



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

DIVERSITÄT UND VERTEILUNG VON SULFATREDUZIERENDEN PROKARYOTEN IN MARINEN SEDIMENTEN

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Ivan Barisic
Matrikel-Nummer:	0005756
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Molekulare Biologie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Michael Wagner

Wien, am

3. Juli 2008

"Wenigstens scheine ich in irgendeiner kleinen Sache weiser als dieser, dass ich, was ich nicht weiß, auch nicht zu wissen meine."

Sokrates (469-399 v. Chr.)

„Wenn Du ein Schiff bauen willst, dann trommle nicht deine Männer zusammen, um Holz zu beschaffen und um die Arbeit zu verteilen, sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem weiten endlosen Meer.“

Antoine de Saint-Exupery (1900-1944)

A	EINLEITUNG	1
A.1	VORWORT.....	1
A.2	DER SCHWEFELKREISLAUF.....	3
A.3	DIE DISSIMILATORISCHE SULFATREDUKTION	4
A.4	DIE SULFATREDUZIERENDEN PROKARYOTEN	5
A.5	HABITATE SULFATREDUZIERENDER PROKARYOTEN.....	7
A.6	ENZYME ALS PHYLOGENETISCHE MARKER.....	8
A.7	DIE DISSIMILATORISCHE (BI)SULFITREDUKTASE.....	9
A.8	ZIELE DIESER ARBEIT	11
B	MATERIAL UND METHODEN.....	12
B.1	ALLGEMEINE MATERIALIEN UND TECHNIKEN	12
B.1.1	<i>Öffentlich zugängliche Software</i>	12
B.1.2	<i>Technische Geräte</i>	13
B.1.3	<i>DNS-Aufreinigungs- und Klonierungskits</i>	14
B.1.4	<i>Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen</i>	14
B.2	PROBENNAHME.....	20
B.3	DNS ISOLIERUNG AUS SEDIMENT	20
B.4	QUALITATIVE UNTERSUCHUNG VON DNS MITTELS AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	22
B.5	POLYMERASE KETTENREAKTION:.....	23
B.5.1	<i>Amplifikation von 16S rRNS-Genen</i>	23
B.5.2	<i>Amplifikation von dsrAB-Genen</i>	25
B.5.3	<i>Amplifikation von DNS-Fragmenten mit M13-Primern</i>	25
B.5.4	<i>Entwurf von Primern</i>	26
B.6	DNS-MIKROARRAY	27
B.6.1	<i>SRP-PhyloChip Herstellung</i>	27
B.6.2	<i>Aufreinigung von PCR Produkten mit dem QIAquick PCR Purification Kit</i>	28
B.6.3	<i>Fluoreszenzmarkierung der DNS</i>	28
B.6.4	<i>SRP-PhyloChip Hybridisierung</i>	30
B.6.5	<i>Analyse mit dem Mikroarray SRP-PhyloChip</i>	30
B.7	ERSTELLUNG EINER DSRAB-GENBANK	31
B.7.1	<i>Gelaufreinigung der PCR-Produkte</i>	32
B.7.2	<i>Klonierung von Gen-Amplifikaten</i>	32
B.7.3	<i>Anzucht rekombinanter E. coli-Stämme und Stammhaltung</i>	37
B.7.4	<i>Plasmid Isolierung</i>	38
B.8	ANALYSE DER SEQUENZDATEN	39
B.8.1	<i>Sequenzierung von DNS-Molekülen</i>	39
B.8.2	<i>Schnellanalyse der Sequenzen</i>	40
B.8.3	<i>Vergleichende Sequenzanalyse mit dem ARB Software-Paket</i>	40
B.8.4	<i>Alignment der Proteinsequenzen mittels ARB</i>	41
B.8.5	<i>Erstellung phylogenetischer Bäume mittels ARB</i>	41
B.9	STATISTISCHE METHODEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER DSRAB-GENBANK	44
B.9.1	<i>Gruppierung der DsrAB-Sequenzen</i>	44
B.9.2	<i>Coverage Berechnung</i>	44
B.9.3	<i>Rarefaction-Methode</i>	45
B.9.4	<i>Chao1 Estimator</i>	46
B.9.5	<i>Parsimony-Test</i>	46

B.10	REAL-TIME-PCR.....	47
B.10.1	<i>Gradienten-PCR</i>	48
B.10.2	<i>Bestimmung der idealen Primerkonzentrationen für die PCR</i>	49
B.10.3	<i>Erstellung von quantitativen DNS-Standards für die Real-Time-PCR</i>	50
B.10.4	<i>Durchführung der Real-Time-PCR</i>	51
B.10.5	<i>Schmelzkurvenanalyse</i>	53
B.11	QUANTIFIZIERUNG DER NUKLEINSÄUREN AUS DER DNS EXTRAKTION MIT PICOGREEN®	54
C	ERGEBNISSE	55
C.1	MIKROARRAY ANALYSE VON STATION J.....	55
C.2	ANALYSE DER DSRAB-GENBANK VON STATION J.....	56
C.2.1	<i>Phylogenetische Analyse</i>	57
C.2.2	<i>Statistische Analyse</i>	59
C.2.3	<i>Coverage Bestimmung</i>	59
C.2.4	<i>Rarefaction-Analyse und Chao1 Estimator</i>	60
C.3	ANALYSE VON UNTERSCHIEDLICHEN DSRAB-GENBANKEN VON MARINEN SEDIMENTEN.....	61
C.3.1	<i>Vergleich von unterschiedlichen dsrAB-Genbanken mit TreeClimber</i>	65
C.4	QUANTIFIZIERUNGEN IN STATION J	67
D	DISKUSSION	71
D.1	DIVERSITÄT DER SRP IN SVALBARD STATION J SEDIMENT	71
D.1.1	<i>Betrachtung der einzelnen OTUs der dsrAB-Genbank von Station J</i>	72
D.1.2	<i>Analyse mit dem SRP-PhyloChip</i>	76
D.1.3	<i>Quantifizierung von OTU 12 im marinen Sediment</i>	78
D.2	ANALYSE DER DSRAB-GENBANKEN VON MARINEN SEDIMENTEN.....	81
D.2.1	<i>Betrachtung der ausschließlich aus marinen Sedimenten isolierten OTUs</i>	81
D.2.2	<i>Analyse der marinen dsrAB-Genbanken mit Treeclimber</i>	86
E	ZUSAMMENFASSUNG.....	90
F	LITERATURVERZEICHNIS	91
G	ANHANG	102
G.1	ROHDATEN DER QUANTIFIZIERUNG VON OTU 12	102
H	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	111
I	DANKSAGUNG	114
J	CURRICULUM VITAE	115

A Einleitung

A.1 Vorwort

Im Jahre 1955 publizierte der Geochemiker Clair Cameron Patterson eine bahnbrechende Arbeit, in der er mithilfe von Bleiisotopen das Alter der Erde auf ca. 4,55 Milliarden Jahre schätzen konnte (Patterson 1955; Patterson 1956). Bis heute hat dieser Wert Bestand, da auch aktuelle Studien das Alter der Erde auf ca. 4,55 Milliarden Jahre schätzen (McCulloch 1996).

Die extremen Bedingungen in der damaligen Atmosphäre mit hohen Temperaturen, starkem UV-Licht und elektrischen Entladungen setzten chemische Reaktionen auf der Erde in Gang, welche den Ozean mit organischen Molekülen wie Aminosäuren, Zuckern, Fettsäuren, Purinen und Pyrimidinen, also den „Bausteinen des Lebens“, anreicherten (Miller 1998).

Bezüglich der Frage, wie sich die ersten Lebewesen auf der Erde ernährt haben, gibt es zwei gegensätzliche Meinungen. Die Einen vertreten die Ansicht, dass das ursprüngliche Leben auf der Erde autotroph war. Bei ihren Überlegungen nimmt das Element Schwefel eine zentrale Rolle im Metabolismus der von ihnen hypothetisierten Mikroben ein (Wächterhäuser 1998). Das andere Lager glaubt, dass sich die ersten Organismen auf der Erde heterotroph ernährt haben sollen. Sie sehen ihre Theorie durch *in silico* Experimente der Bedingungen, wie sie auf der jungen Erde vorherrschten, bestätigt. In den Reaktionsgemischen ihrer Experimente können Zucker, Aminosäuren, Oligopeptide, Nukleinsäuren und andere organische Verbindungen abiotisch synthetisiert werden (Duve 1998).

