismen mit der Fähigkeit zu vollständiger Denitrifikation handelt, sollte von diesen Arten theoretisch sowohl ein *narG*-Gen als auch ein *nosZ*-Gen zu finden sein. Ein direkter Vergleich zwischen *narG*- und *nosZ*-Genbibliotheken aus dem DB erwies sich jedoch als schwierig, da sich die Datenbasis an verfügbaren Vergleichssequenzen für die beiden Gene zu stark unterschied. Ein paar Überschneidungen v. a. innerhalb der α -*Proteobacteria* lassen sich nicht ausschließen (z. B. *Paracoccus*/*Roseobacter*-verwandte Sequenzen). Insgesamt schienen die Ergebnisse, die über die Analyse von *narG*- und *nosZ*-Genfragmenten erzielt wurden, jedoch sehr verschieden. Denkbare Gründe sind, dass *narG*- und *nosZ*-Primer ein unterschiedliches Artenspektrum erfassen (s. u. + Kap. 3.2.3.1.2, Tab.32: Amplifikationserfolg bei eigenen Isolaten) oder dass viele Arten nur einen Teil der Gene der Denitrifikationsabfolge besitzen und z. B. entweder nur Nitrat zu Nitrit reduzieren, erst ausgehend von Nitrit denitrifizieren oder auch nur N₂O zu N₂ umsetzen. Ferner lässt sich nicht ausschließen, dass *narG*- und *nosZ*-Phylogenie ein und derselben Art stark von einander abweichen, wie es kürzlich für *nirK/S* und *norB* festgestellt wurde (Heylen et al., 2007; s. u.).

Die geringe Übereinstimmung von aus Umweltproben gewonnenen *narG*- und *nosZ*-Sequenzen mit Sequenzen bekannter Arten ist ein allgemein beobachtetes Phänomen, das auch auf weitere funktionelle Gene innerhalb der Denitrifikationsabfolge zutrifft (z. B. Scala & Kerkhof, 1999; Chèneby et al., 2003; Deiglmayr et al., 2004; Mounier et al., 2004; Hannig et al. 2006).

In all diesen Arbeiten erwies sich die Analyse von nitratreduzierenden/denitrifizierenden Gemeinschaften anhand funktioneller Gene als gut geeignet für den Vergleich verschiedener Standorte, Bewirtschaftungsformen o. ä.. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, wo ein Vergleich der drei *narG*-Genbibliotheken aus den verschiedenen Teilsystemen der Aquakultur große Unterschiede zwischen den untersuchten Filtereinheiten erbrachte (s. o.).

Wie hier für *narG* und auch *nosZ* festgestellt (s. o.), war es jedoch aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit meist nur in Einzelfällen möglich, die beteiligten Artengruppen auch phylogenetisch einzuordnen und damit eine Verbindung zu bekannten Arten herzustellen. Eine mögliche Ursache hierfür ist die, trotz der in letzter Zeit durch diverse Genomprojekte stark angewachsenen Datenbasis, immer noch begrenzte Sequenzinformation von beschriebenen Arten. Denkbar ist auch, dass, wie bei 16S rRNA-basierten Methoden (z. B. Amann et al., 1995; Hugenholtz & Pace, 1996; Hugenholtz et al., 1998), über die molekularbiologische Analyse funktioneller Gene (in situ relevante) Arten erfasst werden können, die sich der Kultivierung bisher entzogen haben. Da die existierenden Primer auf Basis von Sequenzinformation beschriebener, in Kultur befindlicher Arten entwickelt wurden, setzt dies allerdings voraus, dass es sich bei den Primerbindungsstellen tatsächlich um sehr stark konservierte Sequenzmotive handelt, was aufgrund der inzwischen festgestellten Unzulänglichkeit der bestehenden Primer (s. u.) zumindest fraglich ist.

Erschwerend kommt hinzu, dass die Phylogenie funktioneller Gene teilweise erheblich von der 16S rRNA-basierter Phylogenie abweicht. Zu Beginn der Arbeit mit funktionellen Markergenen zur Untersuchung von nitratreduzierenden/denitrifizierenden Gemeinschaften bestand - zumindest im Fall von *narG* und *nosZ* - die Hoffnung, dass ähnlich wie bei der *amoA* der Ammoniumoxidierer (Koops et al., 2003) eine gute Übereinstimmung zwischen der Phylogenie der funktionellen Gene und der 16S rRNA-basierten Phylogenie vorhanden sei (Philippot et al., 2002; Philippot, 2002). Was *narG* betrifft, kamen jedoch sehr bald Zweifel an dieser Hypothese auf (Gregory et al., 2003). In großen Zügen stimmt die NarG-Phylogenie zwar mit der 16S rRNA-basierter Phylogenie überein (Philippot, 2005; eigene Ergebnisse), bei genauerer Betrachtung zeigen sich jedoch teils erhebliche Abweichungen (siehe 3.2.3.2.1.5, Abb. 42), wie zum Beispiel die Position von *Thiomicrospira denitrificans* innerhalb der γ -Proteobacteria oder die fehlende Trennung von α - und β -Proteobacteria. Gleiches gilt für die *nosZ*-Phylogenie (Horn et al., 2006) und wurde kürzlich auch für *nirK/S* und *norB* bestätigt (Heylen et al., 2006b; Heylen et al., 2007).

Zudem zeigte sich, dass die phylogenetische Verwandtschaft von *nirK/S*- und *norB*-Genfragmenten aus ein und demselben Isolat teilweise erheblich voneinander abwichen (Heylen et al., 2007). Dies spricht nicht nur für einen erheblichen horizontalen Gentransfer von Denitrifikationsgenen insgesamt (Zumft, 1997; Ramirez-Arcos et al., 1998; Philippot, 2002; Gregory et al., 2003), sondern zeigt, dass ein reger Austausch auch einzelner Gencluster unabhängig voneinander stattfindet, was eine teilweise voneinander unabhängige Evolution der Denitrifikationsgene sehr wahrscheinlich macht (Heylen et al., 2007).

Darüber hinaus ist auch die gemeinsame Aktivität zweier (phylogenetisch) unterschiedlicher Gene in ein und demselben Organismus möglich, wie es kürzlich für *nirS* in einem *Thaueria*-Stamm nachgewiesen wurde (Etchebehere & Tiedje, 2005).

Die Analyse von Nitratreduzierern und Denitrifikanten anhand funktioneller Gene eignet sich somit hervorragend dazu, verschiedene Gemeinschaften miteinander zu vergleichen. Sie gibt jedoch nur sehr bedingt Aufschluss über die phylogenetische Position der identifizierten Gruppen, da einerseits die Datenbasis an Vergleichssequenzen bekannter Spezies nach wie vor zu gering ist, andererseits die Übereinstimmung von 16S rRNA-Phylogenie und der Phylogenie der funktionellen Gene innerhalb der Denitrifikationsabfolge zumindest fraglich erscheint.

4.2.2.3 Vergleich kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden

Der auf Ebene der funktionellen Gene *narG* und *nosZ* vorgenommene Vergleich zwischen Genbibliotheken und Isolatsequenzen (siehe Kap. 3.2.4) lieferte weniger die erhofften Informationen über Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Methoden als vielmehr über die Limitiertheit beider Herangehensweisen an sich.

Für beide Gene gab es nur wenige Überschneidungen zwischen Klon- und Isolatsequenzen (siehe Kap. 3.2.3.2.1.5, Abb. 42, und Kap. 3.2.4, Tab. 35 bzw. Kap. 3.2.3.2.2.3, Abb. 45). Hundertprozentige Übereinstimmungen wurden gar nicht gefunden. Darüber hinaus konnte nur von ca. 50% der nachweislich nitratreduzierenden Isolate ein *narG*-Genfragment amplifiziert werden (siehe Kap. 3.2.3.1.2, Tab.32). Im Falle der erwiesenermaßen N₂-bildenden Isolate lag der Amplifikationserfolg für ein *nosZ*-Genfragment ebenfalls bei ca. 50%. Allerdings handelte es sich hierbei fast ausschließlich um verschiedene *Pseudomonas*-Spezies.

Zusammengenommen zeigt dies, dass mit Klonierungs- und Kultivierungsansatz unterschiedliche Teilpopulationen der Gesamtpopulation an Nitratreduzierern und Denitrifikanten erfasst wurden, die sich nur in wenigen Punkten (z. B. *Pseudomonas*-Spezies) überschneiden. Über

die Größe der Gesamtpopulation und den Erfassungsgrad, der durch beide Methoden zusammen erzielt wurde, lässt sich jedoch keine Aussage treffen.

Auch über die *in situ*-Relevanz der über beide Ansätze identifizierten Gruppen sind nur Spekulationen möglich. Die hohen Verdünnungsstufen, aus denen viele der Isolate gewonnen wurden, wiesen darauf hin, dass es sich überwiegend um relativ abundante Arten handelte. Allerdings wurden keine Gesamtzellzahlen ermittelt und auch die höchsten Verdünnungsstufen des Kultivierungsansatzes waren durchgängig bewachsen, so dass die obere Messlatte fehlt (siehe Kap. 4.2.2.1.2). Auch die Häufigkeit bestimmter Klongruppen in den Genbibliotheken gibt einen Hinweis auf die mögliche *in situ*-Relevanz. Dies darf jedoch nicht überbewertet werden, da von DNA-Extraktion über PCR bis zu unterschiedlicher Kopienzahl der Gene im Genom verschiedener Arten alle möglichen „Störeinflüsse“ das Bild der Nitratreduzierer- und Denitrifikantenpopulation, das in einer Genbibliothek widergespiegelt wird, erheblich verzerren können (s. u.).

Die Gründe für die voneinander abweichenden Ergebnisse sind wahrscheinlich in beiden Ansätzen gleichermaßen zu suchen. Eine mögliche Ursache für den geringen Amplifikationserfolg von *narG*- und *nosZ*-Sequenzen der Isolate ist, dass die verwendeten Primer bei weitem nicht universell genug sind, um alle Gruppen zu erfassen. Beide Primerpaare wurden basierend auf den wenigen, zu diesem Zeitpunkt verfügbaren *narG*- bzw. *nosZ*-Vollsequenzen entwickelt (Scala & Kerkhof, 1998; Philippot et al., 2002). Die mittlerweile stark gewachsenen Sequenzdatenbanken zeigen deutlich, dass beide Primer ihre Schwachpunkte haben und einige phylogenetische Gruppen weniger gut erfassen als andere (Horn et al., 2006; eigene Beobachtungen). Die in dieser Arbeit für *narG* und *nosZ* gefundene Unzulänglichkeit der existierenden Primer wurde kürzlich auch für *nirK/S* und *norB* demonstriert (Heylen et al., 2006b und 2007). Von fast der Hälfte der dort getesteten, denitrifizierenden Isolate konnte kein *nirK/S*-Gen amplifiziert werden (Heylen et al., 2006b). Für *norB* wurde sogar nur von 30% der Isolate ein Produkt erhalten (Heylen et al., 2007). Eine frühere Studie erzielte mit anderen *narG*-Primern etwas bessere Ergebnisse (~ 70%); die für *nirK/S* erzielten Ergebnisse waren mit insgesamt knapp 60% jedoch vergleichbar zu obigem Befund (Goregues et al., 2005).

Ferner besitzt nach derzeitigem Wissensstand zwar die Mehrheit der Nitratreduzierer/Denitrifikanten eine membrangebundene Nitratreduktase. Einige Arten haben jedoch nur das periplasmatische Enzym (Richardson et al., 2001; Bedzyk et al., 1999; Bursakov et al., 1995; Delgado et al., 2003). Um auch diese Gruppe mitzuerfassen, wäre neben der *narG*-Analyse eine

zusätzliche Untersuchung auf das Vorkommen der periplasmatischen Nitratreduktase anhand des *napA*-Gens erforderlich gewesen.

Darüber hinaus ist, wie bei den Nitrifikanten, eine bevorzugte PCR-Amplifikation bestimmter Sequenzgruppen und/oder eine Gewichtung bereits bei der DNA-Extraktion vorstellbar (siehe Kap. 4.1.1). Hinzu kommt, dass das *narG*-Gen je nach Art in 1 - 3 Kopien pro Zelle vorliegt (Philippot, 2002 u. 2005), was ebenfalls ein überproportionales Auftreten mancher Sequenzen gegenüber anderen zur Folge haben kann. Von den anderen Denitrifikationsgenen wird dagegen angenommen, dass nur eine Kopie pro Zelle vorhanden ist (Philippot & Hallin, 2005).

Andererseits hat die Wahl der Inkubationsbedingungen (aerobe oder anaerobe Bedingungen, festes oder flüssiges Medium, Angebot an C-Quellen, etc.) großen Einfluss darauf, welche Organismen bevorzugt wachsen. In diesem Fall wurde versucht den Bedingungen im DB der Aquakultur einigermaßen gerecht zu werden (siehe Kap. 4.2.2.1.1). Um den Arbeitsaufwand im Rahmen zu halten waren jedoch Kompromisse nötig. So war der Kultivierungsansatz beispielsweise von Anfang an nur auf fakultative Organismen ausgelegt. Das scheint zwar gerechtfertigt, da der Großteil der Denitrifikanten zu dieser Gruppe gehört (Zumft, 1992 u. 1997), strikt anaerobe und mikroaerophile Arten, wie z. B. *Thiomicrospira denitrificans*, wurden dadurch jedoch von vornherein aus der Analyse ausgeklammert. Die Tatsache, dass trotz der erkennbaren Schwerpunkte viele Arten aus allen drei Teilsystemen isoliert wurden (siehe Kap. 3.2.2.2, Abb. 27), wohingegen die *narG*-basierte Analyse sehr deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Teilsystemen erbrachte (Kap. 3.2.4, Abb. 35 u. Kap. 4.2.2.2), lässt vermuten, dass die Kultivierungsbedingungen einen erheblichen Einfluss darauf hatten, welche Arten isoliert wurden und dass es sich nicht unbedingt immer um die im jeweiligen Teilsystem aktiven Gruppen handelte. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse der 16S rRNA-basierten DGGE-Studien (Cytryn et al., 2003 u. 2005a) an DB und FBR darauf hin, dass es weitere Gruppen von Denitrifikanten gab (z. B. *Thauera*, *Azoarcus*) (siehe Kap. 4.2.2.1.3), die über die Kultivierung nicht erfasst wurden.

Insgesamt lieferten der Kultivierungsansatz und die kultivierungsunabhängige Analyse anhand funktioneller Gene sich ergänzende Informationen über die Nitratreduzierer- und Denitrifikantenpopulationen in den Biofiltern der Aquakultur. Die über *narG* und *nosZ* untersuchten Überschneidungen zwischen beiden Ansätzen waren jedoch sehr viel geringer als erhofft. Die Gründe hierfür sind in der Limitiertheit beider Herangehensweisen gleichermaßen zu suchen.

4.2.3 Einfluss von Sulfid

Die Batch-Inkubationen von DB-Schlamm mit ^{15}N -markiertem Nitrat in Gegenwart verschiedener Sulfidkonzentrationen zeigten - einhergehend mit steigender Sulfidkonzentration - einerseits einen Anstieg in der N_2O -Produktion, andererseits eine leichte Verschiebung vom Prozess der Denitrifikation hin zur DNRA (siehe Kap. 3.2.5.1).

Verstärkte N_2O -Bildung in Folge erhöhter Sulfidkonzentrationen wurde bereits zuvor in Böden, Sedimenten und denitrifizierenden Bioreaktoren beobachtet (Sørensen, 1978; Tam & Knowles, 1979; Percheron et al., 1998; Manconi et al., 2006a; Senga et al., 2006) und auf unvollständige Denitrifikation, v. a. durch Hemmung der N_2O -Reduktase, zurückgeführt. Diese Annahme wurde auch durch Experimente mit Reinkulturen bestätigt (Tam & Knowles, 1979; Sørensen et al., 1980; Senga et al., 2006).

Auch die sulfidinduzierte Verschiebung von Denitrifikation hin zu DNRA ist ein in eutrophierten Sedimenten bereits mehrfach beobachtetes Phänomen (Brunet & Garcia-Gil, 1996; Christensen et al., 2000 u. 2003; An & Gardner, 2002). In Süßwassersedimenten machte die sulfidabhängige Ammoniumproduktion einen Anteil von bis zu 30% an der gesamten Nitratreduktion aus (Brunet & Garcia-Gil, 1996). In marinen Sedimenten direkt unter einer Fischfarm war die DNRA-Aktivität sogar 7x höher als die Denitrifikationsaktivität (Christensen et al., 2000), was einem DNRA-Anteil von annähernd 90% entspricht. Unter einer Muschelfarm betrug der Anteil der DNRA an der Gesamtnitratreduktion sogar bis zu 95% (Nizzoli et al., 2006).

Der postulierte Wirkmechanismus für die beobachtete Verschiebung des Verhältnisses von Denitrifikation zu DNRA in eutrophierten marinen Sedimenten ist die Hemmung der Nitrifikation (Joye & Hollibaugh, 1995) und in Folge dessen auch der Denitrifikation durch Sulfid (Christensen et al., 2003) bei möglicherweise gleichzeitiger Stimulation der DNRA durch Liefern eines e^- -Donors (An & Gardner, 2002). Neben Sulfid wird der Gehalt an organischem Kohlenstoff als weiterer steuernder Faktor für das Verhältnis von Denitrifikation zu DNRA erachtet (Fazzolari et al., 1998; Yin et al., 2002). Der Prozess der DNRA wird bei höheren Leveln an endogenen Elektronendonatoren vorherrschend (Tiedje, 1988; Senga et al., 2006) und spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn Nitratlimitationen auftreten (Laverman et al., 2006).