Im Moment ist nicht absehbar, welche dieser zwei Gruppen Recht behalten wird, da die Informationen darüber, wie die Bedingungen auf der Erde vor ca. vier Milliarden Jahren waren, sehr ungenau sind. Erst vor kurzem wurde veröffentlicht, dass es viel früher als ursprünglich angenommen auf der Erde kühl gewesen sein muss, da die in diesen Studien gewonnenen Daten Ozeane von flüssigem Wasser suggerieren (Wilde et al. 2001; Valley et al. 2006). Trotzdem ist noch eine Vielzahl an Daten notwendig, um sich ein genaues Bild von der jungen Erde machen zu können und um abzuschätzen, mit welchen Bedingungen das erste Leben auf der Erde konfrontiert wurde.

Unabhängig von der Frage, wie das erste Leben beschaffen war, wird auch untersucht, wann es entstanden sein soll. Bestimmungen von Kohlenstoffisotopen in Gesteinen haben ergeben, dass es seit mindestens 3,7 Milliarden Jahren biologische Kohlenstofffixierung gibt (Rosing 1999). Messungen von Schwefelisotopen in Gipskristallen haben ergeben, dass biologische Schwefeldisproportionierung bereits vor 3,47 Milliarden Jahren stattgefunden hat (Philippot et al. 2007). Die Suche nach früheren Hinweisen auf mögliches Leben gestaltet sich schwierig, da kaum Gesteine vorhanden sind, die älter als vier Milliarden Jahre sind. Die Antwort auf die Frage, wann denn das Leben auf der Erde „angefangen“ habe, soll aber nicht allein unsere Neugier befriedigen, sondern uns eine Hilfe bei gegenwärtigen Fragestellungen sein. Für das tiefere Verständnis der Evolution ist es wichtig, über zeitliche Daten zu verfügen, damit wir einen Einblick in die Dynamik der Evolution erlangen können.

Die Dynamik, der die Evolution unterliegt, kann an der Gruppe der sulfatreduzierenden Prokaryoten (SRP) sehr gut untersucht werden, da biologische Umwandlungen von Schwefel bereits vor 3,47 Milliarden Jahren stattgefunden haben und damit die ältesten, bekannten Hinweise für einen mikrobiellen Metabolismus darstellen. Da SRP sowohl im Reich der *Archaea* als auch im Reich der *Bacteria* vertreten sind, könnte ein gemeinsamer Vorfahre bereits zur Sulfatreduktion befähigt gewesen sein (Wagner et al. 1998). Weiters sind die SRP innerhalb der bakteriellen und archaeellen Domänen des Lebens weit verbreitet, mit Vertretern in vielen Phyla. Diese hohe Biodiversität ist nicht nur das Resultat des zeitlichen Einflusses, sondern auch von den vielen Umweltveränderungen, die in den letzten 3,5 Milliarden stattgefunden haben und an die sich die SRP anpassen mussten (Berner 2004; Catling 2005). So gibt es psychrophile, mesophile, thermophile und hyperthermophile SRP. Sie sind unter anderem für bis zu 50% am Kohlenstoffumsatz in marinen Sedimenten verantwortlich (Jørgensen 1977; Jørgensen 1982), können in Symbiosen mit Eukaryoten leben (Dubilier et al. 2001; Blazejak et al. 2005) und sind auch in terrestrischen Böden in hoher Anzahl vorhanden (Stubner 2004). Aufgrund dieser Abundanz und Biodiversität sind die SRP ein geeignetes Studienobjekt, um globale Materialkreisläufe und evolutionäre Mechanismen zu erforschen.

A.2 Der Schwefelkreislauf

Unsere Umwelt setzt sich aus vielen, in ihren Eigenschaften unterschiedlichen Elementen zusammen. Die Biomasse besteht zum größten Teil aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor und Schwefel. Dadurch haben biologische Systeme einen großen Einfluss auf die Materialflüsse dieser Elemente auf der Erde.

Der Masseanteil von Schwefel in Erdkruste, Ozeanen und Atmosphäre beträgt 0,05%, der von Kohlenstoff 0,09%¹. Schwefel kann in neun verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen; z.B.: Sulfid (S^{II-}), Cystin (S^I), elementarer Schwefel (S^0), Thioschwefelige Säure (S^{I+}), Thioschwefelsäure (S^{II+}), Dithionige Säure (S^{III+}), Sulfit (S^{IV+}), Tetrathionat (S^{V+}) und Sulfat (S^{VI+}). Aus diesem Grund können Organismen Schwefel für eine Vielzahl von Reaktionen nützen (Abbildung A.1).

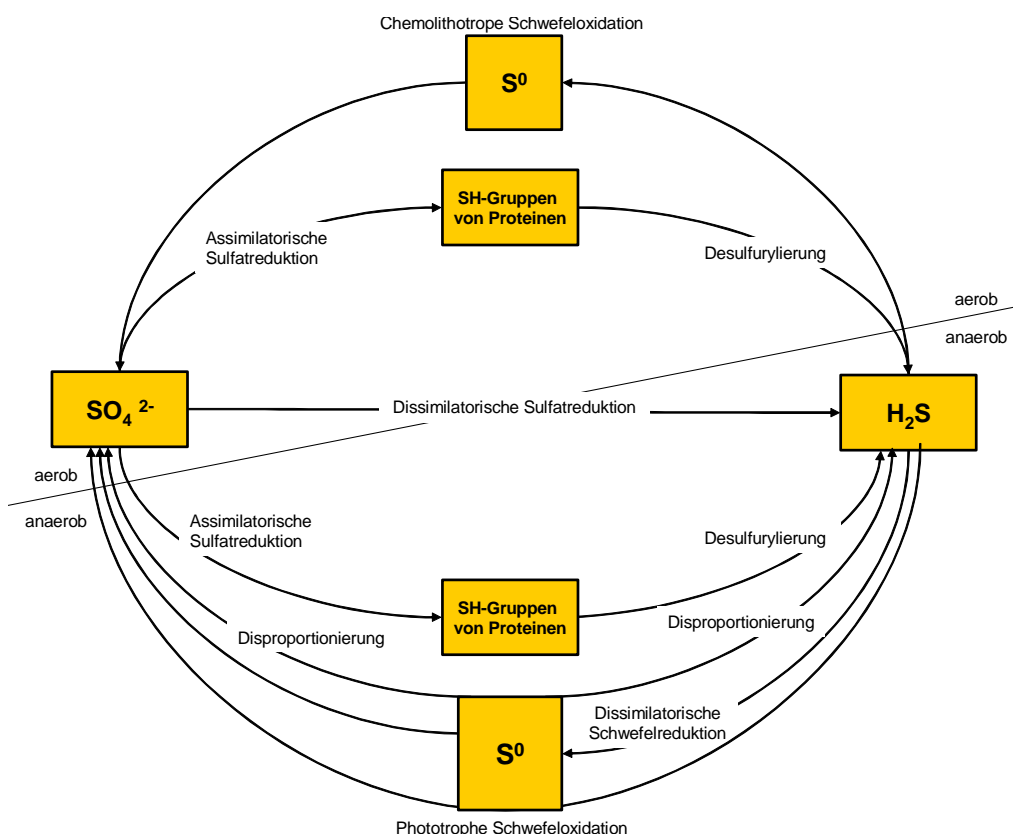


Abbildung A.1 Der biochemische Schwefelkreislauf (Madigan et al. 2000)

¹ <http://chemie.fb2.fh-frankfurt.de/ACH-Vorlesung/13Elemente.htm>

Pflanzen und Mikroorganismen können durch die assimilatorische Sulfatreduktion Schwefel in die Aminosäuren Methionin und Cystein integrieren. Der in den Aminosäuren gebundene Schwefel kann durch den Prozess der Desulfurylation in Mikroorganismen und Pilzen weiter zu Sulfid reduziert werden. Das Sulfid kann von Prokaryoten aerob oder anaerob über andere Schwefelverbindungen zu Sulfat oxidiert werden. Weiters gibt es Prokaryoten, die mit der dissimilatorischen Sulfatreduktion den Schwefelkreislauf wieder schließen. Manche Prokaryoten, wie zum Beispiel *Desulfocapsa sulfexigens*, sind in der Lage Schwefel, sowohl zu oxidieren als auch zu reduzieren (Frederiksen and Finster 2004). Bei der Disproportionierung wird unter anaeroben Bedingungen z.B. elementarer Schwefel in Sulfid und Sulfat umgewandelt (Fuseler and Cypionka 1995).

A.3 Die dissimilatorische Sulfatreduktion

Das Schwefelatom und die vier Sauerstoffatome sind im Sulfation über vier $p\pi-d\pi$ -Bindungen verbunden. Alle Bindungslängen betragen 149 pm. Durch diese Bindungen erhält das Sulfatmolekül eine tetraedrische Form. Das Ion ist zweifach negativ geladen. Da es sich um delokalisierte Ladung handelt, ist die Ladung zu gleichen Teilen auf alle vier Sauerstoffatome verteilt. Das Sulfation ist kaum reaktiv und muss daher zunächst für die biologische Reduktion unter Energieverbrauch aktiviert werden. Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) reagiert mit Sulfat unter der Bildung von Pyrophosphat zu Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS).

Das Enzym APS-Reduktase katalysiert den Schritt, bei dem APS zu Sulfit reduziert wird. Dabei werden zwei Elektronen auf das Schwefelatom übertragen; die Oxidationszahl des Schwefels reduziert sich auf +IV und Adenosin-5'-Monophosphat wird frei (AMP). Anschließend werden von der dissimilatorischen (Bi)Sulfitreduktase (DSR) sechs Elektronen auf das Schwefelatom im Sulfit übertragen, wodurch Sulfid entsteht.

Diese Elektronenübertragung ist an die Elektronentransportkette einer Membran gekoppelt, was zur Ausbildung eines Protonengradienten führt. Der entstandene Protonengradient wird für die Synthese von ATP mittels ATPasen genutzt (Madigan et

al. 2000). Die Elektronendonoren für diese Reaktion sind unter anderen Wasserstoff, Karbonsäuren, aromatische und andere organische Verbindungen (Widdel and Pfennig 1981; Widdel 1992; Madigan et al. 2000). Somit sind SRP durch Oxidation von organischen Molekülen an anaeroben Abbauprozessen im Kohlenstoffkreislauf beteiligt.

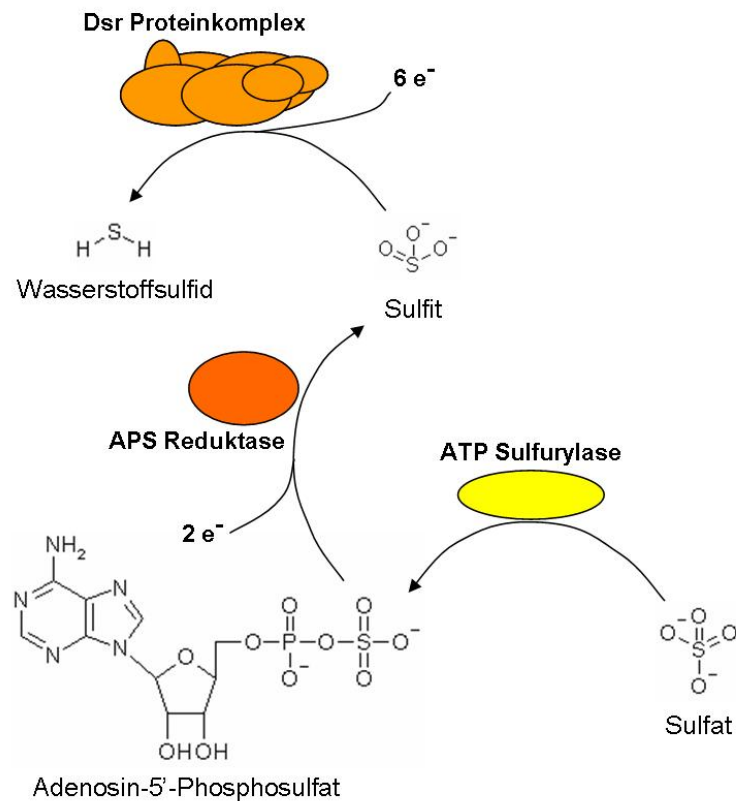


Abbildung A.2 Die dissimilatorische Reduktion von Sulfat zu Sulfid. Die ATP-Sulfurylase katalysiert die Bindung des Sulfat-Anions an eine Phosphatgruppe des ATP, wodurch Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) gebildet wird. Dieses wird durch die APS-Reduktase in Sulfid umgewandelt.

A.4 Die sulfatreduzierenden Prokaryoten

Die SRP sind eine phylogenetisch heterogene Gruppe von *Bacteria* und *Archaea*, die die Sulfatreduktion zur Energiegewinnung nutzen. Innerhalb der vier bakteriellen Phyla *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* und der zwei archaealen Phyla *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota* wurden Organismen beschrieben, die Sulfat reduzieren können.

A Einleitung

Die meisten sulfatreduzierenden Bakterien, die kultiviert werden konnten, sind mesophile Vertreter der *Deltaproteobacteria*. Die Gattungen *Desulfotomaculum* und *Desulfosporosinus* werden dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet (Stackebrandt et al. 1997; Hattori et al. 2000). Sie sind gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, leben in mesophilen und thermophilen Habitaten und können Sporen ausbilden. Die meisten kultivierten SRP, die eine thermophile Lebensweise zeigen, lassen sich den bakteriellen Phyla *Thermodesulfobacteria* und *Nitrospira* (Gattung *Thermodesulfobivrio*) und den archaealen Phyla *Crenarchaeota* (Gattung *Caldivirga*) und *Euryarchaeota* (Gattung *Archaeoglobus*) zuordnen (Stetter et al. 1987; Burggraf et al. 1990; Huber et al. 1997; Itoh et al. 1999).

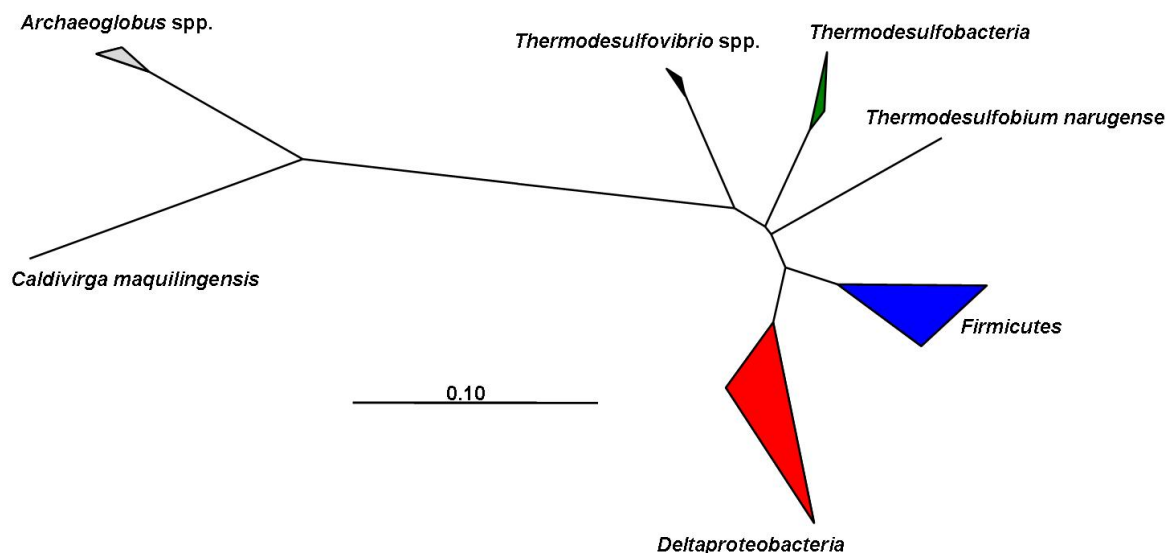


Abbildung A.3 16S-rRNA Neighbor-Joining Baum der kultivierten SRP. Der Längenbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

2003 wurde ein SRP, *Thermodesulfobium narugense*, beschrieben, der keinem bis dahin bekannten Phylum zugeordnet werden konnte (Mori et al. 2003). Der am nächsten verwandte Vertreter auf 16S rRNA-Ebene war ein unkultivierter Organismus aus der provisorischen Abstammungslinie „OP9“ (Hugenholtz et al. 1998).