Kürzlich wurde die Frage aufgeworfen, ob das Auftreten von Sulfid nicht mehr Begleiterscheinung als verursachender Faktor für das Überwiegen von DNRA gegenüber der Denitrifikation sei (Nizzoli et al., 2006). Demnach könnten hohe Sulfatreduktionsraten und das Auftreten reduzierter Schwefelverbindungen einfach nur Indikatoren für das Vorherrschen einer mikro-

biellen Gemeinschaft von Sulfatreduzierern und Fermentern sein, unter denen die Fähigkeit zur DNRA ein verbreiteter Stoffwechselweg ist (z. B. Tiedje, 1988; Dannenberg et al., 1992; Dalsgaard & Bak, 1994; Zumft, 1997). Dies mag teilweise zutreffen. Allerdings zeigt das an DB-Schlamm aus der Aquakultur durchgeführte Experiment (s. o.) eine direkt mit der Sulfidkonzentration korrelierte (leichte) Zunahme in der Ammoniumproduktion. Folglich hat Sulfid, auch wenn es vielleicht nicht als alleiniger ausschlaggebender Faktor für die Verschiebung von Denitrifikation zu DNRA angesehen werden kann, doch zumindest einen zusätzlichen, verstärkenden Effekt.

Anhand von Wachstumsversuchen mit Reinkulturen, die aus der Aquakultur selbst stammten, wurde der Effekt von systemrelevanten Sulfidkonzentrationen auf Nitratreduzierer und Denitrifikanten eingehender untersucht (siehe Kap. 3.2.5.2).

Was das Wachstum in Gegenwart von Sulfid betrifft, so reichte die Reaktion der getesteten Isolate von hoch sensibel bis relativ unempfindlich. Generell führten steigende Sulfidkonzentrationen zu einer Verminderung des Wachstums, bis dieses schließlich ganz zum Erliegen kam (siehe Kap. 3.2.5.2.2, Abb. 47 u. Tab. 37). Bei den vollständig denitrifizierenden Isolaten war - in Abhängigkeit von der individuellen Sulfidempfindlichkeit der einzelnen Stämme - mit zunehmender Sulfidkonzentration ein Anstieg in der N_2O -Produktion zu beobachten (siehe Kap. 3.2.5.2.2, Abb. 47 u. Tab. 38). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die an DB-Schlammproben und auch bereits zuvor an Proben aus verschiedenen Habitaten mit erhöhten Sulfidkonzentrationen sowie an ein paar *Pseudomonas*-Kulturen gemacht wurden (s. o.). Bei Arten, die Nitrat nur bis zum Nitrit reduzierten, wurde N_2O dagegen höchstens in Spuren festgestellt. Arten mit der Befähigung zu DNRA waren leider nicht unter den getesteten Isolaten.

Die Zugabe von Sulfid zu bereits wachsenden denitrifizierenden Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase beeinträchtigte das Wachstum meist weit weniger als die Sulfidzugabe vor Beginn des Experiments (siehe Kap. 3.2.5.2.3, Abb. 48 u. Tab. 39). Die Sulfidzugabe bewirkte jedoch einen prompten Anstieg in der N_2O -Produktion (siehe Kap. 3.2.5.2.3, Abb. 48, Tab. 40). Bei geringeren Sulfidkonzentrationen war dieser Effekt reversibel und das intermediär gebildete N_2O wurde letztendlich noch zu N_2 umgesetzt. Bei hohen Sulfidkonzentrationen fand keine weitere Reduktion zu N_2 mehr statt und das Endprodukt war N_2O . Wie schon früher postuliert (Sørensen et al., 1987; Jensen & Cox, 1992), spricht dies dafür, dass der Haupteffekt von Sulfid auf Denitrifikanten in der Hemmung der N_2O -Reduktase besteht. Der ursächliche Zusammenhang besteht vermutlich in einem sulfidinduzierten Cu-Mangel. Sulfid blockiert die N_2O -Reduktion entweder indirekt, indem es im Medium enthaltenes Cu als Kupfersulfid festlegt,

wodurch es nicht mehr bioverfügbar ist, u./o. es reagiert direkt mit den Cu-Zentren der N₂O-Reduktase, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Manconi et al., 2006c).

Neben diesem spezifischen Effekt auf die N₂O-Reduktion bei Denitrifikanten sind Nitratreduzierer und Denitrifikanten vermutlich auch nicht völlig unempfindlich gegenüber allgemeineren Sulfideffekten, die die mikrobielle Aktivität direkt oder indirekt inhibieren können. Neutrales, undissoziiertes H₂S, das Membranen durchdringen kann (O'Flaherty et al., 1998), denaturiert intrazelluläre Proteine und Enzyme. Ein direkter toxischer Effekt von Sulfid durch Reaktion mit den Fe-Zentren von Cytochromen und anderen Eisen enthaltenden Komponenten der Zelle wurde z. B. für sulfatreduzierende Bakterien nachgewiesen (Reis et al., 1992). Darüber hinaus ist - wie im Fall des Kupfers - eine indirekte Unterbrechung des Zellmetabolismus durch Festlegung von Mikro- und Makronährstoffen möglich. Ein Beispiel wäre die extrazelluläre Präzipitation von Fe als FeS, wodurch es nicht mehr für die Synthese von Zellbestandteilen wie Ferredoxin oder Cytochrom *c* zur Verfügung stünde (Manconi et al., 2006c).

Andererseits gibt es auch Mikroorganismen, die Nitrat und Sulfid simultan entfernen können wie z. B. *Thiomicrospira* sp. strain CVO (Gevertz et al., 2000; Nemati et al., 2001). Die nitratabhängige Sulfidoxidation spielt v. a. im FBR eine wichtige Rolle, und mit kultivierungsunabhängigen Methoden konnten auch etliche potentiell an diesem Prozess beteiligte Organismen identifiziert werden (Cytryn et al., 2005a, 2005b). Aus den Vorversuchen zu den Sulfidexperimenten deutete einiges darauf hin, dass auch manche der Isolate zu nitratabhängiger Sulfidoxidation befähigt waren (siehe Kap. 3.2.5.2.1, Tab. 36). Um diese Beobachtung zu sichern, wären jedoch weitere Tests erforderlich gewesen.

Insgesamt zeigten sowohl die Batch-Inkubationen mit DB-Schlamm als auch die Versuche mit aus dem System isolierten Reinkulturen, dass erhöhte Sulfidkonzentrationen, wie sie in manchen Systemteilen regelmäßig anzutreffen sind, einen Einfluss auf die Population der Nitratreduzierer und Denitrifikanten haben. Das Ausmaß der Beeinträchtigung hing dabei von der individuellen Empfindlichkeit der einzelnen Arten ab. Neben einer generellen Wachstumsbeeinträchtigung war bei Denitrifikanten in erster Linie eine verstärkte N₂O-Bildung zu beobachten. Darüber hinaus ergaben die Batch-Inkubationen eine leichte, sulfidbedingte Verschiebung vom Prozess der Denitrifikation hin zur DNRA.

4.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit zum Thema Nitratreduktion und Denitrifikation durchgeführten Experimente dienten dazu, erstmals tiefere Einblicke in den Ablauf nitratreduzierender und denitrifizierender Prozesse und die daran beteiligten Artengemeinschaften in einer marinen Aquakultur mit Wasserwiederaufbereitung zu gewinnen. Dies beinhaltete die Untersuchung der potentiell an der N-Entfernung beteiligten Stoffwechselwege auf Prozessebene, die Charakterisierung der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Populationen (sowohl über Kultivierung als auch über kultivierungsunabhängige Analyse anhand funktioneller Gene) und die Untersuchung des Einflusses von Sulfid in systemrelevanten Konzentrationen auf Nitratreduktion und Denitrifikation.

¹⁵N-Tracerexperimente zeigten, dass sowohl Denitrifikation als auch DNRA systemrelevante Prozesse innerhalb des anaeroben Teils des N-Kreislaufs waren. Der Anammox-Prozess spielte dagegen keine Rolle. Obwohl der über die Batch-Inkubationen bestimmte Anteil der Denitrifikation am Gesamtnitratumsatz z. T. nur relativ gering war, reichte die Denitrifikationsaktivität insgesamt aus, um ein Gleichgewicht zwischen N-Zufuhr, internem Umsatz und N-Entfernung herzustellen und die Nitratkonzentrationen auf kontrolliert hohem Level zu halten. Wahrscheinlich leisteten eben die erhöhten Nitratkonzentrationen im Wasser einen wertvollen Beitrag zur Systemstabilität der marinen Aquakultur, indem sie halfen, die Sulfidbildung in den anaeroben Systemteilen (v. a. im DB) unter Kontrolle zu halten und ein Übertreten des dennoch gebildeten Sulfids in den Fischpool durch Reoxidation spätestens im FBR zu verhindern.

Über den Kultivierungsansatz wurde eine Vielzahl nitratreduzierender und denitrifizierender Arten identifiziert, die einer großen Bandbreite phylogenetischer Gruppen angehörten. Überwiegend handelte es sich um Vertreter verschiedener proteobakterieller Gruppen. Es wurden aber auch etliche Mitglieder der *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* isoliert. Zum Teil handelte es sich um klassischerweise aus Abwassersystemen isolierte Gruppen. Einige Arten wurde hier jedoch erstmals mit den Prozessen der Nitratreduktion u./o. Denitrifikation in Biofiltern in Zusammenhang gebracht. Unter den Isolatn befanden sich auch einige neue Arten. Fünf davon wurden genauer charakterisiert, was zur Beschreibung eines neuen Genus innerhalb der α -*Proteobacteria* und drei neuer *Rhodobacter*-Spezies führte.

Auch die kultivierungsunabhängige Analyse anhand der funktionelle Gene *narG* und *nosZ* erbrachte eine beträchtliche Anzahl an unterschiedlichen Klongruppen. Während Unterschiede zwischen den drei untersuchten Teilsystemen im Kultivierungsexperiment weniger deutlich zu

Tage traten, zeigte die vergleichende Analyse der *narG*-Genbibliotheken sehr klare Unterschiede zwischen DB, FBR und TF. Es gab nur wenige Klongruppen, die in zwei oder drei Teilsystemen gemeinsam auftraten. Im FBR deuteten die geringe Anzahl verschiedener *narG*-Genfragmente und das Überwiegen einer einzigen Klongruppe auf Vorkommen und Aktivität einer kleinen (möglicherweise auf nitratabhängige Sulfidoxidation) spezialisierten Nitratreduzierer-/ Denitrifikantenpopulation hin.

Beim Vergleich von Isolaten und Genbibliotheken auf Ebene der funktionellen Gene *narG* und *nosZ* wurden kaum Überschneidungen gefunden, was aller Wahrscheinlichkeit nach auf Unzulänglichkeiten beider Herangehensweisen gleichermaßen zurückzuführen ist (z. B. Verzicht auf Kultivierung anaerober und mikroaerophiler Arten; erfolgreiche Amplifikation von *narG*- und *nosZ*-Genfragmenten von nur ca. 50% der nachweislich nitratreduzierenden u./o. denitrifizierenden Arten). Die beiden Ansätze ergänzten einander insofern, dass sie zur Erfassung unterschiedlicher Teilpopulationen der Gesamtpopulation an Nitratreduzieren und Denitrifikanten führten. Aufgrund des geringen Überlappungsgrades ist es jedoch kaum möglich, auf die Größe der Gesamtpopulation und den Erfassungsgrad zu schließen. Zudem geben beide Ansätze nur bedingt Aufschluss über die in situ-Bedeutung der identifizierten Artengruppen.

Zukünftige Studien sollten deshalb einerseits die Entwicklung umfassenderer Primersysteme beinhalten. Andererseits ist die Kultivierung und Isolierung von Nitratreduzieren und Denitrifikanten sowie die Sequenzierung von funktionellen Genen bereits bekannter Arten nach wie vor nötig, um die Lücke zwischen Kultivierung und kultivierungsunabhängiger Analyse anhand der funktionellen Gene zu schließen.

Angesichts der immer größer werdenden Zweifel an der Eignung funktioneller Gene auch zur phylogenetischen Einordnung scheint die Verknüpfung von Methoden zur phylogenetischen Identifikation und zum Nachweis der Funktion ein weiteres, vordringliches Anliegen. Ferner ist es wichtig, die in situ-Relevanz der identifizierten Gruppen - sowohl was ihre Abundanz als auch was ihre Aktivität betrifft - feststellen zu können. Am direktesten ließe sich dies über simultane FISH mit auf die 16S rRNA und auf funktionelle Gene bzw. deren mRNA abzielenden Sonden (Zwirgmaier et al., 2004; Pernthaler & Amann, 2004) bewerkstelligen. Allerdings steht hier die Entwicklung noch am Anfang und es muss sich erst zeigen, inwieweit eine breite Anwendung möglich ist. Andere, bereits angewandte Methoden, die Aufschluss über die in situ-Relevanz von Nitratreduktion und Denitrifikation geben können u./o. zumindest indirekt Schlüsse auf Funktion und Aktivität bestimmter phylogenetischer Gruppen zulassen, sind die Quantifizierung verschiedener funktioneller Gene innerhalb der Denitrifikationsabfolge mittels real time PCR (Henry et

al., 2004 u. 2006; Kandeler et al., 2006; Geets et al., 2007) oder die Verwendung von Techniken wie SIP u./o. MAR in Kombination mit FISH (z. B. Ginige et al., 2005). Weitere vielversprechende Ansätze zur Untersuchung der in situ-Aktivität von Denitrifikanten sind mRNA- oder Protein-basierte Verfahren (Philippot & Hallin, 2005).

Über ein ^{15}N -Tracerexperiment mit DB-Schlamm in Gegenwart verschiedener, systemrelevanter Sulfidkonzentrationen konnte der direkte Effekt von Sulfid auf die Gemeinschaft der Nitratreduzierer und Denitrifikanten deutlich gezeigt werden. Dieser äußerte sich in einer verstärkten N_2O -Produktion und einer leichten Shift von Denitrifikation zu DNRA.

Die Wirkung von Sulfid auf Nitratreduzierer und Denitrifikanten aus der Aquakultur wurde anhand von Inkubationsversuchen mit einer Reihe ausgewählter Reinkulturen, die zuvor aus dem System isoliert worden waren, bestätigt und noch etwas genauer untersucht. Die getesteten Isolate zeigten sich durch Sulfid in ihrem Wachstum mehr oder weniger stark beeinträchtigt. Bei den Denitrifikanten ging mit steigender Sulfidkonzentration eine steigende N_2O -Produktion einher. Der akute Effekt von Sulfid auf bereits wachsende, denitrifizierende Kulturen äußerte sich in einem sofortigen Anstieg der N_2O -Produktion, der in Abhängigkeit von Konzentration und individueller Toleranz der Isolate bis zu einem gewissen Grad reversibel war. Ferner gab es unter den getesteten Isolaten auch erste Hinweise auf die Fähigkeit zur nitratabhängigen Sulfidoxidation.

Wie sowohl die Batch-Inkubationen mit DB-Schlamm als auch die Versuche mit Reinkulturen zeigten, hatten Sulfidkonzentrationen, wie sie in manchen Systemteilen regelmäßig auftraten, einen nachweislichen Effekt auf die Nitratreduzierer- und Denitrifikantenpopulation in der marinen Aquakultur. Trotz der bei den Isolaten in Abhängigkeit von der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Sulfid beobachteten Beeinträchtigungen waren bei vielen Arten Wachstum und Denitrifikationsaktivität auch noch unter erhöhten Sulfidkonzentrationen vorhanden. Gemeinsam mit den zum Thema Sulfidoxidation erzielten Ergebnissen (Cytryn et al., 2005a, 2005b u. 2006) macht dies deutlich, dass es in der Aquakultur Arten gibt, die unter systemrelevanten Sulfidkonzentrationen noch wachsen und denitrifizieren können und darüber hinaus über den Prozess der nitratabhängigen Sulfidoxidation vermutlich teilweise auch direkt zur Sulfidelimination aus dem System beitragen können. Inwieweit durch unvollständige Denitrifikation unter dem Einfluss von Sulfid entstandenes N_2O aus dem System emittiert wird, bleibt noch zu testen. Denn bei N_2O handelt es sich um ein klimawirksames Gas, das einen Beitrag zum Treibhauseffekt leistet (Las-hof & Ahuja, 1990) und an der Zerstörung der Ozonschicht beteiligt ist (Waibel et al., 1999). Hohe N_2O -Emissionen aus Marikulturen mit vollständiger Wasserwiederaufbereitung wären

demnach ein gravierender Nachteil in der Durchsetzung dieser geschlossenen Systeme in großem Maßstab. Das Für und Wider solcher Systeme gegenüber dem Fischfang und der Zucht mariner Fischarten in offenen Systemen wäre um so sorgfältiger abzuwägen.

5 Zusammenfassung

Die drohende Erschöpfung mariner Fischbestände bedingte die Entwicklung mariner Aquakulturtechniken und machte die marine Aquakultur zu einem der am schnellsten wachsenden Industriezweige der Welt. Derzeit werden marine Fischarten meist in schwimmenden Netzeinfriedungen oder Käfigen in Küstennähe gezüchtet. Von solchen Fischfarmen ausgehende Einflüsse, wie z. B. die hohe Nährstofffracht, schädigen die marine Umgebung jedoch erheblich. Eine umweltfreundliche Alternative zu diesen offenen Systemen sind geschlossene Systeme mit vollständiger Wasserwiederaufbereitung. Die Pilot-Anlage in Rehovot, Israel ist ein derartiges System, das über drei verschiedene Biofilter Nitrifikation, Denitrifikation/Abbau von abgesetztem Schlamm und Sulfidoxidation miteinander verbindet.

Die Nitrifikation in einem derartigen System muss einerseits effizient genug ablaufen, um die Ammoniakkonzentrationen unterhalb der für Fische toxischen Werte zu halten. Andererseits muss sie dynamisch genug sein, um auch Fluktuationen in der Ammoniumproduktion puffern zu können, wie sie beispielsweise durch eine Veränderung in Größe oder Alter der Fischpopulation oder der Fütterung hervorgerufen werden können. Das Auftreten von mindestens zwei koexistierenden Ammoniumoxidierer-Populationen in Kombination mit wechselnden Ammoniumkonzentrationen führte zu der Hypothese, dass es durch die unterschiedliche Substrataffinität der betreffenden Populationen zu einer zeitlichen Einnischung in Abhängigkeit von der gerade vorherrschenden Ammoniumkonzentration kommen könnte. Demnach wäre eine hoch affine Population bereits während der normalerweise vorherrschenden, geringen Ammoniumkonzentrationen aktiv, während eine weniger affine Population erst während der Peak-Konzentrationen ihre volle Aktivität entfalten könnte.

Der erste Teil dieser Arbeit, der sich mit dem Prozess der Nitrifikation im Tropfkörper der Aquakultur befasste, zielte deshalb darauf ab, die Nitrifikantenpopulation in dem marinen Tropfkörperbiofilm zu identifizieren und zu charakterisieren sowie Diversität, Verteilung, Abundanz und Aktivität der Ammonium- und Nitritoxidierer in situ zu bestimmen.

Wiederholte Runden des sogenannten „full cycle rRNA-approach“ waren erforderlich, um DNA-Extraktionsprotokoll und Sondenset für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) soweit zu optimieren, dass ein verlässliches und umfassendes Bild der Ammoniumoxidierergemeinschaft zustandekam. Die Analyse der Ammoniummonooxygenasegene (*amoA*) bestätigte die Ergebnisse von 16S rRNA-Klonierung und FISH. Die abundanteste Gruppe der ammoniumoxidierenden Bakterien (AOB) waren Mitglieder der *Nitrosomonas* sp. Nm143-„Lineage“ (6,7%

des Gesamtbiovolumens), gefolgt von einer *Nitrosomonas marina*-verwandten AOB-Gruppe (2,2% des Gesamtbiovolumens). Beide zusammen wurden zahlenmäßig übertroffen von den nitrifizierenden Bakterien (NOB) der *Nitrospira marina*-„Lineage“ (15,7% des Gesamtbiovolumens). Obwohl über acht weitere Nitrifikanten-Spezies detektiert wurden, darunter auch Vertreter der *Crenarchaeota* mit naher Verwandtschaft zu dem Ammoniumoxidierer „*Cand. Nitrosopumilus maritimus*“, war ihre gemeinsame Abundanz doch geringer als 1% des gesamten Biovolumens. Ihr Beitrag zur Nitrifikation im Biofilter der Anlage war deshalb zu vernachlässigen.

Die mittels Mikrosensormessungen bestimmten Nitrifikationsraten stiegen bis zu einer Ammoniumkonzentration von 200 μM nahezu linear an und erhöhten sich weiter bis zu einer Konzentration von 2 mM. Der geschätzte $K_M(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$ -Wert lag bei 294 (± 70) μM , die maximale Geschwindigkeit (v_{max}) der Ammoniumoxidation bei 65 (± 6) $\mu\text{M cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Zellspezifische Raten für die gemischte Population aus *Nitrosomonas* sp. Nm143 und *Nitrosomonas marina* reichten je nach Ammoniumkonzentration von 0,36 ($\pm 0,27$) bis 3,7 ($\pm 1,1$) $\text{fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und resultierten in einem v_{max} -Wert von 4,06 ($\pm 0,35$) $\text{fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mikroautoradiographie (MAR) unter Benutzung von ^{14}C -markiertem Bicarbonat wurde mit FISH kombiniert, um herauszufinden, welche AOB-Populationen in Gegenwart verschiedener Substratkonzentrationen aktiv sind. Weder Mikrosensordaten noch MAR-FISH-Experimente sprachen jedoch für die postulierte Nischendifferenzierung in eine bezüglich der Ammoniumkonzentration hoch affine und eine weniger affine AOB-Population. Deshalb bleibt weiter unklar, welche Faktoren für die beobachtete Koexistenz verschiedener AOB-Populationen verantwortlich sind. Zukünftige Studien sollten neben der Reaktionskinetik auch andere Faktoren wie z. B. Wachstumsertrag, Grundenergiebedarf, Widerstandsfähigkeit gegenüber Grazern oder Anfälligkeit für Viren berücksichtigen.

Zusammengenommen legen die gesammelten Daten jedoch nahe, dass die Nitrifikantengemeinschaft mit ihrer relativ hohen Substrataffinität und der dynamischen Antwort auf sich verändernde Substratkonzentrationen sowohl an die normalerweise geringen Ammoniumkonzentrationen als auch an die wiederkehrenden Peaks nach dem Füttern gut angepasst ist. Darüber hinaus garantiert diese flexible Reaktion große Systemstabilität und verhindert die Bildung von Ammoniakkonzentrationen oberhalb des fischtoxischen Levels.

Da Stickstoff, vor allem in Form von Nitrat, in geschlossenen Aquakultursystemen häufig sehr stark akkumuliert, wird versucht, zumindest einen Teil des Nitrat-N wieder aus dem System zu entfernen. Klassischerweise geschieht dies über den Denitrifikationsprozess. Ein Problem, das bei der anaeroben Abwasserbehandlung speziell in marinen Systemen mit seinen von Haus aus hohen Sulfatkonzentrationen im Wasser auftritt, ist die Sulfatreduktion. In den anaeroben Filter-

teilen der untersuchten Marikultur führte sie zur Bildung von Sulfidkonzentrationen, die oftmals Konzentrationen von 5 mM überstiegen. Neben seiner toxischen Wirkung auf Fische und andere aquatische Organismen hat Sulfid auch einen spezifischen Effekt auf Nitratreduktion und Denitrifikation. Es kann die N₂O-Reduktase von Denitrifikanten inhibieren, eine Verschiebung von der Denitrifikation hin zur dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) verursachen oder auch als Elektronendonator für die Nitratreduktion dienen.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit, war es deshalb, die Prozesse der Denitrifikation und der DNRA in den anaeroben Teilen der Anlage (Sedimentationsbecken und Fließbettreaktor) zu quantifizieren, Nitratreduzierer und Denitrifikanten zu identifizieren und zu isolieren sowie ihre Reaktion auf Sulfid als einem systemrelevanten Faktor genauer zu untersuchen.

Sowohl Denitrifikation als auch DNRA waren systemrelevante Prozesse. Anzeichen für eine N-Entfernung über den Anammox-Prozess wurden hingegen nicht gefunden. Die über ¹⁵N-Experimente bestimmte Denitrifikationsaktivität war nicht immer so hoch wie erwartet, insgesamt reichte sie jedoch aus, um ein Gleichgewicht zwischen N-Zufuhr und -Entfernung herzustellen und die Nitratkonzentrationen auf erhöhtem Niveau konstant zu halten.

Von insgesamt ca. 780 Isolaten verbrauchten knapp 500 Nitrat. Die nitratreduzierenden Isolate wurden mittels 16S rRNA-Gen-RFLP-Analyse gescreent und einige Vertreter jedes RFLP-Musters sequenziert. Dies führte zur Identifikation von 41 verschiedenen, teilweise neuen Artengruppen, die den *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, den *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* angehörten. 15 der 41 Isolatgruppen enthielten Denitrifikanten, bei Mitgliedern der restlichen Gruppen wurde nur Nitratreduktion zu Nitrit festgestellt. Bei einigen Spezies handelte es sich um bereits zuvor in Biofiltern zur Abwasserbehandlung angetroffene Arten. Andere wurden in dieser Arbeit erstmals mit den Prozessen der Nitratreduktion und/oder Denitrifikation in Biofiltern in Verbindung gebracht. Die umfassende Charakterisierung einiger der neuen Spezies führte zur Beschreibung der Gattung „*Geminicoccus*“ mit dem „Type Strain“ „*G. roseus*“ und der drei *Rhodobacter*-Arten „*Rba. aggregans*“, „*Rba. denitrificans*“ und „*Rba. maritimus*“.

Die kultivierungsunabhängige Analyse anhand der funktionellen Markergene *narG* und *nosZ* erbrachte ebenfalls eine beträchtliche Anzahl unterschiedlicher Klongruppen. Im Unterschied zum Kultivierungsansatz ergab die vergleichende Analyse der *narG*-Genbibliotheken sehr klare Unterschiede zwischen den drei untersuchten Teilsystemen Tropfkörper, Sedimentationsbecken und Fließbettreaktor. Während viele der Isolate in zwei oder drei Teilsystemen gefunden wurden, gab es nur wenige *narG*-Klongruppen, die in mehr als einem der drei Biofilter auftraten.

Der Fließbettreaktor wies zudem eine sehr viel geringere Anzahl von „Operational Taxonomic Units“ (OTUs) auf als die anderen beiden Teilsysteme.

Auf Basis von *narG* und *nosZ* konnten Kultivierungsansatz und kultivierungsunabhängige Analyse darüber hinaus direkt miteinander verglichen werden. Allerdings gab dieser Vergleich weniger den erhofften Aufschluss über Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Ansätze als vielmehr über die Unzulänglichkeiten beider Herangehensweisen an sich. Der Kultivierungsansatz schloss beispielsweise die Erfassung strikt anaerober und mikroaerophiler Arten von vornherein aus. Auf der anderen Seite erbrachten die benutzten *narG*- und *nosZ*-Primer nur von ca. 50% der nachweislich nitratreduzierenden und/oder bis zum N₂ denitrifizierenden Isolate ein spezifisches Produkt. Die beiden Ansätze ergänzten sich jedoch insofern, da sie Einblick in zwei unterschiedliche Teilpopulationen der Gesamtpopulation an Nitratreduzieren und Denitrifikanten gaben.

Wachstumsexperimente mit zuvor aus der Aquakultur isolierten Reinkulturen erbrachten große Unterschiede in der Sulfidtoleranz der getesteten Isolate, die von < 50 µM bis zu 5 mM reichte. Generell gingen steigende Sulfidkonzentrationen mit einer zunehmenden Hemmung des Wachstums und - bei denitrifizierenden Isolaten - mit einer steigenden N₂O-Produktion einher. Anaerobe Batch-Inkubationen von Schlamm aus dem Sedimentationsbecken mit ¹⁵N-Nitrat und verschiedenen Sulfidkonzentrationen bestätigten die in situ-Relevanz dieser Ergebnisse und zeigten darüber hinaus eine sulfidinduzierte Verschiebung vom Prozess der Denitrifikation hin zu dem der DNRA.

Insgesamt beherbergten die Biofilter eine Vielzahl nitratreduzierender und denitrifizierender Arten, die fähig waren, mit den fluktuierenden in situ-Bedingungen zurechtzukommen. Auch in Gegenwart erhöhter Sulfidkonzentrationen fanden noch Nitratreduktion und Denitrifikation statt. Die möglichen N₂O-Emissionen durch sulfidinduzierte, unvollständige Denitrifikation stellen jedoch ein bedenkliches Phänomen dar, weshalb dies eingehender untersucht werden sollte. Andererseits wurden auch Hinweise auf die Präsenz sulfidoxidierender Nitratreduzierer und/oder Denitrifikanten gefunden, die helfen könnten, die Sulfidkonzentrationen durch Reoxidation unter Kontrolle zu halten und ein Übertreten von Sulfid aus der anaeroben Schleife in das Fischbecken zu verhindern.

6 Summary

Declining marine fish stocks have fostered a rapid development of marine aquaculture techniques and have made marine aquaculture one of the fastest growing industries in the world. Most marine finfish are reared in floating net pens or cages nearshore. However, this practice often has deleterious effects on the surrounding environment (e.g., due to the release of high amounts of nutrients and organic matter). As an environmentally friendly alternative, a zero-discharge mariculture system was developed that contained a 3-stage biofilter for nitrification, denitrification/anaerobic sludge digestion, and sulfide oxidation.

Nitrification in such a system has to be efficient enough to keep ammonia concentrations below toxic levels, yet dynamic enough to buffer fluctuations in ammonium production, e.g., caused by changing fish population size, age, or feeding. The occurrence of at least two co-existing ammonia-oxidizer populations in combination with normally very low ammonium concentrations and reoccurring ammonium peaks after feeding led to the hypothesis of a niche differentiation in one “high affinity” population already being active during normal ammonium concentrations and one “low affinity” population only being active during peak concentrations.

Thus, the aim of the first part of this work, which focused on nitrification in the trickling filter of the aquaculture system, was to identify and characterize the nitrifier community in the marine trickling filter biofilm and to determine diversity, distribution, abundance, and activity of the ammonia- and nitrite-oxidizers in situ.

Repeated rounds of the full-cycle rRNA approach were necessary to optimize DNA extraction and probe set for fluorescence in situ hybridization (FISH) to obtain a reliable and comprehensive picture of the composition of the ammonia-oxidizing community. Analysis of the ammonia monooxygenase gene (*amoA*) confirmed the results obtained by 16S rRNA-cloning and FISH. The most abundant ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were members of the *Nitrosomonas* sp. Nm143-lineage (6.7% of the total biovolume), followed by *Nitrosomonas marina*-like AOB (2.2% of the total biovolume). Both were out-numbered by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) of the *Nitrospira marina*-lineage (15.7% of the total biovolume). Although more than eight other nitrifying populations were detected, including crenarchaeota closely related to the ammonia-oxidizer “*Cand. Nitrosopumilus maritimus*”, their collective abundance was below 1% of the total biofilm volume; their contribution to nitrification in the biofilter is therefore likely to be negligible.

Nitrification rates as determined by microsensors increased linearly in response to ammonium concentrations up to 200 μM , and further up to 2 mM. The estimated $K_M(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$ value was 294 (± 70) μM , and the estimated v_{max} was 65 (± 6) $\mu\text{mol ammonia oxidized cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Depending on the ammonium concentrations added, cell specific rates for the mixed community of *Nitrosomonas* sp. Nm143 and *Nitrosomonas marina* ranged from 0.36 (± 0.27) to 3.7 (± 1.1) $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and resulted in a v_{max} of 4.06 (± 0.35) $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Microautoradiography (MAR) using [^{14}C]-bicarbonate was combined with FISH to track active AOB under different substrate concentrations. However, neither microsensor data nor results from the MAR-FISH experiments supported the postulated niche differentiation in one “high affinity” and one “low affinity” population. Therefore, it remains unclear which factors are responsible for the observed coexistence of different AOB-populations. Further studies may have to take into account factors other than reaction kinetics (e.g., growth yield, maintenance energy demand, predation resistance, or virus susceptibility).

Nonetheless, the combined data suggest that the nitrifying community is, with its relatively high substrate affinity and dynamic response, well adapted to both the prevailing low substrate concentrations and the recurrent ammonium peaks. This flexible capability guarantees system stability and prevents ammonia concentrations from reaching fish-toxic levels.

Denitrification is used to control nitrate concentrations, which would otherwise accumulate in a closed system to very high levels. A problem, especially in marine systems where the water sulfate content is high, is the occurrence of sulfate reduction under anaerobic conditions. In the anaerobic filter of the investigated mariculture system, sulfate reduction led to sulfide concentrations often exceeding 5 mM. Besides its toxicity on fish and other aquatic organisms, sulfide may also affect nitrate reduction and denitrification. Sulfide can inhibit nitrous oxide reductase, trigger a shift from denitrification to dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), or be used as electron donor for nitrate reduction.

Thus, the goal of the second part of this study, which focused on nitrate reduction and denitrification, was to quantify denitrification and DNRA in the anaerobic treatment loop (digestion basin and fluidized bed reactor), to identify and isolate nitrate-reducing and denitrifying bacteria from the different biofilters, and to investigate their response to sulfide concentrations relevant for the system.

Denitrification and DNRA both played a role in nitrate reduction, whereas no signs were found for N-removal via the anammox process. In some of the ^{15}N -tracer experiments, deni-

trification activity was not as high as expected, but in general it was sufficient to balance N-input and N-removal and to keep nitrate concentrations in the water on a elevated but controlled level.

From a total of about 780 isolates, almost 500 consumed nitrate. The nitrate-consuming isolates were screened by 16S rRNA gene-RFLP; for each RFLP pattern representatives were sequenced.

In total, 41 different groups of nitrate-reducing/denitrifying isolates were identified. Some groups contained novel species, mostly affiliating with *Alphaproteobacteria* but also *Beta-* and *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. 15 groups contained denitrifiers, while members of the remaining 26 only reduced nitrate to nitrite. Some species had been identified in wastewater treatment biofilters before. Others were found to be involved in nitrate reduction and/or denitrification in such biofilters for the first time. Further characterization of some of the novel species led to the description of one novel genus “Geminococcus” with its type strain “G. roseus” and three novel *Rhodobacter* species “Rba. aggregans”, “Rba. denitrificans”, and “Rba. maritimus”.

Culture-independent analysis based on the functional marker genes *narG* and *nosZ* yielded considerable numbers of different clone groups. The *narG*-based analysis revealed significant differences between the nitrate-reducing and denitrifying populations of the three system parts trickling filter, digestion basin, and fluidized bed reactor, whereas differences found via the cultivation approach were much less pronounced. Moreover, in the fluidized bed reactor, the number of operational taxonomic units (OTUs) detected was much lower than in the other parts of the system.

Direct comparison of the cultivation approach and culture-independent *narG* and *nosZ* analyses did not show the expected differences and similarities of the two approaches, but clearly demonstrated the limitations of both approaches. While strict anaerobes and microaerophiles were not addressed in the cultivation approach, the primers used for *narG*- and *nosZ*-based analyses failed to amplify a *narG* and/or *nosZ* fragment from about 50% of the isolates that reduced nitrate and/or were denitrifiers. However, cultivation and culture-independent approaches complemented one another, as they yielded information about different populations from the total nitrate-reducing and denitrifying community.

Growth experiments with pure cultures previously isolated from the system revealed large differences in sulfide-tolerance among isolates, ranging from < 50 μ M to 5 mM sulfide. Increasing sulfide concentrations generally resulted in increased nitrous oxide production. Furthermore, evidence for the presence of sulfide-oxidizing nitrate reducers and/or denitrifiers was obtained.

Anoxic batch incubations of sludge with ^{15}N -nitrate and varying sulfide concentrations confirmed the in situ relevance of these observations and indicated that sulfide induced a shift from denitrification to DNRA.

In general, the nitrate-reducing and denitrifying communities harboured a variety of species that were able to cope with the fluctuating in situ conditions. Nitrate-reduction and denitrification still took place under elevated sulfide concentrations, although potential N_2O -emissions due to sulfide-induced, incomplete denitrification might be a worrisome phenomenon that needs further investigation. On the other hand, sulfide oxidation by nitrate reducing and/or denitrifying bacteria might help control sulfide concentrations and avoid carry-over of sulfide from the anaerobic treatment loop of the aquaculture into the fish pool.