A.5 Habitate sulfatreduzierender Prokaryoten

SRP sind ubiquitär verbreitet, halten sich aber vornehmlich in anoxischen Habitaten bzw. Habitaten mit niedriger Sauerstoffkonzentration auf. Es wurden Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* in oxischen Habitaten gefunden, die den Sauerstoff im Periplasma unter Bildung von ATP reduzieren (Cypionka 2000). Der Prozess scheint aber nur der „Entgiftung“ von Sauerstoff zu dienen und kann nicht zum Wachstum genutzt werden. Es sind innerhalb der Gilde der SRP noch andere Mechanismen entstanden, um mit Sauerstoffstress umzugehen. So können manche in anoxische Zonen migrieren (Krekeler et al. 1998), Zellaggregate bilden (Eschemann et al. 1999) oder sporulieren.

Es konnten SRP aus Habitaten isoliert werden, deren Temperaturen zwischen minus zwei Grad Celsius bis 100°C liegen. Viele in Kultur gehaltene sulfatreduzierende Stämme wachsen optimal bei einem neutralen pH (Widdel 1988). Obwohl saure pH-Werte zu einer Inhibierung des Wachstums führen können, wurde in Sedimentproben eines Vulkansees mit pH 2,6 Sulfatreduktion nachgewiesen (Koschorreck et al. 2003).

Marine Sedimente sind die von SRP am meisten dominierten Habitate. Aufgrund der hohen Sulfatkonzentration (28 mM) in Meerwasser und den anoxischen Bedingungen sind Meeresböden der ideale Lebensraum für SRP. In Süßwassersedimenten spielen bei der Kohlenstoffmineralisierung SRP eine eher untergeordnete Rolle, da dort die Sulfatkonzentrationen nur zwischen zehn μM und 200 μM liegen (Sass et al. 1997). Sie lassen sich auch im Grundwasser und Kläranlagen nachweisen (Manz et al. 1998; Schramm et al. 1999; Lehman et al. 2001). Weiters können SRP in Därmen von Eukaryoten, in Symbiose mit marinen Oligochaeten (Dubilier et al. 2001) und Polychaeten (Cottrell and Cary 1999), in Erdölreservoirs (Magot et al. 1992) und cyanobakteriellen Matten (Habicht and Canfield 1997; Teske et al. 1998; Nakagawa et al. 2002) leben.

Eine wichtige Bedeutung haben sie auch in terrestrischen Ökosystemen, die häufig überschwemmt werden. An Mooren und Reisfeldern wurden bereits einige Studien über die Diversität und Verbreitung von SRP durchgeführt (Wind and Conrad 1995; Alewell and Giesemann 1996; Ouattara et al. 1999; Wind et al. 1999; Stubner and Meuser 2000; Alewell and Novak 2001; Scheid and Stubner 2001; Loy et al. 2004).

Für biotechnologische Anwendung sind die SRP ebenfalls interessant geworden, da sie Xenobiotika (Krumholz et al. 1999; Sung et al. 2003) und Erdöl-Derivate (Hansen 1994; Phelps et al. 1998; Kniemeyer et al. 2003), die als ökologisch problematisch anzusehen sind, abbauen können. Weiters sind einige in der Lage Metalle zu methylieren bzw. demethylieren und können so Entgiftungsreaktionen durchführen (Muller et al. 1999).

A.6 Enzyme als phylogenetische Marker

Die mikrobielle Diversität ist viel größer als ursprünglich angenommen. Mit kultivierungsunabhängigen Methoden zur Analyse von Lebensgemeinschaften wurde geschätzt, dass bisher weniger als ein Prozent der bakteriellen Arten kultiviert und beschrieben werden konnten (Amann et al. 1995; Hugenholtz et al. 1998). Das 16S-rRNS Gen, das für Ribonukleinsäuren der kleinen Untereinheit des Ribosoms kodiert, ist wichtiger Bestandteil dieser kultivierungsunabhängigen Methoden. Die Sequenzanalysen der 16S-RNS Gene haben uns ein tieferes Verständnis über die mikrobielle Biodiversität gegeben. Im rRNS-Molekül gibt es Sequenzabschnitte mit unterschiedlichem Konservierungsgrad. So ist es möglich Oligonukleotidsonden unterschiedlich breiter Spezifität zu entwerfen, die an Zielorganismen binden können. Die Primer können zum Beispiel für die Erstellung einer 16S-rRNS-Genbank mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) genutzt werden. Dabei wird Umwelt-DNS isoliert, 16S-rRNS-Gene in einer PCR amplifiziert und durch Klonieren in *E.Coli* werden die PCR-Produkte wieder vereinzelt. Nun ist es möglich einzelne rRNS-Gene zu sequenzieren und mit dem Computer vergleichende Sequenzanalysen durchzuführen. Diese Daten werden für die Identifizierung und phylogenetische Einordnung von Prokaryoten in Umweltproben verwendet. Außer für die Erstellung von 16S-rRNS-Genbanken kann das transkribierte 16S-rRNS-Gen noch für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendet werden. Dabei können fixierte Prokaryoten mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsäuresonden direkt in der Probe visualisiert werden (DeLong et al. 1989; Amann et al. 1990; Wagner et al. 2003).

Ein Nachteil reiner 16S-rRNS-Analysen ist, dass sie keine direkte Auskunft über die Physiologie der untersuchten Mikroorganismen geben können, da es sich bei 16S-rRNS nur um ein Element des Proteinsyntheseapparates handelt. Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass es unterschiedliche bakterielle Arten gibt, die nicht durch deren 16S-rRNS-Sequenzen unterschieden werden können (Fukushima et al. 2002). Aus diesem Grund werden Enzyme, die in funktionellen Gilden wichtige Schritte in der Energiegewinnung katalysieren, als funktionelle Markergene hergenommen. Wichtige Merkmale, die ein funktionelles Markergen aufweisen muss, sind funktionelle Konstanz, ein hoher Konservierungsgrad, selten beobachteter lateraler Gentransfer und höhere Varianz mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad (Ludwig et al. 1998). Damit ist nicht nur eine physiologische sondern auch eine phylogenetische Einordnung von neuen Sequenzen möglich. In der Gilde der SRP wurden bereits Studien an der α - und β -Untereinheit der dissimilatorischen (Bi)Sulfitreduktase (Wagner et al. 1998; Klein et al. 2001; Nakagawa et al. 2004) und an der größeren Untereinheit der Adenosin-5'-Phosphosulfat-Reduktase durchgeführt (Friedrich 2002). Bis jetzt sind diese zwei Enzyme in allen bislang untersuchten SRP vorhanden.