7 Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A., and Vonshak, A.** (1992) Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* **158**: 267-270.
- Achtziger, R., Nigmann, U. & Zwölfer, H.** (1992) Rarefaction-Methoden und ihre Einsatzmöglichkeiten bei der zooökologischen Zustandsanalyse und Bewertung von Biotopen. *Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz* **1**: 89-105.
- Allen, L. A.** (1949) The effect of nitro-compounds and some other substances on production of hydrogen-sulfide by sulphate-reducing bacteria in sewage. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* **2**: 26-38.
- Almendras, J. M. E.** (1987) Acute nitrite toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*Chanos ehanos* Forsskal). *Aquaculture* **61**: 33-40.
- Altmann, D., Stief, P., Amann, R., de Beer, D., and Schramm, A.** (2003) In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. *Environmental Microbiology* **5**: 798-803.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Amann, R. I., Krumholz, L., and Stahl, D. A.** (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amann, R., Ludwig, W., Schulze, R., Spring, S., Moore, E., and Schleifer, K.-H.** (1996) rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 501-509.
- An, S. M., and Gardner, W. S.** (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology - Progress Series* **237**: 41-50.
- An, D. S., Im, W. T., Yang, H. C., and Lee, S. T.** (2006) *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 443-448.
-

Anders, H. J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., and Fuchs, G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K-172 and Kb-740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 327-333.

Andersen, K., Kjaer, T., and Revsbech, N. P. (2001) An oxygen insensitive microsensor for nitrous oxide. *Sensors and Actuators B - Chemical* **81**: 42-48.

Andreasen, K., and Nielsen, P. H. (1997) Application of microradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3662-3668.

Attwood, M. M., and Harder, W. (1972) Rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp.. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **38**: 369-378.

Auling, G., Reh, M., Lee, C. M., and Schlegel, H. G. (1978) *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria - its differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, Gram-negative, hydrogen-oxidizing species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 82-95.

Austin, D. A., and Moss, M. O. (1986) Numerical taxonomy of red-pigmented bacteria isolated from a lowland river, with the description of a new taxon, *Rugamonas rubra* gen. nov., sp. nov.. *Journal of General Microbiology* **132**: 1899-1909.

Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A., and Fukazawa, C. (1987) *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 144-152.

Baek, S. H., Kim, K. H., Yin, C. R., Jeon, C. O., Im, W. T., Kim, K. K., and Lee, S. T. (2003) Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Current Microbiology* **47**: 462-466.

Baek, S. H., Im, W. T., Oh, H. W., Lee, J.S., Oh, H. M., and Lee, S. T. (2006) *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2665-2669.

Bagarinao, T., and Vetter, R. D. (1989) Sulfide tolerance and detoxification in shallow-water marine fishes. *Marine Biology* **103**: 291-302.

Bagarinao, T. (1992) Sulfide as an environmental factor and toxicant - tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* **24**: 21-62.

Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., and Döbereiner, J. Genus II. *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979, 79^{AL}, In: Garrity, G. M. (chief-ed.), Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, 2nd edition, Springer, New York, 2005, pp. 7-26.

-
- Bange, H. W.** (2000) Global change - It's not a gas. *Nature* **408**: 301-302.
- Bast, E.** (2001) Mikrobiologische Methoden, eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Baur, W. H.** (1987) Gewässergüte bestimmen und beurteilen. 2. Aufl., Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Bazylnski, D. A., and Blakemore, R. P.** (1983) Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 1118-1124.
- Beardsley, C. W., Krottinger, N. J., and Rigdon, J. H.** (1958) Removal of sewer odors by scrubbing with alkaline solutions. *Sewage and Industrial Wastes* **30**: 220-225.
- Bedzyk, L., Wang, T., and Ye, R. W.** (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *Journal of Bacteriology* **181**: 2802-2806.
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P. et al.** (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**: 1902-1906.
- Bell, L. C., Richardson, D. J., and Ferguson, S. J.** (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha* - the periplasmic enzyme catalyzes the 1st step in aerobic denitrification. *FEBS Letters* **265**: 85-87.
- Beman, J. M., and Francis, C. A.** (2006) Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7767-7777.
- Bentzen, G., Smith, A. T., Bennett, D., Webster, N. J., Reinholt, F., Sletholt, E., and Hobson, J.** (1995) Controlled dosing of nitrate for prevention of H₂S in a sewer network and the effects on the subsequent treatment processes. *Water Science and Technology* **31**: 293-302.
- Berger, U.** (1961) Reduktion von Nitrat und Nitrit durch *Neisseria*. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **148**: 45-50.
- Berger, U.** (1962) Über das Vorkommen von Neisserien bei einigen Tieren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **148**: 445-457.
- Berger, U., and Pervanidis, A.** (1986) Differentiation of *Gemella haemolysans* (Thjotta and Boe 1938) Berger 1960, from *Streptococcus morbillorum* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1974. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series a - Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology* **261**: 311-321.
- Berks, B. C., Richardson, D. J., Reilly, A., Willis, A. C., and Ferguson, S. J.** (1995) The *napEDABC* gene-cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochemical Journal* **309**: 983-992.
-

Bernardet, J. F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., and 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.

Bernhard, A. E., Donn, T., Giblin, A. E., and Stahl, D. A. (2005) Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environmental Microbiology* **7**: 1289-1297.

Bleakley, B. H., and Tiedje, J. M. (1982) Nitrous-oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 1342-1348.

Bliefert, C. (1997) Umweltchemie. 2. erw. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim.

Bock, E., Koops, H.-P., Ahlers, B., and Harms, H. (1992) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., Springer Verlag, New York, p. 414-430.

Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R., and Zart, D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Archives of Microbiology* **163**: 16-20.

Bock, E., and Wagner, M. (2003) Oxidation of Inorganic Nitrogen compounds as an Energy Source. In: Dworkin, M. et al. (eds.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.13, Springer Verlag, New York; <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

Bollag, J.-M., and Tung, G. (1972) Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 271-276.

Bonin, P., Gilewicz, M., and Bertrand, J.C. (1987) Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617. *Annales de l' Institut Pasteur-Microbiologie* **138**: 371-383.

Bonin, P., and Gilewicz, M. (1991) A direct demonstration of co-respiration of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica* - some spectral and kinetic properties of the respiratory components. *FEMS Microbiology Letters* **80**: 183-188.

Bonin, P. (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 27-38.

Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B., and Witzel, K. P. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 673-690.

Bøvre, K. (1979) Proposal to divide the genus *Moraxella* Lwoff 1939 Emend. Henriksen and Bøvre 1968 into 2 subgenera, subgenus *Moraxella* (Lwoff 1939) Bøvre 1979 and subgenus *Branhamella* (Catlin 1970) Bøvre 1979. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**: 403-406.

-
- Bower, C. E., and Holm-Hansen, T.** (1980) A simplified hydrazine-reduction method for determining high concentrations of nitrate in recirculated seawater. *Aquaculture* **21**: 281-286.
- Boyd, C. E., and Tucker, C.S.** (1998) Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Boyle, S. A., Rich, J. J., Bottomley, P. J., Cromack, K., and Myrold, D. D.** (2006) Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 870-878.
- Braker, G., Fesefeldt, A., and Witzel, K. P.** (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., Ayala-del-Rio, H. L., Devol, A. H., Fesefeldt, A., and Tiedje, J. M.** (2001) Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1893-1901.
- Braker, G., and Tiedje, J. M.** (2003) Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3476-3483.
- Brettar, I., Christen, R., and Höfle, M. G.** (2002) *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 2211-2217.
- Briglia, M., Rainey, F. A., Stackebrandt, E., Schraa, G., and Salkinoja-Salonen, M. S.** (1996) *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 23-30.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., and Noller, H. F.** (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, T. A.** (1996) Gentechnologie für Einsteiger, 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Brownell, C. L.** (1980) Water quality requirements for 1st feeding in marine fish larvae .1. Ammonia, nitrite, and nitrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **44**: 269-283.
- Brunet, R. C., and Garcia-Gil, L. J.** (1996) Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 131-138.
- Burrell, P. C., Phalen, C. M., and Hovanec, T. A.** (2001) Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5791-5800.
-

- Bursakov, S., Liu, M. Y., Payne, W. J., Legall, J., Moura, I., and Moura, J. J. G.** (1995) Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulfate-reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC-27774. *Anaerobe* **1**: 55-60.
- Burth, I., Benckiser, G., and Ottow, J. C. G.** (1982) N₂O-release from nitrite (denitrification) by common fungi under aerobic conditions. *Naturwissenschaften* **69**: 598-599.
- Caldwell, D. E., Caldwell, S. J., and Laycock, J. P.** (1976) *Thermothrix thioparus* gen. et sp. nov. a facultatively anaerobic facultative chemolithotroph living at neutral pH and high temperature. *Canadian Journal of Microbiology* **22**: 1509-1517.
- Carlson, C. A., Ferguson, L. P., and Ingraham, J. L.** (1982) Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **151**: 162-171.
- Carpenter, C. W.** (1932) Sodium nitrate used to control nuisances. *Water Works Sewerage* **79**: 175-176.
- Carrera, J., Baeza, J. A., Vicent, T., and Lafuente, J.** (2003) Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research* **37**: 4211-4221.
- Carter, J. P., Richardson, D. J., and Spiro, S.** (1995a) Isolation and characterization of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase. *Archives of Microbiology* **163**: 159-166.
- Carter, J. P., Hsiao, Y. S., Spiro, S., and Richardson, D. J.** (1995b) Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 2852-2858.
- Casella, S., Shapleigh, J.P., and Payne, W.J.** (1986) Nitrite reduction in *Rhizobium hedysari* strain HCNT 1. *Archives of Microbiology* **146**: 233-238.
- Castillo, F., Dobao, M. M., Reyes, F., Blasco, R., Roldan, M. D., Gavira, M. et al.** (1996) Molecular and regulatory properties of the nitrate reducing systems of *Rhodobacter*. *Current Microbiology* **33**: 341-346.
- Castro-González, M., Braker, G., Farias, L., and Ulloa, O.** (2005) Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* **7**: 1298-1306.
- Cataldo D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., and Young V. L.** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication on Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71-80.
- Chao, A.** (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a Ppopulation. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**: 265-270.
- Chao, A., Ma, M. C., and Yang, M. C. K.** (1993) Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* **80**: 193-201.
-

-
- Chen, M. Y., Tsay, S. S., Chen, K. Y., Shi, Y. C., Lin, Y. T., and Lin, G. H.** (2002) *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 2155-2161.
- Chèneby, D., Hallet, S., Mondon, A., Martin-Laurent, F., Germon, J. C., and Philippot, L.** (2003) Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. *Microbial Ecology* **46**: 113-121.
- Christensen, P.** (1980) *Flexibacter canadensis* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 429-432.
- Christensen, P. B., Rysgaard, S., Sloth, N. P., Dalsgaard, T., and Schwaerter, S.** (2000) Sediment mineralization, nutrient fluxes, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an estuarine fjord with sea cage trout farms. *Aquatic Microbial Ecology* **21**: 73-84.
- Christensen, P. B., Glud, R. N., Dalsgaard, T., and Gillespie, P.** (2003) Impacts of longline mussel farming on oxygen and nitrogen dynamics and biological communities of coastal sediments. *Aquaculture* **218**: 567-588.
- Coenye, T., Vancanneyt, M., Cnockaert, M. C., Falsen, E., Swings, J., and Vandamme, P.** (2003) *Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1825-1831.
- Cole, J.** (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: Redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiology Letters* **136**: 1-11.
- Collins, M. D., Smida, J., Dorsch, M., and Stackebrandt, E.** (1988) *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 385-391.
- Colwell, R. K.** (2005) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples, Version 7.5. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Contzen, M., Moore, E. R. B., Blumel, S., Stolz, A., and Kämpfer, P.** (2000) *Hydrogenophaga intermedia* sp. nov., a 4-aminobenzenesulfonate degrading organism. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 487-493.
- Costa, E., Perez, J., and Kreft, J. U.** (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology* **14**: 213-219.
- Couch, J. N.** (1955) A new genus and family of the *Actinomycetales*, with a revision of the genus *Actinoplanes*. *Journal of Elisha Mitchell Scientific Society* **71**: 148-155.
- Cowan S. T.** (1974) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Cambridge University Press, New York.
-

- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., and Tiedje, J. M.** (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2924-2931.
- Cytryn, E., Gelfand, I., Barak, Y., van Rijn, J., and Minz, D.** (2003) Diversity of microbial communities correlated to physiochemical parameters in a digestion basin of a zero-discharge mariculture system. *Environmental Microbiology* **5**: 55-63.
- Cytryn, E., van Rijn, J., Schramm, A., Gieseke, A., de Beer, D., and Minz, D.** (2005a) Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6134-6141.
- Cytryn, E., Minz, D., Gelfand, I., Neori, A., Gieseke, A., De Beer, D., and Van Rijn, J.** (2005b) Sulfide-oxidizing activity and bacterial community structure in a fluidized bed reactor from a zero-discharge mariculture system. *Environmental Science & Technology* **39**: 1802-1810.
- Cytryn, E., Minz, D., Gieseke, A., and van Rijn, J.** (2006) Transient development of filamentous *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Letters* **256**: 22-29.
- Dahl, C., Sund, C., Kristensen, G. H., and Vredendregt, L.** (1997) Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater. *Water Science and Technology* **36**: 345-352.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., and Wagner, M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 434-444.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K.-H., and Wagner, M.** (2001a) In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5273-5284.
- Daims, H., Purkhold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P. A., and Wagner, M.** (2001b) Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: Lessons from molecular approaches. *Water Science and Technology* **43**: 9-18.
- Daims, H., Lückner, S., and Wagner, M.** (2006) daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental Microbiology* **8**: 200-213.
- Dalsgaard, T., and Bak, F.** (1994) Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil - sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 291-297.
- Dalsgaard, T., Canfield, D. E., Petersen, J., Thamdrup, B., and Acuna-Gonzalez, J.** (2003) N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* **422**: 606-608.
-

-
- Daniel, R. M., Limmer, A. W., Steele, K. W., and Smith, I. M.** (1982) Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strains. *Journal of General Microbiology* **128**: 1811-1815.
- Daniel, S.L. & Drake, H.L.** (1993) Oxalate and glyoxalate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3062-3069.
- Dannenbergh, S., Kroder, M., Dilling, W., and Cypionka, H.** (1992) Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology* **158**: 93-99.
- Dapena-Mora, A., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M. S. M., and Mendez, R.** (2004) Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotechnology* **110**: 159-170.
- Dapena-Mora, A., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., and Mendez, R.** (2006) Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water Science and Technology* **53**: 265-274.
- Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R., and Jetten, M. S. M.** (2007) Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 859-865.
- Davidova, I., Hicks, M. S., Fedorak, P. M., and Suflita, J. M.** (2001) The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **27**: 80-86.
- Davis, D. H., Doudoroff, M., and Stanier, R. Y.** (1969) Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology* **19**: 375-390.
- De Barjac, H. D., and Bonnefoi, A.** (1972) Study of biochemical classification of 64 *Bacillus* strains representative of 11 species belonging to Group-Ii and Group-Iii. *Annales de l'Institut Pasteur* **122**: 463-473.
- De Beer, D., and Stoodley, P.** (2000) Microbial Biofilms. In: Dworkin, M. et al. (eds.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.4, Springer Verlag, New York; <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B. et al.** (1998) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 369-382.
- De Lomas, J. G., Corzo, A., Gonzalez, J. M., Andrades, J. A., Iglesias, E., and Montero, M. J.** (2006) Nitrate promotes biological oxidation of sulfide in wastewaters: Experiment at plant-scale. *Biotechnology and Bioengineering* **93**: 801-811.
-

Deiglmayr, K., Philippot, L., Hartwig, U.A., and Kandeler, E. (2004) Structure and activity of the nitrate-reducing community in the rhizosphere of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under long-term elevated atmospheric pCO₂. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 445-454.

Del Vecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T. et al. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 443-448.

Delgado, M. J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E. J., and Muller, P. (2003) The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology-Sgm* **149**: 3395-3403.

Denariáz, G., Payne, W. J., and Legall, J. (1989) A halophilic denitrifier, *Bacillus halodenitrificans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 145-151.

Denger, K., Laue, H., and Cook, A. M. (1997) Anaerobic taurine oxidation: A novel reaction by a nitrate-reducing *Alcaligenes* sp. *Microbiology-UK* **143**: 1919-1924.

Durham, H. E. (1898) A simple method for demonstrating the production of gas by bacteria. *British Medical Journal, Part I*: 1387.

Eckford, R. E., and Fedorak, P. M. (2002a) Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**: 83-92.

Eckford, R. E., and Fedorak, P. M. (2002b) Chemical and microbiological changes in laboratory incubations of nitrate amendment "sour" produced waters from three western Canadian oil fields. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**: 243-254.

Eddy, F. B. (2005) Ammonia in estuaries and effects on fish. *Journal of Fish Biology* **67**: 1495-1513.

Edgar, G. J., Macleod, C. K., Mawbey, R. B., and Shields, D. (2005) Broad-scale effects of marine salmonid aquaculture on macrobenthos and the sediment environment in southeastern Tasmania. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**: 70-90.

Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J. J., Siegrist, H., van der Meer, J. R., and Zehnder, A. J. B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* **175**: 198-207.

Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A. J. B., and van der Meer, J. R. (2003) Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology* **45**: 419-432.

Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E. (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology* **164**: 16-23.