A.7 Die dissimilatorische (Bi)Sulfitreduktase

Die dissimilatorische (Bi)Sulfitreduktase (Dsr) katalysiert die Reduktion von Sulfit in SRP. Sulfat dient in dieser Reaktion als terminaler Elektronenakzeptor (LeGall 1988; Dahl et al. 1993; Odom 1993). Das Enzym ist auch in einigen *Bacteria* und *Archaea* vorhanden, die zwar nicht Sulfat dafür aber Sulfit, Thiosulfat oder Trithionat reduzierenden können (Molitor et al. 1998). Weiters konnte es auch in schwefeloxidierenden Bakterien (SOB) identifiziert werden, wo es die reverse Reaktion katalysiert (Schedel 1979; Widdel 1992; Pott and Dahl 1998). Das Enzym ist ein Tetramer, das sich aus zwei α und zwei β Untereinheiten von ca. 40 bis 50 kDa zusammensetzt und wurde aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften in vier Gruppen eingeteilt (Widdel 1992a). Die zwei Untereinheiten sind vermutlich durch Genduplikation entstanden (Wagner et al. 1998). Die meisten Dsr haben zwei Sirohäm-[4Fe-4S]-Kofaktoren, die am Schwefelmolekül von Cysteinen gebunden sind (Wolfe et al. 1994; Crane and Getzoff 1996). Die Sirohäm-[4Fe-4S]-Bindungsstellen der Dsr

A Einleitung

haben große Ähnlichkeit mit denen der assimilatorischen Sulfid-Reduktasen (Asr) von Bakterien, Pilzen und Pflanzen, die die Asr brauchen, um Schwefel für ihren Metabolismus verfügbar zu machen (Crane and Getzoff 1996). Dahl et al. haben ein hochkonserviertes cysteinhaltiges Motif (C-X₅-C)-X_n-(C-X₃-C) gefunden, der vermutlich für die Sirohäm-[4Fe-4S]-Bindung verantwortlich ist (Dahl et al. 1993).

An das Tetramer können noch andere Untereinheiten der Dsr binden. Einige *Desulfovibrio* Spezies und *Pyrobaculum aerophilum* enthalten eine ca. zwölf kDa große γ Untereinheit, die zweifach an das Tetramer bindet und so ein Hexamer ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) bildet (Pierik et al. 1992; Arendsen et al. 1993; Wolfe et al. 1994). Anderen *Bacteria* und *Archaea*, die zwar das *dsrC*-Gen haben, fehlt die γ Untereinheit (Dahl et al. 1993; Molitor et al. 1998; Dahl et al. 2001).

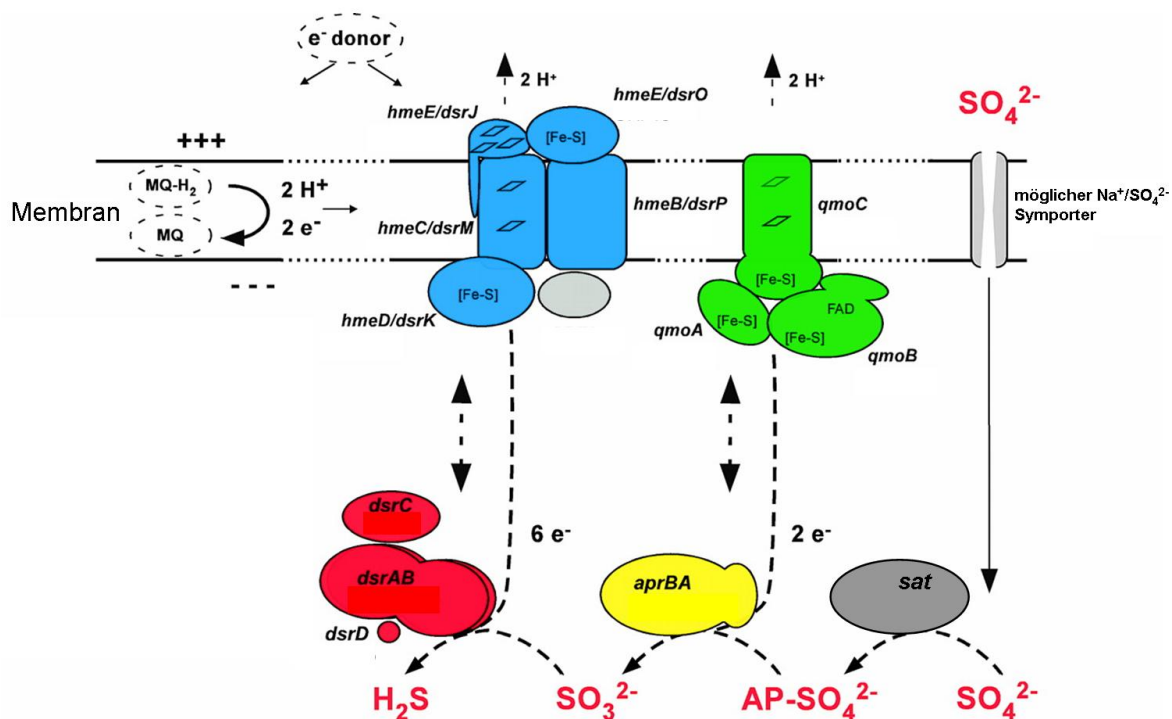


Abbildung A.4 Schematisches Modell der dissimilatorischen Sulfatreduktion. In der Grafik sind statt den Proteinennamen die Bezeichnungen der Gene angeführt von denen angenommen wird, dass sie für die abgebildeten Proteine kodieren. (Grafik übernommen und modifiziert von Musmann et al., 2005)

Es konnte auch gezeigt werden, dass noch ein viertes Protein am Proteinkomplex der Dsr aller bis jetzt untersuchten SRP assoziiert ist. Die ca. neun kDa große δ Untereinheit wird vom *dsrD*-Gen kodiert und enthält ein B- und Z-DNS-Bindemotiv

(Mizuno et al. 2003). Die Bindung der DsrD an das Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) der Dsr ist vermutlich nur schwach ausgeprägt (Hittel and Voordouw 2000).

A.8 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Diversität und Verteilung von SRP in einem marinen Sediment an der Küste von Spitzbergen zu untersuchen. Dieses arktische Habitat war bereits Gegenstand von einigen mikrobiologischen Untersuchungen, die sich mit der Aktivität, Diversität, Abundanz und Physiologie von SRP beschäftigt haben (Knoblauch and Jørgensen 1999; Knoblauch et al. 1999; Knoblauch et al. 1999; Ravenschlag et al. 1999; Sahm et al. 1999; Ravenschlag et al. 2000; Ravenschlag et al. 2001; Finke et al. 2006; Vandieken et al. 2006; Vandieken et al. 2006; Vandieken et al. 2006) und eignet sich deshalb hervorragend um ergänzende Informationen zu sammeln.

Eine *dsrAB*-Genbank sollte aus den obersten 15 Zentimeter des marinen Sediments erstellt werden und Auskunft über die Diversität der SRP geben. Das Sediment stammte aus einer Tiefe von 214 Metern aus dem Smeerenburgfjord Spitzbergens und hatte eine Temperatur von 0,4°C. Im Vergleich zu Habitaten mit Temperaturen über 15°C ist das Wissen über SRP in Habitaten mit Temperaturen unter 15°C gering, obwohl die Bedeutung dieser Habitate sehr hoch ist. Ein Großteil des Meeresbodens weist Temperaturen unter vier Grad Celsius auf.

Weiters wurden Proben von jedem Zentimeter der ersten zehn Zentimeter des Sediments genommen, um die vertikale Verbreitung der SRP zu untersuchen. Hierfür sollten Primer entworfen werden die ausgewählte Sequenzen erfassen und mittels einer Real-Time-PCR die Anzahl bestimmter SRP in den Sedimentschichten bestimmt werden. Eine Analyse des Sediments mit einem Mikroarray sollte die gewonnenen Daten vervollständigen.

Ein großes Interesse bestand noch darin alle bis jetzt vorhandenen *dsrAB*-Genbanknen, die aus marinen Sedimenten erstellt wurden, mit statistischen Werkzeugen zu vergleichen, um Hinweise über die globale Verbreitung der SRP zu gewinnen.

B Material und Methoden

B.1 Allgemeine Materialien und Techniken

Alle, im Rahmen dieser Arbeit, verwendeten Lösungen wurden mit über eine Reinstwasseranlage zweifach entsalztem und filtriertem Wasser (im folgenden ddH₂O) hergestellt. Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität bezogen und verwendet. NaOH- und HCl-Lösungen entsprechender Normalitäten dienten zur Einstellung des pH-Wertes. Alle Puffer und Lösungen wurden in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 Minuten bei 121°C und einer Atmosphäre (1,013 x 10⁵ Pa) Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen und Lösungen wie Antibiotika wurden sterilfiltriert (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, Qualilab®, Merk Labor und Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland) und gegebenenfalls nach dem Autoklavieren zugegeben. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur (RT).