-
- Elzaei-Volcani, B.** (1957) Genus XII. *Halobacterium*. In: Breed, R.S., Murray, E.G.B, and Smith, N.R. (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 207-212.
- Enger, O., Nygaard, H., Solberg, M., Schei, G., Nielsen, J., and Dundas, I.** (1987) Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 416-421.
- Enwall, K., Philippot, L., and Hallin, S.** (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8335-8343.
- Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., Moletta, R., and Muxi, L.** (2001a) *Comamonas nitratorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 977-983.
- Etchebehere, C., Errazquin, I., Barrandeguy, E., Dabert, P., Moletta, R., and Muxi, L.** (2001b) Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 259-265.
- Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., and Muxi, L.** (2002) Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiology Ecology* **40**: 97-106.
- Etchebehere, C., and Tiedje, J.** (2005) Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5642-5645.
- Fahrbach, M., Kuever, J., Meinke, R., Kämpfer, P., and Hollender, J.** (2006) *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1547-1552.
- Fales, A. L.** (1929) Treatment of industrial wastes from paper mills and tannery on Neponset river. *J. Indust. Eng. Chem.* **21**: 216.
- FAO** (2004) The state of world fisheries and aquaculture 2004, FAO, Rome; ISBN 92-5-105177-1.
- Fazzolari, E., Nicolardot, B., and Germon, J. C.** (1998) Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in repacked soil cores. *European Journal of Soil Biology* **34**: 47-52.
- Fesefeldt, A., Kloos, K., Bothe, H., Lemmer, H., and Gliesche, C. G.** (1998) Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 181-186.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A.** (2000) Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 273-282.
-

Finlay, B. J., Span, A. S. W., and Harman, J. M. P. (1983) Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature* **303**: 333-336.

Flanagan, D. A., Gregory, L. G., Carter, J. P., Karakas-Sen, A., Richardson, D. J., and Spiro, S. (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 263-270.

Focht, D. D., and Joseph, H. (1974) Degradation of 1,1-diphenylethylene by mixed cultures. *Canadian Journal of Microbiology* **20**: 631-635.

Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., and Oakley, B. B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14683-14688.

Frankland, P. F., and Frankland, G. C. (1890) The nitrifying process and its specific ferment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Part I* **181**: 107-128.

Franzmann, P. D., Burton, H. R., and McMeekin, T. A. (1987) *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 27-34.

Freitag, A., Rudert, M., and Bock, E. (1987) Growth of *Nitrobacter* by dissimilatory nitrate reduction. *FEMS Microbiology Letters* **48**: 105-109.

Freitag, T. E., and Prosser, J. I. (2004) Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3789-3793.

Freitag, T. E., Chang, L., and Prosser, J. I. (2006) Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient. *Environmental Microbiology* **8**: 684-696.

Frette, L., Gejlsbjerg, B., and Westermann, P. (1997) Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 363-370.

Freyvert, T. (1983) *Hydrochemisches Grundpaktikum*, Birkhäuser Verlag, Basel.

Frigaard, N. U., Martinez, A., Mincer, T. J., and DeLong, E. F. (2006) Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic *Bacteria* and *Archaea*. *Nature* **439**: 847-850.

Fröstl, J. M., Seifritz, C., and Drake, H. L. (1996) Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoacetum*. *Journal of Bacteriology* **150**: 4597-4603.

Fuchs, B. M., Woebken, D., Zubkov, M. V., Burkill, P., and Amann, R. (2005) Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **39**: 145-157.

-
- Fuchs, B. M., Spring, S., Teeling, H., Quast, C., Wulf, J., Schattenhofer, M. et al.** (2007) Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 2891-2896.
- Gadkari, D.** (1984) Influence of herbicides Goltix and Sencor on nitrification. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **139**: 623-631.
- Gao, J. L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H. et al.** (2004) *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2003-2012.
- Gao, Q. F., Cheung, K. L., Cheung, S. G., and Shin, P. K. S.** (2005) Effects of nutrient enrichment derived from fish farming activities on macroinvertebrate assemblages in a subtropical region of Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin* **51**: 994-1002.
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand, J. C.** (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 568-576.
- Geets, J., de Cooman, M., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., De Vos, P. et al.** (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**: 211-221.
- Gelfand, I., Barak, Y., Even-Chen, Z., Cytryn, E., van Rijn, J., Krom, M. D., and Neori, A.** (2003) A novel zero discharge intensive seawater recirculating system for the culture of marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society* **34**: 344-358.
- Gevertz, D., Telang, A. J., Voordouw, G., and Jenneman, G. E.** (2000) Isolation and characterization of strains CVO and FWKOB, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2491-2501.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A.** (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1351-1362.
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., and Amann, R.** (2003) Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environmental Microbiology* **5**: 355-369.
- Ginige, M. P., Keller, J., and Blackall, L. L.** (2005) Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8683-8691.
- Glass, C., and Silverstein, J.** (1999) Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research* **33**: 223-229.
-

- Glover, H. E.** (1985) The Relationship between inorganic nitrogen oxidation and organic carbon production in batch and chemostat cultures of marine nitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* **142**: 45-50.
- Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., and Schleifer, K.-H.** (1996) An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 403-406.
- Gmelin, L.** (1936) Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. Stickstoff., 8. Aufl., Verlag Chemie GmbH, Berlin.
- Godden, J. W., Turley, S., Teller, D. C., Adman, E. T., Liu, M. Y., Payne, W. J., and Legall, J.** (1991) The 2.3 angstrom x-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* **253**: 438-442.
- Goldburg, R., and Naylor, R.** (2004) Future seascapes, fishing, and fishfarming. *Frontiers in Ecology and the Environment* **3**: 21-28.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C., and Ramirez, C.** (1978) *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 710-715.
- González, J. M., Covert, J. S., Whitman, W. B., Henriksen, J. R., Mayer, F., Scharf, B. et al.** (2003) *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfo-niopropionate-demethylating bacteria from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1261-1269.
- Good, I. J.** (1958) The population frequency of species and the estimation of the population parameters. *Biometrics* **40**: 237-246.
- Goregues, C. M., Michotey, V. D., and Bonin, P. C.** (2005) Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microbial Ecology* **49**: 198-208.
- Gorshkova, N. M., Ivanova, E. P., Sergeev, A. F., Zhukova, N. V., Alexeeva, Y., Wright, J. P. et al.** (2003) *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 2073-2078.
- Grabovich, M., Gavrish, E., Kuever, J., Lysenko, A. M., Podkopaeva, D., and Dubinina, G.** (2006) Proposal of *Giesbergeria voronezhensis* gen. nov., sp. nov. and *G. kuznetsovii* sp. nov. and reclassification of *Aquaspirillum anulus*, *A. sinuosum* and *A. giesbergeri* as *Giesbergeria anulus* comb. nov., *G. sinuosa* comb. nov. and *G. giesbergeri* comb. nov., and *Aquaspirillum metamorphum* and *A. psychrophilum* as *Simplicispira metamorpha* gen. nov., comb. nov. and *S. psychrophila* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 569-576.
- Greene, E. A., Hubert, C., Nemati, M., Jenneman, G. E., and Voordouw, G.** (2003) Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology* **5**: 607-617.
-

-
- Gregory, L. G., Karakas-Sen, A., Richardson, D. J., and 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.
- Gregory, L. G., Bond, P. L., Richardson, D. J., and Spiro, S.** (2003) Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology-Sgm* **149**: 229-237.
- Greiner-Mai, E., Kroppenstedt, R. M., Kornwendisch, F., and Kutzner, H. J.** (1987) Morphological and biochemical characterization and emended descriptions of thermophilic *Actinomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology* **9**: 97-109.
- Greiner-Mai, E., Kornwendisch, F., and Kutzner, H. J.** (1988) Taxonomic revision of the genus *Saccharomonospora* and description of *Saccharomonospora glauca* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 398-405.
- Greub, G., and Raoult, D.** (2003) *Rhodobacter massiliensis* sp. nov., a new amoebae-resistant species isolated from the nose of a patient. *Research in Microbiology* **154**: 631-635.
- Grguric, G., Wetmore, S. S., and Fournier, R. W.** (2000) Biological denitrification in a closed seawater system. *Chemosphere* **40**: 549-555.
- Grieshaber, M. K., and Völkel, S.** (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annual Review of Physiology* **60**: 33-53.
- Grimes, D. J., Woese, C. R., MacDonell, M. T., and Colwell, R. R.** (1997) Systematic study of the genus *Vogesella* gen. Nov. and its type species, *Vogesella indigofera* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 19-27.
- Grommen, R., Dauw, L., and Verstraete, W.** (2005) Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 1-11.
- Gumaelius, L., Magnusson, G., Pettersson, B., and Dalhammar, G.** (2001) *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 999-1006.
- Gutierrez-Wing, M. T., and Malone, R. F.** (2006) Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering* **34**: 163-171.
- Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Rossnagel, P., Burggraf, S. et al.** (1996) *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* **166**: 308-314.
- Hallam, S. J., Mincer, T. J., Schleper, C., Preston, C. M., Roberts, K., Richardson, P. M., and DeLong, E. F.** (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. *PLoS Biology* **4**: 520-536.
-

Hallin, S., and Lindgren, P. E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrile reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1652-1657.

Hallin, S., Throback, I. N., Dicksved, J., and Pell, M. (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5445-5452.

Hannig, M., Braker, G., Dippner, J., and Jürgens, K. (2006) Linking denitrifier community structure and prevalent biogeochemical parameters in the pelagial of the central Baltic Proper (Baltic Sea). *FEMS Microbiology Ecology* **57**: 260-271.

Hargreaves, J. A. (1998) Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* **166**: 181-212.

Harrigan W. F., and Mc Cance, M. E. (1966) Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London.

Harrison, A. P. (1983) Genomic and physiological comparisons between heterotrophic *Thiobacilli* and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 211-217.

Haveman, S. A., Greene, E. A., and Voordouw, G. (2005) Gene expression analysis of the mechanism of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology* **7**: 1461-1465.

Helsel, L. O., Hollis, D., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Jordan, J., Aye, T. et al. (2007) Identification of "Haematobacter," a new genus of aerobic gram-negative rods isolated from clinical specimens, and reclassification of *Rhodobacter massiliensis* as "Haematobacter massiliensis comb. nov." *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 1238-1243.

Hendrie, M. S., Holding, A. J., and Shewan, J. M. (1974) Emended descriptions of genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that generic name *Achromobacter* be rejected - status of named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter* - request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**: 534-550.

Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutierrez, J. C., Martin-Laurent, F., Baumann, A., and Philippot, L. (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 327-335.

Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and 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.

Henze, M. (1991) Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology* **23**: 669-679.

Heukelekian, H. (1943) Effect of the addition of sodium nitrate to sewage on hydrogen sulfide production and B.O.D. reduction. *Sewage Works Journal* **15**: 255-261.

-
- Heylen, K., Vanparrys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., and De Vos, P.** (2006a) Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2637-2643.
- Heylen, K., Gevers, D., Vanparrys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., and De Vos, P.** (2006b) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology* **8**: 2012-2021.
- Heylen, K., Vanparrys, B., Gevers, D., Wittebolle, L., Boon, N., and De Vos, P.** (2007) Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology* **9**: 1072-1077.
- Hicks, R. E., Amann, R. I., and Stahl, D. A.** (1992) Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2158-2163.
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., and Moffett, B. F.** (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 1-11.
- Hiraishi, A., and Ueda, Y.** (1994) *Rhodoplanes* gen. Nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 665-673.
- Hiraishi, A., Shin, Y. K., and Sugiyama, J.** (1995) *Brachymonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., an aerobic chemoorganotrophic bacterium which contains rhodoquinones, and evolutionary relationships of rhodoquinone producers to bacterial species with various quinone classes. *Journal of General and Applied Microbiology* **41**: 99-117.
- Hiraishi, A., and Ueda, Y.** (1995) Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 319-326.
- Hiraishi, A., Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., and Katayama, Y.** (1998) Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1389-1398.
- Hirata, A., Nakamura, Y., and Tsuneda, S.** (2001) Biological nitrogen removal from industrial wastewater discharged from metal recovery processes. *Water Science and Technology* **44**: 171-179.
- Hirsch, P.** (1974) Budding bacteria. *Annual Review of Microbiology* **28**: 391-444.
- Hirsch, P., and Müller, M.** (1985) *Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from freshwater habitats. *Systematic and Applied Microbiology* **6**: 281-286.
- Hitzman, D. O., Sperl, G. T., and Sandbeck, K. A.** (1995) Method for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in aqueous system. U.S. Patent 5405531.
-

Holland, S. M. (2003) Analytical Rarefaction 1.3. User's Guide and application published at: <http://www.uga.edu/~strata/software/>.

Hollibaugh, J. T., Bano, N., and Ducklow, H. W. (2002) Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrospira*-like ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1478-1484.

Holmer, M., Marba, N., Terrados, J., Duarte, C. M., and Fortes, M. D. (2002) Impacts of milkfish (*Chanos chanos*) aquaculture on carbon and nutrient fluxes in the Bolinao area, Philippines. *Marine Pollution Bulletin* **44**: 685-696.

Holmer, M., Duarte, C. M., Heilskov, A., Olesen, B., and Terrados, J. (2003a) Biogeochemical conditions in sediments enriched by organic matter from net-pen fish farms in the Bolinao area, Philippines. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 1470-1479.

Holmer, M., Perez, M., and Duarte, C. M. (2003b) Benthic primary producers - a neglected environmental problem in Mediterranean maricultures? *Marine Pollution Bulletin* **46**: 1372-1376.

Holmes, B., Owen, R. J., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J. (1984) *Flavobacterium gleum*, a new species found in human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 21-25.

Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M., and Kersters, K. (1988a) *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 406-416.

Holmes, B., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J. (1988b) A taxonomic study of *Flavobacterium spiritivorum* and *Sphingobacterium mizutae* - Proposal of *Flavobacterium yabuuchiae* sp. nov. and *Flavobacterium mizutaii* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 348-353.

Horio, T., Higashi, T., Yamanaka, T., Matsubara, H., and Okunuki, K. (1961) Purification and properties of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **236**: 944-951.

Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G., and Drake, H. L. (2005) *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* 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, M. A., Drake, H. L., and Schramm, A. (2006) 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.

Hosoya, S. and Yokota, A. (2007) Reclassification of *Flexibacter aggregans* (Lewin 1969) Leadbetter 1974 as a later heterotypic synonym of *Flexithrix dorotheae* Lewin 1970. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1086-1088.

Hovanec, T. A., and DeLong, E. F. (1996) Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2888-2896.

Hovanec, T. A., Taylor, L. T., Blakis, A., and DeLong, E. F. (1998) *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 258-264.

Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H. et al. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov. represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 340-351.

Hugenholtz, P., and Pace, N. R. (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology* **14**: 190-197.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity (vol 180, pg 4765, 1998). *Journal of Bacteriology* **180**: 6793-6793.

Hugo, C. J., Segers, P., Hoste, B., Vancanneyt, M., and Kersters, K. (2003) *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 771-777.

Hurlbert, S. H. (1971) Nonconcept of species diversity - critique and alternative parameters. *Ecology* **52**: 577-586.

Hutchinson, M., Johnstone, K. I., and White, D. (1967) Taxonomy of anaerobic *Thiobacilli*. *Journal of General Microbiology* **47**: 17-23.

Imhoff, J. F. (2005) Genus Incertae Sedis XXVI. *Rhodothalassium* Imhoff, Petri, and Süling 1998, 797^{VP}, In: Garrity, G. M. (chief-ed.), Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 228-229.

Imhoff, J. F. (2005a) Genus I. *Rhodobacter* Imhoff, Trüper, and Pfennig 1984, 342^{VP}, In: Garrity, G. M. (chief-ed.), Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 161-167.

Imhoff, J. F. (2005b) Genus XIV. *Rhodovulum* Hiraishi and Ueda 1994a, 21^{VP}, In: Garrity, G. M. (chief-ed.), Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 205-209.

Imhoff, J. F. (2005c) Genus XIII. *Rhodobaca* Milford, Achenbach, Jung and Madigan 2001, 793^{VP}, In: Garrity, G. M. (chief-ed.), Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 204-205.

- Imhoff, J. F.** (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin, M. (chief-ed.), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., and Stackebrandt, E (eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd ed., Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, Springer Verlag, New York, p. 41-64.
- Iobbi, C., Santini, C. L., Bonnefoy, V., and Giordano, G.** (1987) Biochemical and immunological evidence for a 2nd nitrate reductase in *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry* **168**: 451-459.
- Iobbi-Nivol, C., Santini, C. L., Blasco, F., and Giordano, G.** (1990) Purification and further characterization of the 2nd nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry* **188**: 679-687.
- Isik, K., Chun, J., Hah, Y. C., and Goodfellow, M.** (1999) *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 833-837.
- Itoi, S., Niki, A., and Sugita, H.** (2006) Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* **256**: 287-295.
- Jarvis, B. D. W., van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., and Gillis, M.** (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 895-898.
- Jean, W. D., Chen, J. S., Lin, Y. T., and Shieh, W. Y.** (2006) *Bowmanella denitrificans* gen. nov., sp nov., a denitrifying bacterium isolated from seawater from An-Ping Harbour, Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2463-2467.
- Jenneman, G. E., McInerney, M. J., and Knapp, R. M.** (1986) Effect of nitrate on biogenic sulfide production. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 1205-1211.
- Jenneman, G. E., Moffitt, P. D., Bala, G. A., and Webb, R. H.** (1999) Sulfide removal in reservoir brine by indigenous bacteria. *SPE Production & Facilities* **14**: 219-225.
- Jensen, K. M., and Cox, R. P.** (1992) Effects of sulfide and low redox potential on the inhibition of nitrous oxide reduction by acetylene in *Pseudomonas nautica*. *FEMS Microbiology Letters* **96**: 13-17.
- Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., van Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G.** (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **71**: 75-93.
- Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U., van de Graaf, A. A. et al.** (1998) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 421-437.
-

-
- Jetten, M. S. M., Slikers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I. et al.** (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**: 107-114.
- Jiang, Q. Q., and Bakken, L. R.** (1999) Comparison of *Nitrospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 171-186.
- Jobbagy, A., Szanto, I., Varga, G. I., and Simon, J.** (1994) Sewer system odor control in the Lake Balaton area. *Water Science and Technology* **30**: 195-204.
- John, P.** (1977) Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. *Journal of General Microbiology* **98**: 231-238.
- Jones, R. D., Morita, R. Y., Koops, H.-P., and Watson, S. W.** (1988) A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* Sp. nov.. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 1122-1128.
- Jones, A. M., and Knowles, R.** (1990) Denitrification in *Flexibacter canadensis*. *Canadian Journal of Microbiology* **36**: 430-434.
- Joye, S. B., and Hollibaugh, J. T.** (1995) Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* **270**: 623-625.
- Juez, G., Rodriguezvalera, F., Ventosa, A., and Kushner, D. J.** (1986) *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., 2 new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **8**: 75-79.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmidt, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., and Wagner, M.** (1998) Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterial diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3042-3051.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., and Wagner, M.** (2002) The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 84-99.
- Ka-Jong, O., Urbance, J., Ye, R. W., Ahn, T. Y., and Tiedje, J. M.** (1997) Diversity of oxygen and N-oxide regulation of nitrite reductases in denitrifying bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **156**: 55-60.
- Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A., and Versprille, B.** (2006) DEAMOX - New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Research* **40**: 3637-3645.
- Kämpfer, P., Müller, C., Mau, M., Neef, A., Auling, G., Busse, H. J. et al.** (1999) Description of *Pseudaminobacter* gen. nov. with two new species, *Pseudaminobacter salicylatoxidans* sp. nov. and *Pseudaminobacter defluvii* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 887-897.
-

- Kämpfer, P., Dreyer, U., Neef, A., Dott, W., and Busse, H. J.** (2003a) *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 93-97.
- Kämpfer, P., Andersson, M. A., Jackel, U., and Salkinoja-Salonen, M.** (2003b) *Teichococcus ludipueritiae* gen. nov., sp. nov., and *Muricoccus roseus* gen. nov., sp. nov. representing two new genera of the alpha-1 subclass of the *Proteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **26**: 23-29.
- Kämpfer, P., Schulze, R., Jackel, U., Malik, K. A., Amann, R., and Spring, S.** (2005) *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 341-344.
- Kämpfer, P.** (2006) The Family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. In: Dworkin, M. (chief ed.), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., and Stackebrandt, E. (eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd ed., Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, Springer Verlag, New York, p.538-604.
- Kämpfer, P., Denger, K., Cook, A. M., Lee, S. T., Jackel, U., Denner, E. B. M., and Busse, H. J.** (2006) *Castellaniella* gen. nov., to accommodate the phylogenetic lineage of *Alcaligenes defragrans*, and proposal of *Castellaniella defragrans* gen. nov., comb. nov. and *Castellaniella denitrificans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 815-819.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., and Philippot, L.** (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5957-5962.
- Karsten, G. R., and Drake, H. L.** (1995) Comparative assessment of the aerobic and anaerobic microfloras of earthworm guts and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1039-1044.
- Kartal, B., Koleva, M., Arsov, R., van der Star, W., Jetten, M. S. M., and Strous, M.** (2006) Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology* **126**: 546-553.
- Kastrau, D. H. W., Heiss, B., Kroneck, P. M. H., and Zumft, W. G.** (1994) Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc*-complex - phospholipid requirement, electron-paramagnetic-resonance and redox properties. *European Journal of Biochemistry* **222**: 293-303.
- Kelly, D. P., and Wood, A. P.** (2000) Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the *Proteobacteria*, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 547-550.
- Kerstens, K., and de Ley, J.** (1984) Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936^{AL}. In: Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 361-373.
-

-
- Khan, S. T., and Hiraishi, A.** (2002) *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology* **48**: 299-308.
- Khan, S. T., Horiba, Y., Yamamoto, M., and Hiraishi, A.** (2002) Members of the family *Comamonadaceae* as primary poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3206-3214.
- Kim, I. S., and Son, J. H.** (2000) Impact of COD/N/S ratio on denitrification by the mixed cultures of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrifying bacteria. *Water Science and Technology* **42**: 69-76.
- Kim, H. S., Schell, M. A., Yu, Y., Ulrich, R. L., Sarria, S. H., Nierman, W. C., and DeShazer, D.** (2005) Bacterial genome adaptation to niches: Divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics* **6**:174.
- Kim, J. S., Sparovek, G., Longo, R. M., De Melo, W. J., and Crowley, D.** (2007) Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 684-690.
- Klemme, J. H., Chyla, I., and Preuss, M.** (1980) Dissimilatory nitrate reduction by strains of the facultative phototropic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *FEMS Microbiology Letters* **9**: 137-140.
- Knowles, G., Downing, A. L., and Barrett, M. J.** (1965) Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture with aid of an electronic computer. *Journal of General Microbiology* **38**: 263-278.
- Knowles, R.** (1982) Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**: 43-70.
- Köhler, W., Schachtel, G., and Voleske, P.** (1996) Biostatistik. - 2. akt. u. erw. Aufl., Springer, Berlin.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., and Stahl, D. A.** (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Koops, H.-P., and Pommerening-Röser, A.** (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology* **37**: 1-9.
- Koops, H.-P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G., and Wagner, M.** (2003) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin, M. et al. (eds.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.13, Springer Verlag, New York; <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
-

Koussémon, M., Combet-Blanc, Y., Patel, B. K. C., Cayol, J. L., Thomas, P., Garcia, J. L., and Ollivier, B. (2001) *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1373-1382.

Kragelund, C., Kong, Y., van der Waarde, J., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. et al. (2006) Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology-Sgm* **152**: 3003-3012.

Krieg, N. R. (1976) Biology of chemoheterotrophic spirilla. *Bacteriological Reviews* **40**: 55-115.

Krebs, C. J. (1989) *Ecological Methodology*. - Harper Collins Publishers, New York.

Kroppenstedt, R., and Goodfellow, M. (2006) The Family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillospora* and *Thermomonospora*. In: Dworkin, M. (chief-ed.), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., and Stackebrandt, E. (eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd ed., Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer Verlag, New York, p.682-724.

Krsek, M., and Wellington, E. M. H. (1999) Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods* **39**: 1-16.

Krul, J. M., and Veeningen, R. (1977) Synthesis of dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. *Water Research* **11**: 39-43.

Kudo, T., Matsushima, K., Itoh, T., Sasaki, J., and Suzuki, K. (1998) Description of four new species of the genus *Kineosporia*: *Kineosporia succinea* sp. nov., *Kineosporia rhizophila* sp. nov., *Kineosporia mikuniensis* sp. nov. and *Kineosporia rhamnosa* sp. nov., isolated from plant samples, and amended description of the genus *Kineosporia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1245-1255.

Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M. (2001) Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *ASM News* **67**: 456-463.

Kuypers, M. M. M., Sliemers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B. B., Kuenen, J. G. et al. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**: 608-611.

Kuypers, M. M. M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B. M., Amann, R. et al. (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6478-6483.

La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A., and Danovaro, R. (2001) Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fishfarm disturbance in coastal sediments. *Environmental Pollution* **112**: 427-434.

-
- La Scola, B., Birtles, R. J., Mallet, M. N., and Raoult, D.** (1998) *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 2847-2852.
- Labbé, N., Juteau, P., Parent, S., and Villemur, R.** (2003) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal biodome, Canada. *Microbial Ecology* **46**: 12-21.
- Labeda, D. P., Testa, R. T., Lechevalier, M. P., and Lechevalier, H. A.** (1984) *Saccharothrix* - a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiosis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 426-431.
- Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175.
- LaPara, T. M., Nakatsu, C. H., Pantea, L., and Alleman, J. E.** (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3951-3959.
- Larsen, L. H., Kjaer, T., and Revsbech, N. P.** (1997) A microscale NO₃⁻-biosensor for environmental applications. *Analytical Chemistry* **69**: 3527-3531.
- Lashof, D. A., and Ahuja, D. R.** (1990) Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature* **344**: 529-531.
- Laverman, A.M., Van Cappellen, P., van Rotterdam-Los, D., Pallud, C., and Abell, J.** (2006) Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 179-192.
- Lawson, G. H. K., Leaver, J. L., Pettigrew, G. W., and Rowland, A. C.** (1981) Some features of *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* subsp. nov., nom. rev. and their taxonomic significance. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**: 385-391.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H., and Wagner, M.** (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1289-1297.
- Lee, H. W., Lee, S. Y., Lee, J. W., Park, J. B., Choi, E. S., and Park, Y. K.** (2002) Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* **41**: 85-94.
- Lensi, R., Beaupied, H., and Moiroud, A.** (1990) Denitrification in Actinorhizae. *Acta Oecologica - International Journal of Ecology* **11**: 391-397.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurkink, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J. et al.** (2004) Filamentous *Alphaproteobacteria* associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 716-727.
-

Lewin, R.A. (1970) *Flexithrix dorotheae* gen. et sp. nov. (*Flexibacterales*) - and suggestions for reclassifying sheathed bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **16**: 511-515.

Lin, Y. T., and Shieh, W. Y. (2006) *Zobellella denitrificans* gen. nov., sp nov and *Zobellella taiwanensis* sp. nov., denitrifying bacteria capable of fermentative metabolism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1209-1215.

Liu, H. P., Takio, S., Satoh, T., and Yamamoto, I. (1999) Involvement in denitrification of the *napKEFDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase system in the denitrifying phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **63**: 530-536.

Loesche, W. J., Gibbons, R. J., and Socransky, S. S. (1965) Biochemical characteristics of *Vibrio sputorum* and relationship to *Vibrio bubulus* and *Vibrio fetus*. *Journal of Bacteriology* **89**: 1109-1116.

Loy, A., Horn, M., and Wagner, M. (2003) probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* **31**: 514-516.

Lu, S. P., Ryu, S. H., Chung, B. S., Chung, Y. R., Park, W., and Jeon, C. O. (2007) *Simplicispira limi* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 31-34.

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.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2000) Brock - Biology of Microorganisms, 9th ed., Prentice-Hall International, UK.

Magnusson, G., Edin, H., and Dalhammar, G. (1998) Characterisation of efficient denitrifying bacteria strains isolated from activated sludge by 16S-rDNA analysis. *Water Science and Technology* **38**: 63-68.

Mahmood, S., Freitag, T. E., and Prosser, J. I. (2006) Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology* **56**: 482-493.

Manconi, I., van der Maas, P., and Lens, P. N. L. (2006a) Effect of sulfur compounds on biological reduction of nitric oxide in aqueous Fe(II)EDTA(2-) solutions. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **15**: 40-49.

Manconi, I., Carucci, A., Lens, P., and Rossetti, S. (2006b) Simultaneous biological removal of sulphide and nitrate by autotrophic denitrification in an activated sludge system. *Water Science and Technology* **53**: 91-99.

-
- Manconi, I., Van der Maas, P., and Lens, P.** (2006c) Effect of copper dosing on sulfide inhibited reduction of nitric and nitrous oxide. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **15**: 400-407.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K.-H.** (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 593-600.
- Marmur, J.** (1961) Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**: 208-218.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., and Catroux, G.** (2001) DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2354-2359.
- Massana, R., Murray, A., Preston, C., and DeLong, E.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 50-56.
- Masters, A. M., Ellis, T. M., Carson, J. M., Sutherland, S. S., and Gregory, A. R.** (1995) *Dermatophilus chelonae* sp. nov., isolated from chelonids in Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 50-56.
- Matsuyama, H., Yumoto, I., Kudo, T., and Shida, O.** (2003) *Rhodococcus tukisamuensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1333-1337.
- Matsuzaka, E., Nomura, N., Nakajima-Kambe, T., Okada, N., and Nakaharai, T.** (2003) A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**: 409-411.
- Matthies, C., Kuhner C. H., Acker, G., and Drake, H. L.** (2001) *Clostridium uliginosum* sp. nov., a novel acid-tolerant, anaerobic bacterium with connecting filaments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1119-1125.
- Mazzola, A., Mirto, S., La Rosa, T., Fabiano, M., and Danovaro, R.** (2000) Fish-farming effects on benthic community structure in coastal sediments: analysis of meiofaunal recovery. *ICES Journal of Marine Science* **57**: 1454-1461.
- McFadden, B. A., and Howes, W. V.** (1961) *Pseudomonas indigofera*. *Journal of Bacteriology* **81**: 858-862.
- McInerney, M. J., Bhupathiraju, V. K., and Sublette, K. L.** (1992) Evaluation of a microbial method to reduce hydrogen sulfide levels in a porous rock biofilm. *Journal of Industrial Microbiology* **11**: 53-58.
- McInerney, M. J., Wofford, N. Q., and Sublette, K. L.** (1996) Microbial control of hydrogen sulfide production in a porous medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-8**: 933-944.
-

Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gadon, N., and Fuchs, G. (2002) Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov.. *Archives of Microbiology* **178**: 26-35.

Mechichi, T., Stackebrandt, E., and Fuchs, G. (2003) *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing beta-proteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 147-152.

Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* **101**: 20-78.

Meyer, R. L., Risgaard-Petersen, N., and Allen, D. E. (2005) Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6142-6149.

Milford, A.D., Achenbach, L.A., Jung, D.O., and Madigan, M.T. (2000) *Rhodobaca bogoriensis* gen. nov. and sp. nov., an alkaliphilic purple nonsulfur bacterium from African Rift Valley soda lakes. *Archives of Microbiology* **174**: 18-27.

Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., and Ghiorse, W. C. (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4715-4724.

Milstein, A., Zoran, M., Kochba, M., and Avnimelech, Y. (2001) Effect of different management practices on water quality of intensive tilapia culture systems in Israel. *Aquaculture International* **9**: 133-152.

Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Pimenov, N. V., Tourova, T. P., Antipov, A. N. et al. (2003) *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 323-329.

Mirto, S., La Rosa, T., Danovaro, R., and Mazzola, A. (2000) Microbial and meiofaunal response to intensive mussel farm biodeposition in coastal sediments of the Western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* **40**: 244-252.

Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2156-2162.

Mohan, S. B., Schmid, M., Jetten, M., and Cole, J. (2004) Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 433-443.

Molina, V., Ulloa, O., Farias, L., Urrutia, H., Ramirez, S., Junier P., and Witzel, K.-P. (2007) Ammonia-oxidizing β -*Proteobacteria* from the oxygen minimum zone off northern Chile. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 3547-3555.

-
- Montoya, R. A., Lawrence, A. L., Grant, W. E., and Velasco, M.** (2002) Simulation of inorganic nitrogen dynamics and shrimp survival in an intensive shrimp culture system. *Aquaculture Research* **33**: 81-94.
- Moran, M. A., Buchan, A., Gonzalez, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Kiene, R. P. et al.** (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* **432**: 910-913.
- Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Blasco, R., and Castillo, F.** (1999) Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology* **181**: 6573-6584.
- Mounier, E., Hallet, S., Cheneby, D., Benizri, E., Gruet, Y., Nguyen, C. et al.** (2004) Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology* **6**: 301-312.
- Mulder, A., Vandegraaf, A. A., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.** (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 177-183.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., and Jannasch, H. W.** (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**: 165-172.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoedes, H., Schäfer, H., and Wawer, C.** (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., and de Bruijn, F.J. (eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3rd ed., vol. 3.4.4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Muyzer, G., and Smalla, K.** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**: 127-141.
- Myhr, S., Lillebo, B. L. P., Sunde, E., Beeder, J., and Torsvik, T.** (2002) Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 400-408.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Horikoshi, K., and Sako, Y.** (2005) *Nitratiruptor tergarcus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifractor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the ϵ -Proteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 925-933.
-

Nanba, K., King, G. M., and Dunfield, K. (2004) Analysis of facultative lithotroph distribution and diversity on volcanic deposits by use of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2245-2253.

Narasingarao, P., and Häggblom, M. M. (2006) *Sedimenticola selenatireducens*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic selenate-respiring bacterium isolated from estuarine sediment. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 382-388.

Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J. et al. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**: 1017-1024.

Naylor, R., and Burke, M. (2005) Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources* **30**: 185-218.

Nedashkovskaya, O. I., Suzuki, M., Vysotskii, M. V., and Mikhailov, V. V. (2003) *Vitellibacter vladivostokensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1281-1286.

Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H., and Schleifer, K.-H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4329-4339.

Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., and Ellis, W. A. (1985) Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**: 342-356.

Nemati, M., Jenneman, G. E., and Voordouw, G. (2001) Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnology and Bioengineering* **74**: 424-434.

Neyra, C. A., Dobereiner, J., Lalande, R., and Knowles, R. (1977) Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. *Canadian Journal of Microbiology* **23**: 300-305.

Nicol, G. W., and Schleper, C. (2006) Ammonia-oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology* **14**: 207-212.

Nielsen, L. P. (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiology Ecology* **86**: 357-362.

Nielsen, P. H. (1996) Adsorption of ammonium to activated sludge. *Water Research* **30**: 762-764.

Nielsen, P. H., Andreasen, K., Lee, N., and Wagner, M. (1999) Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge. *Water Science and Technology* **39**: 1-9.