B.1.1 Öffentlich zugängliche Software

Tabelle B.1: Verwendete öffentlich zugängliche Software

Name	Adresse	Anwendung	Referenz
BLAST (basic local alignment search tool)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Datensätze verschiedener Datenbanken werden nach ähnlichen Sequenzen durchsucht; Sortierung dieser entsprechend ihrer Relevanz	(Altschul et al. 1990)
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html	Alignment von zwei oder mehr Sequenzen Berechnung von Ähnlichkeiten und evolutionären Verwandtschaften	(Thompson et al. 1994; Schloss and Handelsman 2006)
DNA/RNA/Protein/Chemical Molecular Weight Calculator	http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html	berechnet die Molmasse für Nukleinsäuren (DNS oder RNS), Proteine/Peptide und Chemikalien	Chang Bioscience, Inc.
Treeclimber	http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/treeclimber.html	Programm zur Durchführung des P-Tests	(Schloss and Handelsman 2006)
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi	Primer-Design für Real-Time-PCR Applikationen	(Rozen and Skaletsky 2000)
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html	Untersucht mögliche Sekundärstrukturen von Primern	Premier Biosoft International
EstimateS	http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS	Berechnung von Biodiversitätsparametern	Colwell, 2005
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/	Sequenzdatenbank öffentlich verfügbaren DNS-Sequenzen	(Benson et al. 2002)

B.1.2 Technische Geräte

Tabelle B.2: Verwendete technische Geräte

Gerät	Hersteller
Beadbeater	BIO 101, Carlsbad, CA, USA
DNA Sequencer Licor Long Readir 4200	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Gelschlitten:	
Typ H3 (11 x 14cm)	Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray (15 x 15cm)	Biorad, München, Deutschland
VWR digital Heatblock	VWR international, West Chester, PA, USA
Magnetrührer:	
RCT basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Variomag® Maxi	Variomag®, Daytona Beach, FL, USA
Mikrowelle MD6460	Microstar
Transilluminator UST-30M-8E (312nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
pH-Meter, WTW inoLab Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem MediaSystem FlexiLine 4040	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
NanoDrop ND-3300 Fluorospektrometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
PCR-Thermocycler:	
iCycler iQ Real-Time PCR Detection System	Biorad, München, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rundschtüttler Innova 2300	New Brunswick Scientific Co., Inc., Madison NJ, USA
Reinstwasseranlage	Ultra Clear TM, Barsbüttel, Deutschland
Spektrfluorophotometer RF-1501	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Spektralphotometer SmartSpec™ 3000	Biorad, München, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbäder:	
DC10	Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland
GFL Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

B Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Wasserdampf-Hochdruckautoklaven:	
Varioclav 135S	H+P, München, Deutschland
Varioclav 25T	H+P, München, Deutschland
Zentrifugen:	
Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikroarray Spotter GMS 417 Arrayer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Mikroarray Scanner GenePix Personal 4100A	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Sterilbank Safe 2010 Modell 1.2	Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark

B.1.3 DNS-Aufreinigungs- und Klonierungskits

Tabelle B.3: Verwendete Kits für die DNS-Aufreinigung, -Klonierung und -Quantifizierung

Name des Kits	Hersteller
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO XL Cloning®	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
TOPO TA Cloning®	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
PowerSoil DNA Kit	MO Bio Labs, CA, USA
UltraClean DNA Kit	MO Bio Labs, CA, USA

B.1.4 Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen

B.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

B.1.4.1.1 TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

pH 8,0 mit HCl einstellen.

B.1.4.1.2 PBS

PBS-Stammlösung (Na_xPO_4)

NaH_2PO_4	200 mM	35,6 g/l
Na_2HPO_4	200 mM	27,6 g/l

den pH-Wert der NaH_2PO_4 -Lösung mit der Na_2HPO_4 -Lösung auf 7,2 - 7,4 einstellen.

1 x PBS

NaCl	130 mM	7,6 g/l
PBS-Stammlösung	10 mM	50 ml/l
ddH ₂ O		ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,4		

3 x PBS

NaCl	390 mM	22,8 g/l
PBS-Stammlösung	30 mM	150 ml/l
ddH ₂ O		ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,4		

B.1.4.2 Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese**B.1.4.2.1 TAE - Puffer***50 x TAE*

Tris	2 M
Natriumacetat	500 mM
EDTA	50 mM
pH 8,0 mit Eisessig einstellen	

1 x TAE

50 x TAE	20 ml/l
ddH ₂ O	ad 1000 ml

B.1.4.2.2 TAE-Puffer, modifiziert (Millipore)*50 x TAE, modifiziert*

Tris	2 M
EDTA	5 mM
pH 8,0 mit Eisessig einstellen	

1 x TAE, modifiziert

50 x TAE, modifiziert	20 ml/l
ddH ₂ O	ad 1000 ml

B.1.4.2.3 TBE – Puffer*10 x TBE*

Tris	890 mM	162,0 g/l
Borsäure	890 mM	27,5 g/l
EDTA	20 mM	9,3 g/l
ddH ₂ O		ad 1000 ml
pH 8,3 – 8,7 (45°C)		

1 x TBE

10 x TBE	100 ml/l
ddH ₂ O	ad 1000 ml

B Material und Methoden

B.1.4.2.4 Auftragspuffer

Ficoll	25% (w/v)
Bromphenolblau	0,5% (w/v)
Xylencyanol	0,5% (w/v)
EDTA	50 mM

B.1.4.2.5 Ethidiumbromid-Lösungen

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O

Ethidiumbromid-Färbelösung

EtBr-Stammlösung 1:10000 in ddH₂O verdünnen

B.1.4.2.6 SYBR[®] Green I-Lösungen

SYBR[®] Green I-Stammlösung

SYBR[®] Green I 10000 x Konzentrat in DMSO

SYBR[®] Green I-Färbelösung

SYBR[®] Green I-Stammlösung 1:10000 in ddH₂O verdünnen

B.1.4.2.7 DNS-Längenstandards (KbL)

75 bp – 12,2 kb DNS Leiter (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland)
50bp DNS Leiter (O'GeneRuler 50bp DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litauen)

B.1.4.3 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen

Für feste Nährmedien wurden den Lösungen 15 g/l Agar nach Einstellen des pH-Wertes und vor dem Autoklavieren zugegeben.

B.1.4.3.1 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
ddH ₂ O	ad 1000 ml
pH-Wert auf 7,0 - 7,5 einstellen	

B.1.4.3.2 SOC-Medium

Trypton	2 % w/v
Hefeextrakt	0,5 % w/v
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

B.1.4.4 Antibiotika-Lösungen

Stammlösungen verwendeter Antibiotika wurden wie im folgenden Abschnitt beschrieben hergestellt, sterilfiltriert (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, Merck) und bei -20°C gelagert. Zur Einstellung der angegebenen Antibiotika-Endkonzentration von Festmedien wurde die Stammlösung dem autoklavierten Medium bei einer Medientemperatur von ≤60°C zugegeben. Antibiotikahaltige Medien wurden bei vier Grad Celsius gelagert und bis zu drei Wochen nach der Medienbereitung verwendet. Flüssigmedien wurden unmittelbar vor Verwendung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

B.1.4.4.1 Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	100 mg/ml
in ddH ₂ O lösen	

mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugeben.

B.1.4.4.2 Chloramphenicol-Stammlösung

Chloramphenicol	170 mg/ml
in EtOH _{abs.} lösen	

mit einer Endkonzentration von 170 µg/ml dem Medium zugeben.