-
- Nierman, W. C., DeShazer, D., Kim, H. S., Tettelin, H., Nelson, K. E., Feldblyum, T. et al.** (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 14246-14251.
- Nizzoli, D., Welsh, D. T., Fano, E. A., and Viaroli, P.** (2006) Impact of clam and mussel farming on benthic metabolism and nitrogen cycling, with emphasis on nitrate reduction pathways. *Marine Ecology - Progress Series* **315**: 151-165.
- O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R., and Colleran, E.** (1998) Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry* **33**: 555-569.
- Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y.** (1999a) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3182-3191.
- Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H., and Watanabe, Y.** (1999b) Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5107-5116.
- Okabe, S., Santegoeds, C. M., and de Beer, D.** (2003) Effect of nitrite and nitrate on in situ sulfide production in an activated sludge immobilized agar gel film as determined by use of microelectrodes. *Biotechnology and Bioengineering* **81**: 570-577.
- Okabe, S., Kindaichi, T., Ito, T., and Satoh, H.** (2004) Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 86-95.
- Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., and Strous, M.** (2007) Anammox. In: Bothe, H., Ferguson, S. J., and Newton, W. E. (eds.), *Biology of the nitrogen cycle*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands and Oxford, UK.
- Ouan, Z. X., Im, W. T., and Lee, S. T.** (2006) *Azonexus caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1043-1046.
- Ouverney, C. C., and Fuhrman, J. A.** (1999) Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1746-1752.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. T., and Minz, D.** (2001) Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3426-3433.
- Pachmayr, F.** (1960) Vorkommen und Berstimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, Universität München.
-

- Palleroni, N. J., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., Solanes, R. E., and Mandel, M.** (1970) Taxonomy of aerobic pseudomonads - properties of *Pseudomonas stutzeri* group. *Journal of General Microbiology* **60**: 215-231.
- Palleroni, N. J.** (1984) Family I. *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555^{Al}. In: Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 141-199.
- Park, H. D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S., and Francis, C. A.** (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5643-5647.
- Parra, G., and Yúfera, M.** (1999) Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and senegal sole *Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture Research* **30**: 857-863.
- Pasciak, W. J., and Gavis, J.** (1974) Transport limitation of nutrient uptake in phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **19**: 881-898.
- Patureau, D., Davison, J., Bernet, N., and Moletta, R.** (1994) Denitrification under various aeration conditions in *Comamonas* sp., strain SGLY2. *FEMS Microbiology Ecology* **14**: 71-78.
- Patureau, D., Godon, J. J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet, N., Delgenes, J. P., and Moletta, R.** (1998) *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 775-782.
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D. et al.** (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13148-13153.
- Peña, A., Valens, M., Santos, F., Buczolits, S., Anton, J., Kämpfer, P. et al.** (2005) Intra-specific comparative analysis of the species *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **9**: 151-161.
- Penton, C. R., Devol, A. H., and Tiedje, J. M.** (2006) Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6829-6832.
- Percheron, G., Michaud, S., Bernet, N., and Moletta, R.** (1998) Nitrate and nitrite reduction of a sulphide-rich environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **72**: 213-220.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R.** (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3094-3101.
-

-
- Pernthaler, A., and Amann, R.** (2004) Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5426-5433.
- Petri, R., and Imhoff, J. F.** (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., and Højberg, O.** (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1446**: 1-23.
- Philippot, L.** (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1577**: 355-376.
- Philippot, L., Piutti, S., Martin-Laurent, F., Hallet, S., and Germon, J. C.** (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 6121-6128.
- Philippot, L.** (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochemical Society Transactions* **33**: 200-204.
- Philippot, L., and 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.
- Pichinoty, F.** (1977) Etude de six souches de *Agrobacterium tumefaciens* et *A. radiobacter*. *Annales de Microbiologie (Inst. Pasteur)* **128A**: 303-310.
- Pichinoty, F., de Barjac, H., Mandel, M., and Asselineau, J.** (1983) Description of *Bacillus azotoformans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 660-662.
- Poduska, R. A., and Anderson, B. D.** (1981) Successful storage lagoon odor control. *Journal Water Pollution Control Federation* **53**: 299-310.
- Polz, M. F., and Cavanaugh, C. M.** (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3724-3730.
- Pommerening-Röser, A., Rath, G., and Koops, H.-P.** (1996) Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 344-351.
- Poth, M., and Focht, D. D.** (1985) N-15 kinetic analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea* - an examination of nitrifier denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1134-1141.
- Poth, M.** (1986) Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 957-959.
-

- Potter, L. C., Millington, P., Griffiths, L., Thomas, G. H., and Cole, J. A.** (1999) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochemical Journal* **344**: 77-84.
- Preuss, M., and Klemme, J. H.** (1983) Purification and characterization of a dissimilatory nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Zeitschrift für Naturforschung C - a Journal of Biosciences* **38**: 933-938.
- Prieme, A., Braker, G., and Tiedje, J. M.** (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1893-1900.
- Prosser, J. I.** (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **30**: 125-181.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Roser, A., and Koops, H.-P.** (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1485-1494.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., and Murrell, J. C.** (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L. A., Marin, I., and Berenguer, J.** (1998) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *Journal of Bacteriology* **180**: 3137-3143.
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., and Gordon, J. I.** (2006) Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* **127**: 423-433.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K. et al.** (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 43-51.
- Reinsel, M. A., Sears, J. T., Stewart, P. S., and McInerney, M. J.** (1996) Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. *Journal of Industrial Microbiology* **17**: 128-136.
- Reis, M. A. M., Almeida, J. S., Lemos, P. C., and Carrondo, M. J. T.** (1992) Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* **40**: 593-600.
- Revsbech, N. P.** (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnology and Oceanography* **34**: 474-478.
- Reyes-Avila, J. S., Razo-Flores, E., and Gomez, J.** (2004) Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research* **38**: 3313-3321.
-

-
- Richardson, D. J., and Ferguson, S. J.** (1992) The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha*. *Archives of Microbiology* **157**: 535-537.
- Richardson, D. J., Berks, B. C., Russell, D. A., Spiro, S., and Taylor, C. J.** (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 165-178.
- Risgaard-Petersen, N., and Risgaard, S.** (1995) Nitrate reduction in sediments and water logged soils measured by ¹⁵N-techniques. In: Alef, K., and Nannipieri, P. (eds.), *Methods in applied soil microbiology*, Academic Press, New York, p. 287-296.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A. M., Ingvarlsen, S., Schmid, M. C., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M. et al.** (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**: 93-96.
- Rivas, R., Sanchez-Marquez, S., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. M., and Velazquez, E.** (2005) *Martellella mediterranea* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium isolated from a subterranean saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 955-959.
- Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.** (1983) *Thiosphaera antotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. *Journal of General Microbiology* **129**: 2847-2855.
- Robertson, L. A., Vanniell, E. W. J., Torremans, R. A. M., and Kuenen, J. G.** (1988) Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2812-2818.
- Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.** (1990) Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **57**: 139-152.
- Robinson, J., and Gibbons, N. E.** (1952) The effect of salts on the growth of *Micrococcus halodenitrificans* n. sp.. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* **30**: 147-154.
- Rocourt, J., Wehmeyer, U., and Stackebrandt, E.** (1987) Transfer of *Listeria dentrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 266-270.
- Rodriguez-Valera, F., Juez, G., and Kushner, D. J.** (1983) *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate utilizing extreme halophile. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 369-381.
- Rossau, R., Kersters, K., Falsen, E., Jantzen, E., Segers, P., Union, A. et al.** (1987) *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC Group IVe) - relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 198-210.
-

Rosselló-Mora, R., and Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 39-67.

Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4704-4712.

Rösch, C., Mergel, A., and Bothe, H. (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3818-3829.

Rüger, H. J., and Tan, T. L. (1983) Separation of *Alcaligenes denitrificans* sp. nov., nom. rev. from *Alcaligenes faecalis* on the Basis of DNA-Base composition, DNA homology, and nitrate reduction. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 85-89.

Rüger, H. J., and Höfle, M. G. (1992) Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria – *Agrobacterium atlanticum* sp. nov., *Agrobacterium meteori* sp. nov., *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev., *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev., and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 133-143.

Rysgaard, S., Glud, R. N., Risgaard-Petersen, N., and Dalsgaard, T. (2004) Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnology and Oceanography* **49**: 1493-1502.

Sachs, L. (2004) *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden.* - 11. überarbeitete und aktualisierte Aufl., Springer-Verlag, Berlin.

Saha, P., Krishnamurthi, S., Mayilraj, S., Prasad, G. S., Bora, T. C., and Chakrabarti, T. (2005) *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1491-1495.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Saitoh, S., Suzuki, T., and Nishimura, Y. (1998) Proposal of *Craurococcus roseus* gen. nov., sp. nov. and *Paracraurococcus ruber* gen. nov., sp. nov., novel aerobic bacteriochlorophyll *a*-containing bacteria from soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1043-1047.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuelsson, M. O. (1985) Dissimilatory nitrate reduction to nitrite, nitrous oxide, and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 812-815.

Satoh, T., Hoshino, Y., and Kitamura, H. (1976) *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Archives of Microbiology* **108**: 265-269.

-
- Satoh, T.** (1981) Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome c from a photo-denitrifier, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *Plant and Cell Physiology* **22**: 443-452.
- Satoh, H., Yamakawa, T., Kindaichi, T., Ito, T., and Okabe, S.** (2006) Community structures and activities of nitrifying and denitrifying bacteria in industrial wastewater-treating biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **94**: 762-772.
- Scala, D. J., and Kerkhof, L. J.** (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, D. J., and Kerkhof, L. J.** (1999) Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1681-1687.
- Scala, D. J., and Kerkhof, L. J.** (2000) Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1980-1986.
- Schleper, C., Jurgens, G., and Jonuscheit, M.** (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 479-488.
- Schloss, P. D., Larget, B. R., and Handelsman, J.** (2004) Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5485-5492.
- Schloss, P. D., and Handelsman, J.** (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.
- Schmider, F., and Ottow, J. C. G.** (1986) Characterization of denitrifying bacteria in the various compartments of a biological sewage plant. *Archiv für Hydrobiologie* **106**: 497-512.
- Schmidt, I., and Bock, E.** (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Archives of Microbiology* **167**: 106-111.
- Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A., and Diekmann, H.** (1999) *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1045-1051.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R., and Schleifer, K.-H.** (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4641-4647.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., and Amann, R.** (1998) Identification and activity in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3480-3485.
-

- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S., and Amann, R.** (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3690-3696.
- Schramm, A., Fuchs, B. M., Nielsen, J. L., Tonolla, M., and Stahl, D. A.** (2002) Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environmental Microbiology* **4**: 713-720.
- Schramm, A.** (2003) In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal* **20**: 313-333.
- Schubert, C. J., Durisch-Kaiser, E., Wehrli, B., Thamdrup, B., Lam, P., and Kuypers, M. M. M.** (2006) Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology* **8**: 1857-1863.
- Senga, Y., Mochida, K., Fukumori, R., Okamoto, N., and Seike, Y.** (2006) N₂O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H₂S on dissimilatory nitrate reduction. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **67**: 231-238.
- Shapleigh, J. P.** (2003) The Denitrifying Prokaryotes. In: Dworkin, M. et al. (eds.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.13, Springer Verlag, New York; <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., and Myers, R. M.** (1989) Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 232-236.
- Sheffield, V. C., Beck, J. S., and Stone, E. M.** (1992) A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *Biotechniques* **12**: 386-388.
- Shi, B. H., Arunpairojana, V., Palakawong, S., and Yokota, A.** (2002) *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **48**: 335-343.
- Shieh, W. Y., Lin, Y. T., and Jean, W. D.** (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2307-2312.
- Shioi, Y., Doi, M., Arata, H., and Takamiya, K.** (1988) A denitrifying activity in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. strain Och-114. *Plant and Cell Physiology* **29**: 861-865.
- Shoun, H., Kim, D. H., Uchiyama, H., and Sugiyama, J.** (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* **94**: 277-281.
-

-
- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N., and Matsuo, M.** (1998) Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thio-luteus*. *Journal of Bacteriology* **180**: 4413-4415.
- Siddiqui, R. A., Warneckeberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., and Friedrich, B.** (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology* **175**: 5867-5876.
- Simon, J.** (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 285-309.
- Singleton, D. R., Furlong, M. A., Rathbun, S. L., and Whitman, W. B.** (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4374-4376.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S. et al.** (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4742-4751.
- Smibert, R. M., and Krieg, N. R.** (1994) Phenotypic characterization. In: Gerhardt P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R. (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington.
- Smith, M. S., and Zimmerman, K.** (1981) Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal* **45**: 865-871.
- Smith, M. S.** (1983) Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 1545-1547.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.** (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2884-2896.
- Snaidr, J., Beimfohr, C., Levantesi, C., Rossetti, S., van der Waarde, J., Geurkink, B. et al.** (2002) Phylogenetic analysis and in situ identification of "Nostocoida limicola"-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* **46**: 99-104.
- Sneath, P. H. A.** (1956) Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *Journal of General Microbiology* **15**: 70-98.
- Sneath, P. H. A.** (1984) Genus *Janthinobacterium*, De Ley, Segers and Gillis 1978, 164^{Al}. In: Krieg, N. R., and Holt, J. G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 376-377.
- Snell, J. J. S., and Lapage, S. P.** (1976) Transfer of some saccharolytic *Moraxella* species to *Kingella* Henriksen and Bovre 1976, with descriptions of *Kingella indologenes* sp.nov. and *Kingella denitrificans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **26**: 451-458.
-

- Song, B., Häggblom, M. M., Zhou, J. Z., Tiedje, J. M., and Palleroni, N. J.** (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1129-1140.
- Sørensen, J.** (1978) Occurrence of nitric and nitrous oxides in a coastal marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **36**: 809-813.
- Sørensen, J., Tiedje, J. M., and Firestone, R. B.** (1980) Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 105-108.
- Sørensen, J., Rasmussen, L. K., and Koike, I.** (1987) Micromolar sulfide concentrations alleviate acetylene blockage of nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* **33**: 1001-1005.
- Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey, F. A. et al.** (2001) *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 565-580.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Galinski, E. A., Belloch, C., and Tindall, B. J.** (2006) Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050 (vol 56, pg 379, 2006). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 923-923.
- Sperl, G. T., and Hoare, D. S.** (1971) Denitrification with methanol - selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *Journal of Bacteriology* **108**: 733-736.
- Spieck, E., Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski, A., and Daims, H.** (2006) Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environmental Microbiology* **8**: 405-415.
- Spring, S., Jackel, U., Wagner, M., and Kämpfer, P.** (2004) *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N₂O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 99-106.
- Springer, N., Amann, R., and Ludwig, W.** (1993) The design and application of ribosomal RNA-targeted, fluorescent oligonucleotide probes for the identification of endosymbionts in protozoa. In: Clapp, J.P. (ed)., *Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 133-144.
-

-
- Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B., and Schink, B.** (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 953-956.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B. M.** (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.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., and Doudoroff, M.** (1966) Aerobic pseudomonads - a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**: 159-217.
- Stehr, G., Böttcher, B., Dittberner, P., Rath, G., and Koops, H.-P.** (1995) The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiology Ecology* **17**: 177-186.
- Stolz, J. F., and Basu, P.** (2002) Evolution of nitrate reductase: Molecular and structural variations on a common function. *Chembiochem* **3**: 198-206.
- Stres, B., Mahne, I., Avgustin, G., and Tiedje, J. M.** (2004) Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 301-309.
- Strous, M., van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M.** (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research* **31**: 1955-1962.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T. et al.** (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.
- Stüven, R., Vollmer, M., and Bock, E.** (1992) The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* **158**: 439-443.
- Suyama, T., Shigematsu, T., Takaichi, S., Nodasaka, Y., Fujikawa, S., Hosoya, H. et al.** (1999) *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the beta-subclass of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 449-457.
- Suzuki, I., Dular, U., and Kwok, S. C.** (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *Journal of Bacteriology* **120**: 556-558.
- Swartzlander, J. H., Rehberger, T. G., and Hibberd, C. A.** (1993) In vivo denitrification by a selected strain of *Propionibacterium acidipropionici* in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, **71**: 277-277.
- Sweerts, J., Debeer, D., Nielsen, L. P., Verdouw, H., Vandenheuvel, J. C., Cohen, Y., and Cappenberg, T. E.** (1990) Denitrification by sulfur oxidizing *Beggiatoa* spp. mats on freshwater sediments. *Nature* **344**: 762-763.
-

Tabatabai, M. A. (1992) Appendix: Methods of measurements of sulfur in soils, plants, materials and water, In: Howarth, R.W., Stewart, J.W.B., Ivanov, M.V. (eds.), *Sulfur cycling on the continents: wetlands, terrestrial ecosystems and associated water bodies (Scope 48)*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, pp. 307-344.

Takai, Y., and Kamura, T. (1966) Mechanism of reduction in waterlogged paddy soil. *Folia Microbiologica* **11**: 304-&.

Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F., and Horikoshi, K. (2006) *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1725-1733.

Takeuchi, M., and Hatano, K. (1998a) Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 739-747.

Takeuchi, M., and Hatano, K. (1998b) Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 973-982.

Tal, Y., Watts, J. E. M., Schreier, S. B., Sowers, K. R., and Schreier, H. J. (2003) Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* **215**: 187-202.

Tal, Y., Watts, J. E. M., and Schreier, H. J. (2005) Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner Harbor sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1816-1821.

Tal, Y., Watts, J. E. M., and Schreier, H. J. (2006) Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2896-2904.

Tam, T. Y., and Knowles, R. (1979) Effects of sulfide and acetylene on nitrous oxide reduction by soil and by *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 1133-1138.

Tamaoka, J., and Komagata, K. (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Letters* **25**: 125-128.

Tamura, H., Goto K., Yotsuyan, T., and Nagayama, M. (1974) Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-phenanthroline in presence of large amounts of iron(III). *Talanta* **21**: 314-318.

Tanner, A. C. R., Badger, S., Lai, C. H., Listgarten, M. A., Visconti, R. A., and Socransky, S. S. (1981) *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylo-*

bacter concisus sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**: 432-445.

Tarlera, S., and Denner, E. B. M. (2003) *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the β -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1085-1091.

Tarrand, J. J., Krieg, N. R., and Dobereiner, J. (1978) Taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and 2 species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 967-980.

Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Herndl, G. J. (2004) Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence in situ Hybridization and Microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4411-4414.

Telang, A. J., Ebert, S., Foght, J. M., Westlake, D. W. S., Jenneman, G. E., Gevertz, D., and Voordouw, G. (1997) Effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genome probing. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1785-1793.

Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1994) Evolutionary relationships among ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* **176**: 6623-6630.

Thamdrup, B., and Dalsgaard, T. (2002) Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1312-1318.

Thamdrup, B., Dalsgaard, T., Jensen, M. M., Ulloa, O., Farias, L., and Escobedo, R. (2006) Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. *Limnology and Oceanography* **51**: 2145-2156.

Thiemann, J. E., Pagani, H., and Beretta, G. (1968) A new genus of Actinomycetales – *Microtetraspora* gen. nov.. *Journal of General Microbiology* **50**: 295-303.

Thierry, S., Macarie, H., Lizuka, T., Geissdorfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M. et al. (2004) *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et. Al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2245-2255.

Tidje, J. M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder, A. J. B. (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons, New York, p. 179-243.

Timmer-ten Hoor, A. (1975) A new type of thiosulfate oxidizing, nitrate reducing microorganism: *Thiomicrospira denitrificans* sp. nov.. *Neth. J. Sea Res.* **9**: 344-350.