B.1.4.5 Lösungen für die Plasmid-Miniprep

B.1.4.5.1 Puffer P1

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

B.1.4.5.2 NaOH/SDS-Lösung

ddH ₂ O	8 ml
NaOH (2 N)	1 ml
10% SDS	1 ml

B.1.4.5.3 Kaliumacetat/Acetat-Lösung

Kaliumacetat (5 M)	6 ml
ddH ₂ O	2,85 ml
Eisessig	1,15 ml

B.1.4.6 Lösungen für die SRP-PhyloChip Herstellung

B.1.4.6.1 NaBH₄ Lösung (immer frisch zubereiten)

NaBH ₄	1 g
1 x PBS	300 ml
96 % EtOH	100 ml

B.1.4.6.2 0,2 % (w/v) SDS – Lösung

10% (w/v) SDS	20 ml
ddH ₂ O	980 ml

B.1.4.7 Lösungen für die DNS-Extraktion nach Griffith

B.1.4.7.1 CTAB (Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid) Extraktionspuffer:

10% (w/v) CTAB in 0.7 M NaCl	500 ml
240 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8.0	500 ml

B.1.4.7.2 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)

Phenol	50 ml
Chloroform	48 ml
Isoamylalkohol	2 ml

B.1.4.7.3 Chloroform/Isoamylalkohol (CHISAM)

Chloroform	96 ml
Isoamylalkohol	4 ml

B.1.4.7.4 96% Ethanol

B.1.4.7.5 70% (v/v) Ethanol

B.1.4.8 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

B.1.4.8.1 1 x TBE-Puffer

B.1.4.8.2 Auftragspuffer

B.1.4.8.3 DNS Längenstandard (KbL)

B.1.4.8.4 Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	1 mg
ddH ₂ O	1000 ml

B.1.4.8.5 1% (w/v) Agarosegel

Agarose	1,2 g
1 x TBE	120 ml

B.1.4.9 Lösungen für die SRP-PhyloChip Hybridisierungen

B.1.4.9.1 Hybridisierungspuffer

20 x SSC	500 µl
10% (w/v) N-Laurylsarkosin	20 µl
10% (w/v) SDS	4 µl
Formamid	100 µl
10% (w/v) Blockingreagenz- Stammlösung	200 µl
ddH ₂ O	1176 µl

B.1.4.9.2 Hybridisierungslösung

Gelabeltes PCR-Amplifikat	x µl
Hybridisierungspuffer	20 µl

B.1.4.9.3 TMAC – Waschlösung

1 M Tris/HCl	2,5 ml
500 mM EDTA	200 µl
10% (w/v) SDS	500 µl
5 M TMAC	30 ml
ddH ₂ O	ad 50 ml

B.2 Probennahme

Die Proben wurden während einer Spitzbergen Expedition, die zwischen dem 27. Juni und 7. Juli 2005 stattgefunden hat, vom Meeresboden in einem Fjord an der Nord-West Küste der Insel gesammelt. Der Ort von dem die Proben stammen, wurde Station J bezeichnet und lag an der Position 79° 42,815' N; 11° 5,189' E. Das untersuchte Sediment stammte aus einer Meerestiefe von ca. 214 m und wies eine Temperatur von 0,4°C auf. Es wurden drei Sedimentkerne (Durchmesser 36 Millimeter) aus Tiefen von 0-15 Zentimeter genommen. Die ersten zehn Zentimeter der Sedimentkerne wurden in Proben mit einer Dicke von einem Zentimeter unterteilt und in zwei-Milliliter-Röhrchen gegeben. Die Sedimente aus den Tiefen 10-15 Zentimeter wurden gemischt und in je ein zwei-Milliliter-Röhrchen gegeben. Weiters wurden zwei 50-Milliliter-Röhrchen mit durchmischem Sediment aufgefüllt. Die Proben wurden vor dem Transport eingefroren und auf Eis transportiert. Im Labor wurden sie bei -80°C gelagert.

B.3 DNS Isolierung aus Sediment

Die DNS-Konzentration der mit den unten beschriebenen Methoden erhaltenen DNS-Extrakte wurde mit dem Nanodrop-Spektrometer vermessen. Die Qualität der DNS-Extraktionen für „down stream“-Applikationen wurde mit einem einprozentigen Agarosegel (B.4) und einer 16S rRNS-Gen-PCR (B.5.1) untersucht.

B.3.1.1 DNS - Isolierung mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit

Der vorliegende Kit ist speziell für die DNS-Isolierung aus Böden und Sedimenten mit organischer Materie abgestimmt, da er Additiva enthält, die PCR-inhibierende Moleküle wie Huminsäuren entfernen können. Der Puffer, in dem sich auch die Perlen für den Zellaufschluss befinden, kann laut Hersteller Huminsäuren zersetzen. Der Zellaufschluss wird mit einem Vortexer und der Perlen-Matrix erreicht und erfolgt mechanisch.

Für die DNS-Isolation wurden 0,25 - 1 Gramm Sediment pro Röhrchen eingesetzt. Die DNS wurde nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die aufgereinigte DNS wurde in

zwei mal 25 Mikroliter ddH₂O aufgenommen und auf Aliquots von zehn Mikroliter bis 25 Mikroliter verteilt.

B.3.1.2 DNS - Isolierung mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit

Dieser DNS Isolationskit beruht auf mechanischer und chemischer Zellyse. Für den mechanischen Zellaufschluss wurde ein mit einer Perlen-Matrix, Aufschluss-Puffer und der Probe gefülltes Schraubgefäß auf einem Vortexer montiert. Die chemische Lyse wurde durch Zusätze im Aufschluss-Puffer bewirkt.

Um die DNS zu isolieren, wurde den Anleitungen des Herstellers Folge geleistet. Pro Extraktion wurden 0,25 g Sediment verwendet. Die aufgereinigte DNS wurde in zwei mal 30 Mikroliter ddH₂O aufgenommen und auf Aliquots von zehn bis 25 Mikroliter verteilt.

B.3.1.3 DNS - Isolierung modifiziert nach Griffiths

Das Protokoll nach Griffith basiert auf einem mechanischen Aufschlussverfahren und ermöglicht die schnelle Isolierung von genomischer DNS aus Umweltproben (Griffiths et al. 2000). Das in meiner Arbeit verwendete Protokoll wurde leicht modifiziert, da es nicht notwendig war DNS mit Salzen zu fällen, weil in marinen Proben ausreichend Salz vorhanden ist.

Es wurden 0,7 Gramm Sediment in Bio-101 Lysematrix A (Bio-101, Vista, CA, USA) Rörchen mit 500 Mikroliter CTAB-Extraktionspuffer gegeben und 30 Sekunden bei 5,5 m/s im Beadbeater geschüttelt. Das Ganze wurde eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues verschraubbares Gefäß transferiert. Der Überstand wurde mit einem Volumen PCI versetzt, in der Hand 30 Sekunden geschüttelt und zehn Minuten bei 6.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues verschraubbares Rörchen transferiert, mit einem Volumen CHISAM versetzt und vorsichtig mit der Hand geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von zehn Minuten bei 6.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Rörchen übergeführt, mit ein bis zwei Volumen 96%igem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C stehen gelassen, damit die Nukleinsäuren ausfallen konnten.

Am nächsten Tag wurde die Lösung 45 Minuten bei vier Grad Celsius und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand weggeschüttet und das Pellet vorsichtig mit 400 Mikroliter kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde die DNS acht Minuten bei vier Grad Celsius und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNS bei Raumtemperatur zehn Minuten lang getrocknet.

Die DNS wurde in 100 Mikroliter ddH₂O resuspendiert und auf Aliquots von zehn bis 25 Mikroliter verteilt.

B.4 Qualitative Untersuchung von DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die DNS wird mittels einer eindimensionalen Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bei dieser Technik wird ausgenutzt, dass Nukleinsäuren aufgrund ihrer durch das Phosphatrückgrad bedingten negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern. Diese Eigenschaft ermöglicht eine größenabhängige Auftrennung von DNS-Molekülen in einer Agarosematrix und erlaubt die Abschätzung von Menge, Reinheit und Fragmentierungsgrad der DNS.

Die gewünschte Menge Agarose wird eingewogen, mit 1 x TBE-Puffer gemischt und in einem Mikrowellenherd aufgelöst. Während die Agaroselösung etwas abkühlt, wird ein Gelschlitten mit eingesetztem Kamm vorbereitet, in den die Agaroselösung gegossen wird. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose, wird der Kamm entfernt und der Gelschlitten in die Gelelektrophorese-Apparatur mit 1 x TBE-Puffer eingelegt. Die zu analysierende DNS wird eins zu eins mit Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der DNS-Moleküle erfolgt je nach Größe des DNS-Fragments zwischen 30 und 90 Minuten bei ca. 120 Volt. Die Nukleinsäuren werden ca. 45 Minuten in einer abgedunkelten Färbewanne (ein Liter ddH₂O + 100 Mikroliter Ethidiumbromid-Stammlösung) gefärbt. Anschließend wird das Gel für bis zu 20 Minuten gewässert, um ungebundenes Ethidiumbromid aus dem Gel zu waschen. Die DNS im Gel wird mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Die Bandenmuster werden mit einem Gel-Dokumentationssystem erfasst und digitalisiert. Die Abschätzung der Konzentration von DNS-Lösungen sowie der Größe

von linearisierten DNS-Fragmenten erfolgt durch den Vergleich mit den Banden des mitgeführten Längenstandards.