Toh, S. K., Webb, R. I., and Ashbolt, N. J. (2002) Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microbial Ecology* **43**: 154-167.

Tomlinson, G. A., Jahnke, L. L., and Hochstein, L. I. (1986) *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 66-70.

Tovar, A., Moreno, C., Manuel-Vez, M. P., and Garcia-Vargas, M. (2000) Environmental implications of intensive marine aquaculture in earthen ponds. *Marine Pollution Bulletin* **40**: 981-988.

Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* **7**: 1985-1995.

Trimmer, M., Nicholls, J. C., and Deflandre, B. (2003) Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6447-6454.

Trimmer, M., Risgaard-Petersen, N., Nicholls, J. C., and Engstrøm, P. (2006) Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. *Marine Ecology-Progress Series* **326**: 37-47.

Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A., and Sugiyama, J. (1998) Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev.. *Journal of General and Applied Microbiology* **44**: 201-210.

Unz, R. F. (1984) Genus IV. *Zoogloea* Itzigson 1868, 30^{Al}. In: Krieg, N. R., and Holt, J. G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 214-219.

Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K. I., and Komagata, K. (1995) Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 528-532.

Urakawa, H., Kurata, S., Fujiwara, T., Kuroiwa, D., Maki, H., Kawabata, S. et al. (2006) Characterization and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology* **8**: 787-803.

Valentine, R. C., Shapiro, B. M., and Stadtman, E. R. (1968) Regulation of glutamine synthetase .XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **7**: 2143-2152.

Vandamme, P., and Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2285-2289.

-
- Van de Graaf, A. A., Mulder, A., Debruijn, P., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.** (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1246-1251.
- Van de Graaf, A. A., deBruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., and Kuenen, J. G.** (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology-UK* **143**: 2415-2421.
- Van Niel, E. W. J., Braber, K. J., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.** (1992) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **62**: 231-237.
- Van Rijn, J.** (1996) The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture - a review. *Aquaculture* **139**: 181-201.
- Van Rijn, J., Tal, Y., and Schreier, H. J.** (2006) Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering* **34**: 364-376.
- Vedenina, I. Y., and Govorukhina, N. I.** (1988) Formation of a methylotrophic denitrifying coenosis in a sewage purification system for removal of nitrates. *Microbiology* **57**: 261-268.
- Verhoefen, W., Koster, A. L., and van Nieuvelt, M. C. A.** (1954) Studies on true dissimilatory nitrate reduction. III. *Micrococcus denitrificans* Beijerinck, a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **20**: 273-284.
- Véron, M., Thibault, P., and Second, L.** (1959) *Neisseria mucosa* (*Diplococcus mucosus* Lingelsheim) .1. Description Bacteriologique et Etude du Pouvoir Pathogene. *Annales de l' Institut Pasteur* **97**: 497-510.
- Vobis, G.** (2006) The Genus *Actinoplanes* and Related Genera. In: Dworkin, M. (chief-ed.), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd ed., Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer Verlag, New York, p.632-653.
- Von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., and Stackebrandt, E.** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.
- Völkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A., and Stetter, K. O.** (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2918-2926.
- Vredenburg, L. H. J., Nielsen, K., Potma, A. A., Kristensen, G. H., and Sund, C.** (1997) Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater. *Water Science and Technology* **36**: 93-100.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., and Schleifer, K.-H.** (1995) In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **18**: 251-264.
-

- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J., and Amann, R.** (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology* **34**: 237-244.
- Wagner, M., and Loy, A.** (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 218-227.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., and Daims, H.** (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 665-680.
- Waibel, A. E., Peter, T., Carslaw, K. S., Oelhaf, H., Wetzel, G., Crutzen, P. J. et al.** (1999) Arctic ozone loss due to denitrification. *Science* **283**: 2064-2069.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A., and Popper, D. M.** (1993) Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *Journal of Fish Biology* **42**: 321-328.
- Wang, J. L., and Jing, K.** (2005) The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochemistry* **40**: 1973-1978.
- Ward, B. B., Martino, D. P., Diaz, M. C., and Joye, S. B.** (2000) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2873-2881.
- Watson, S. W., Bock, E., Valois, F. W., Waterbury, J. B., and Schlosser, U.** (1986) *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov. - a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* **144**: 1-7.
- Weirich, C. R., and Riche, M.** (2006a) Acute tolerance of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquaculture Research* **37**: 855-861.
- Weirich, C.R., and Riche, M.A.** (2006b) Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fisheries Science* **72**: 915-921.
- Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E. et al.** (1989) *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and '*Pseudomonas carboxydoflava*'), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 319-333.
- Winogradsky, S.** (1890) Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur* **4**: 213-331.
- Wolin, M. J., Wolin, E. A., and Jacobs, N. J.** (1961) Cytochrome-producing anaerobic vibrio, *Vibrio succinogenes*, sp. n.. *Journal of Bacteriology* **81**: 911-917.
-

Wood, A. P., and Kelly, D. P. (1983) Autotrophic, mixotrophic and heterotrophic growth with denitrification by *Thiobacillus* A2 under anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Letters* **16**: 363-370.

Wu, R.S.S., Lam, K. S., Mackay, D. W., Lau, T. C., and Yam, V. (1994) Impact of marine fish farming on water quality and bottom sediment - a case study in the subtropical environment. *Marine Environmental Research* **38**: 115-145.

Wu, R. S. S. (1995) The environmental impact of marine fish culture: Towards a sustainable future. *Marine Pollution Bulletin* **31**: 159-166.

Xie, C. H., and Yokota, A. (2005) Phylogenetic analysis of *Alysiella* and related genera of *Neisseriaceae*: Proposal of *Alysiella crassa* comb. nov., *Conchiformibium steedae* gen. nov., comb. nov., *Conchiformibium kuhniae* sp. Nov. and *Bergeriella denitrificans* gen. nov., comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* **51**: 1-10.

Xu, M. Y., Guo, J., Cen, Y. H., Zhong, X. Y., Cao, W., and Sun, G. P. (2005) *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 363-368.

Yabuuchi, E., and Yano, I. (1981) *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (Ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**: 477-478.

Yamamoto, M., Ishii, A., Nogi, Y., Inoue, A., and Ito, M. (2006) Isolation and characterization of novel denitrifying alkalithermophiles, AT-1 and AT-2. *Extremophiles* **10**: 421-426.

Yang, P. Y., Nitorisavut, S., and Wu, J. S. (1995) Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions. *Water Research* **29**: 1525-1532.

Yang, Q. X., Jia, Z. J., Liu, R. Y., and Chen, J. J. (2007) Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. *Process Biochemistry* **42**: 180-187.

Yin, S. X., Chen, D., Chen, L. M., and Edis, R. (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 1131-1137.

Yoo, S. H., Weon, H. Y., Kim, B. Y., Hong, S. B., Kwon, S. W., Cho, Y. H. et al. (2006) *Devosia soli* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2689-2692.

Yoon, J. H., Cho, Y. G., Kang, S. S., Kim, S. B., Lee, S. T., and Park, Y. H. (2000a) *Rhodococcus koreensis* sp. nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1193-1201.

Yoon, J. H., Kang, S. S., Cho, Y. G., Lee, S. T., Kho, Y. H., Kim, C. J., and Park, Y. H. (2000b) *Rhodococcus pyridinovorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2173-2180.

Yoon, J. H., Lee, M. H., Oh, T. K., and Park, Y. H. (2005) *Muricauda flavescens* sp. nov. and *Muricauda aquimarina* sp. nov., isolated from a salt lake near Hwajinpo Beach of the East Sea in Korea, and emended description of the genus *Muricauda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1015-1019.

Yoon, J. H., Kang, S. J., Park, S., and Oh, T. K. (2007) *Devosia insulae* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1310-1314.

Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y. (2001) Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 346-353.

Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y. (2004a) Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. *FEMS Microbiology Letters* **235**: 183-189.

Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y. (2004b) Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3152-3157.

Yoshie, S., Ogawa, T., Makino, H., Hirosawa, H., Tsuneda, S., and Hirata, A. (2006a) Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. *Letters in Applied Microbiology* **42**: 277-283.

Yoshie, S., Makino, H., Hirosawa, H., Shirotani, K., Tsuneda, S., and Hirata, A. (2006b) Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 182-189.

Yoshinari, T. (1980) N₂O reduction by *Vibrio succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 81-84.

Yurkov, V. V. (2006) Aerobic phototrophic proteobacteria. In: Dworkin, M. (chief-ed.), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., and Stackebrandt, E (eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd ed., Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*, Springer, New York, pp. 562-584.

Zablutowicz, R. M., Eskew, D. L., and Focht, D. D. (1978) Denitrification in *Rhizobium*. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 757-760.

Zhang, J. L., Zhang, Y. M., Xiao, C. S., Liu, Z. H., and Goodfellow, M. (2002) *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 2121-2126.

-
- Zhao, J. S., Manno, D., Leggiadro, C., O'Neill, D., and Hawari, J.** (2006) *Shewanella hali-faxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 205-212.
- Zhou, J. Z., Fries, M. R., Cheesanford, J. C., and Tiedje, J. M.** (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 500-506.
- Zumft, W. G., and Matsubara, T.** (1982) A novel kind of multi-copper protein as terminal oxidoreductase of nitrous oxide respiration in *Pseudomonas perfectomarinus*. *FEBS Letters* **148**: 107-112.
- Zumft, W. G.** (1992) The denitrifying prokaryotes. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., Springer Verlag, New York, p. 554-582.
- Zumft, W. G.** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.
- Zwirgmaier, K., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.** (2004) Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH. *Molecular Microbiology* **51**: 89-96.
-

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere:

- Prof. Harold L. Drake, der mir die Promotion am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie in Bayreuth ermöglichte, mir stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand und zur Lösung mancher Probleme beigetragen hat.
 - Dr. Andreas Schramm für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung eines ausgedehnten Gastaufenthalts an der Universität Århus, die hervorragende Betreuung und die vielen Anregungen und hilfreichen Diskussionen.
 - Allen Projektpartnern aus Bremen und Israel, ohne deren Beiträge diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:
 - Dr. Armin Gieseke und Dr. Peter Stief für die Durchführung und/oder Auswertung der Mikrosensormessungen sowie die Überlassung dieser Daten für diese Arbeit,
 - Carsten Schwermer für das Zur-Verfügung-Stellen der Ergebnisse seiner Batch-Inkubationen mit Sulfid sowie die gute Zusammenarbeit bei den MAR-FISH-Versuchen und den Sulfidexperimenten an nitratreduzierenden und denitrifizierenden Reinkulturen,
 - Dr. Eddie Cytryn und Elinor Yechezkel für ihre Unterstützung vor Ort in Rehovot, Dr. Eddie Cytryn und Liat Koch für die Zusendung von DNA-Extrakten sowie Liat Koch für die Überlassung einiger ihrer Daten,
 - Aviv Jasman für die Wartung des Aquakultur-Systems und die chemischen Routine-messungen.
 - Nastaran Rezakhani vom Microbiology-Department in Århus für ihr *nosZ*-Genbibliothek.
 - Dr. Lars-Peter Nielsen und Dr. Andreas Schramm vom Microbiology-Department in Århus für Messung und Auswertung der ¹⁵N-Daten.
 - Rita Grotjahn aus der Elektronenmikroskopie in Bayreuth für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
 - Dr. Ramón Rosselló-Mora und Mercedes Urdiain vom Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB) in Spanien für die Bestimmung des G+C-Gehalt von „*Geminococcus roseus*“.
 - Dr. José de la Torr e vom Department of Civil and Environmental Engineering der University of Washington in Seattle für die Vorabüberlassung der von ihm entwickelten Crenarchaeen-Primer.
-

- Dr. Martina Herrmann, Dr. Peter Stief und Dr. Andreas Schramm für die Beschaffung von in Bayreuth nicht verfügbarer Literatur.
- Dr. Marcus Horn für die manchmal nötige Vor-Ort-Betreuung in Bayreuth sowie ihm und Dr. Steffen Kolb für die zahlreichen wissenschaftlichen und außerwissenschaftlichen Gespräche.
- Den Technischen Angestellten aus Bayreuth und Århus für Auskunft und Hilfestellung im Labor, Anita Gößner und Daria Schulz aus der Ökologischen Mikrobiologie in Bayreuth für ihre Hilfe mit den Substratspektren, Anita Gößner auch für das Membranspektrum von „*Geminicoccus roseus*“ und Britta Poulsen und Pernille Vester Thykier vom Microbiology-Department in Århus für ihre Unterstützung bei einigen Versuchen während und nach meines Dänemarkaufenthalts.
- Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Ökologische Mikrobiologie in Bayreuth und des Microbiology-Departments in Århus für das gute Arbeitsklima.
- Meiner Mutter und meinem Mann für das Korrekturlesen, meinem Mann auch für die „computertechnische“ Unterstützung.
- Und zu guter Letzt meinem Mann, meinen Eltern und Geschwistern sowie meiner Patentante für ihre Unterstützung und Ermutigung und den Rückhalt, den sie mir gaben.

9 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf verschiedenen Tagungen vorgestellt. Zum Teil wurden sie auch bereits in internationalen Zeitschriften veröffentlicht. Weitere Veröffentlichungen sind vorgesehen.

9.1 Tagungsbeiträge

9.1.1 Poster

Krieger, B. U., Gieseke, A., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., Drake, H. L. and Schramm A. (2004) Nitrifier community structure and kinetics of ammonia oxidation in a marine aquaculture biofilm. Ann. Meet. Verein. Allgem. Angewand. Mikrobiol. BioSpectrum, Abstract PB061, p. 89.

Gieseke, A., Krieger, B. U., Koch, L., Stief, P., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., Drake, H. L. and Schramm, A. (2004) In situ kinetics and community structure of a nitrifying marine aquaculture biofilm. Abstract of the 10th International Symposium on Microbial Ecology, Cancun, Mexico, p. 1098.

Cytryn, E., van Rijn, J., Gelfand, I., Gieseke, A., Krieger, B. U., Drake, H. L., Schramm, A., de Beer, D. and Minz, D. (2004) Community composition and activity of a denitrifying, sulfide-oxidizing biofilter from a zero-discharge marine aquaculture system. Abstract of the 10th International Symposium on Microbial Ecology, Cancun, Mexico, p. 575.

Schwermer, C., Gieseke, A., Krieger, B. U., Schramm, A., van Rijn, J., de Beer, D. (2005) Functional interaction of sulfur and nitrogen cycles in sulfidic, nitrate-rich marine sludge. Ann. Meet. Verein. Allgem. Angewand. Mikrobiol. BioSpectrum, Abstract MÖP046, p. 101.

Krieger, B. U., Gieseke, A., Koch, L., Schwermer, C., Stief, P., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., Drake, H. L. and Schramm, A. (2005) High affinity nitrification in a marine aquaculture biofilm dominated by *Nitrosomonas* Nm143-like ammonia-oxidizers and *Nitrospira marina*-like nitrite oxidizers. Abstracts of the 9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, Finland, p. 149.

Krieger, B. U., Schwermer, C., Rezakhani, N., Horn, M.A., Gieseke, A., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., Drake, H. L. and Schramm, A. (2006) Diversity of nitrate-reducing and denitrifying bacteria in a marine aquaculture biofilter and their response to sulfide. Abstract of the 11th International Symposium on Microbial Ecology, Vienna, Austria, p. 270.

Schwermer, C.U., Krieger, B. U., Lavik, G., Schramm, A., van Rijn, J., de Beer, D., Minz, D., Cytryn, E., Kuypers, M. and Gieseke, A. (2006) Impact of sulfide on nitrate conversion in eutrophic nitrate-rich marine sludge. Abstract of the 11th International Symposium on Microbial Ecology, Vienna, Austria, p. 266.

9.1.2 Kurzvorträge

Krieger, B. U., Rezakhani, N., Schwermer, C., Lavik, G., Gieseke, A., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., Horn, M.A., Drake, H. L. and Schramm, A. (2006) Diversity of nitrate-reducing bacteria in a marine aquaculture biofilter and their response to H₂S. Ann. Meet. Verein. Allgem. Angewand. Mikrobiol. BioSpectrum, Abstract KE29, p. 73.

9.2 Artikel in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System

Eingereichte bzw. bereits erschienene Artikel:

Foesel, B. U., Gössner, A. S., Drake, H. L., and Schramm, A. (2007) *Geminicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., an aerobic phototrophic *Alphaproteobacterium* isolated from a marine aquaculture biofilter. *Syst. Appl. Microbiol.*, in press.

Foesel, B. U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E., de la Torr , J. R., van Rijn, J., Minz, D., Drake, H. L. and Schramm, A. (2007) *Nitrosomonas* Nm143-like Ammonia Oxidizers and *Nitrospira marina*-like Nitrite Oxidizers dominate the Nitrifier Community in a Marine Aquaculture Biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.*, submitted.

Weitere bereits in Vorbereitung befindliche Ver ffentlichungen:

Foesel, B. U., Schwermer, C., Stief, P., Cytryn, E., Minz, D., van Rijn, J., de Beer, D., Drake, H. L., Schramm, A. and Gieseke, A. (2007) In situ structure and function of a marine nitrifying biofilm under fluctuating operating conditions. Manuscript in prep..

Foesel, B. U., Rezakhani, N., Schwermer, C. U., Drake, H.L., Horn, M. A., and Schramm, A. (2007) Diversity of nitrate-reducing and denitrifying bacteria in a marine aquaculture biofilter. Manuscript in prep..

Foesel, B. U., Schramm, A. and Drake, H. L. (2007) *Rhodobacter aggregans* sp. nov., *Rhodobacter maritimus* sp. nov. and *Rhodobacter denitrificans* sp. nov., three novel *Rhodobacter* species from a marine aquaculture. Manuscript in prep..

Schwermer, C. U., Foesel, B. U., Lavik, G., van Rijn, J., de Beer, D., Minz, D., Cytryn, E., Kuypers, M., Schramm, A., and Gieseke, A. (2007) Impact of sulfide on nitrate conversion in eutrophic nitrate-rich marine sludge. Manuscript in prep..

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass 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 22.08.2007