B.5 Polymerase Kettenreaktion:

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der es innerhalb von kürzester Zeit möglich ist sehr viele Kopien von DNS-Fragmenten mit einer Länge von mehreren dutzenden bis tausenden Basenpaaren herzustellen. Kurze Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden DNS-Bereich auf beiden Seiten flankieren, binden an einsträngige Ziel-DNS. Die 3'-Enden der Primer werden von DNS-Polymerasen verlängert und lassen so eine komplementäre Kopie des DNS-Stranges entstehen. Um die Bindung der Primer (Annealing) zu ermöglichen, muss vorher durch Erhitzen auf über 90°C die doppelsträngige DNS denaturiert werden. Die Amplifikation der DNS wird mit Temperatur-Zeitzyklen gesteuert, da nach dem Annealing eine Elongationphase, in der die Primer durch die DNS-Polymerasen verlängert werden, erfolgt. Die Prozesse Denaturierung, Annealing und Elongation werden so oft wiederholt, bis die gewünschte Anzahl von DNS-Kopien vorhanden ist. Thermostabile DNS-Polymerasen ermöglichen es die DNS-Amplifizierung zu steuern und die Amplifikation bei einer höheren Temperatur laufen zu lassen.

B.5.1 Amplifikation von 16S rRNS-Genen

Standardansatz für die Durchführung der 16S rRNS-Gen-PCR

Das Reaktionsgemisch wird nach dem in Tabelle B.1 ersichtlichen Schema pipettiert. Die Primer, die für die 16S rRNS-Gen-PCR verwendet wurden sind in Tabelle B.2 abgebildet. Bei jeder PCR wurde als Positivkontrolle ein Plasmid mit dem 16S rRNS-Gen von *Desulfovibrio halophilus* amplifiziert. Weiters wurde immer eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der der PCR keine DNS-Matrize hinzugeführt wurde. Die Programmierung des PCR-Cyclers ist in Tabelle B.3 angeführt. Cl₂

B Material und Methoden

Tabelle B.1 Reaktionsmischung für einen 50 Mikroliter PCR-Ansatz:

Lösungen	Menge in μl	Hersteller
10 x MgCl_2 [25 mM]	4 μl	Fermentas Inc. (Hanover, MD, USA)
10 x Ex Taq Polymerase-Puffer	5 μl	Fermentas Inc. (Hanover, MD, USA)
Nucleotid-Mix [2 mM/dNTP]	5 μl	Fermentas Inc. (Hanover, MD, USA)
Vorwärtsprimer [50 pmol/ μl]	0,5 μl	Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland)
Rückwärtsprimer [50 pmol/ μl]	0,5 μl	Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland)
Bovine Serum Albumine (BSA) [20 mg/ml]	0,25 μl	New England BioLabs Inc. (Beverly, MA, USA)
Taq DNA-Polymerase [5 units/ μl]	0,25 μl	Fermentas Inc. (Hanover, MD, USA)
Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) [0,5 M]	2 μl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinhausen, Deutschland)
DNS-Matrize	1 μl	
ddH ₂ O	31,5 μl	

Tabelle B.2 Verwendete 16S rRNS-Gen-Primer

Primer ¹	Sequenz ^b	Spezifität	Ta ^c	Bindeposition ^d	Referenz
630R	5' CAK AAA GGA GGT GAT CC 3'	meisten Bakterien	52°C	1528-1542	(Juretschko et al. 1998)
616V	5' AGA GTT TGA TYM TGG CTC 3'	meisten Bakterien	52°C	8-27	(Juretschko et al. 1998)
1389Vs	5' TGT ACA CAC CGC CCG T 3'	meisten Bakterien und Archaea	52°C	1390-1406	Duller (nicht publiziert)
1492R	5' GGY TAC CTT ACG ACT T 3'	meisten Bakterien und Archaea	52°C	1492-1511	modifiziert aus (Kane et al. 1993)

¹ V: Vorwärtsprimer bindet an den zur 16S-rRNS komplementären Strang

R: Rückwärtsprimer bindet an mit der 16S-rRNS identischen Strang

^b Abkürzungen nach IUPAC-Nomenklatur

^c Verwendete Annealing-Temperatur des Primers

^d Entsprechende Position in der *E. coli* 16S-rRNS (Brosius et al. 1981)

Tabelle B.3 Programm für die Durchführung der 16S rRNS-Gen-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	40 sec	30 x
Annealing	52°C	40 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
finale Elongation	72°C	10 min	1

B.5.2 Amplifikation von *dsrAB*-Genen

Die Durchführung der *dsrAB*-PCR verlief analog zur 16S rRNS-Gen-PCR (B.5.1), mit dem Unterschied, dass die Annealingtemperatur 48°C betrug und die in Tabelle B.4 angeführten *dsrAB*-Primer verwendet wurden. Die Positivkontrolle wurde mit einem Plasmid, welches das *dsrAB*-Gen von *Desulfovibrio halophilus* enthielt, durchgeführt.

Tabelle B.4 Verwendete *dsrAB*-Primer

Primer	Sequenz ^b	Mol/Reaktion	Ta ^c	Referenz
DSR1F	5' ACS CAC TGG AAG CAC G 3'	10 pmol	48°C	(Wagner et al. 1998)
DSR1Fa	5' ACC CAY TGG AAA CAC G 3'	10 pmol	48°C	(Loy et al. 2004)
DSR1Fb	5' GGC CAC TGG AAG CAC G 3'	10 pmol	48°C	(Loy et al. 2004)
DSR1Fc	5' ACC CAT TGG AAA CAT G 3'	10 pmol	48°C	(Zverlov et al. 2005)
DSR1Fd	5' ACT CAC TGG AAG CAC G 3'	10 pmol	48°C	(Zverlov et al. 2005)
DSR1Fe	5' GTT CAC TGG AAA CAC G 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)
DSR1Ff	5' AGC CAC TGG AAA CAC G 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)
DSR1Fg	5' GGC CAC TGG AAA CAT G 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)
DSR1Fh	5' GGC TAT TGG AAG CAC G 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)
DSR4R	5' GTG TAG CAG TTA CCG CA 3'	10 pmol	48°C	(Wagner et al. 1998)
DSR4Ra	5' GTG TAA CAG TTT CCA CA 3'	10 pmol	48°C	(Loy et al. 2004)
DSR4Rb	5' GTG TAA CAG TTA CCG CA 3'	10 pmol	48°C	(Loy et al. 2004)
DSR4Rc	5' GTG TAG CAG TTT CCG CA 3'	10 pmol	48°C	(Loy et al. 2004)
DSR4Rd	5' GTG TAG CAG TTA CCA CA 3'	10 pmol	48°C	(Zverlov et al. 2005)
DSR4Re	5' GTG TAA CAG TTA CCA CA 3'	10 pmol	48°C	(Zverlov et al. 2005)
DSR4Rf	5' GTA TAG CAR TTG CCG CA 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)
DSR4Rg	5' GTG AAG CAG TTG CCG CA 3'	10 pmol	48°C	Loy (nicht publiziert)

^b Abkürzungen nach IUPAC-Nomenklatur

^c Verwendete Annealing-Temperatur des Primers

B.5.3 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit M13-Primern

Die Inserts der Plasmide pCR[®]2.1-TOPO und pCR[®]-XL-TOPO werden von Regionen flankiert, die mit M13-Primern (Tabelle B.5) amplifiziert werden können.

Tabelle B.5 M13-Primer

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur
M13-F	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'	60°C
M13-R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	60°C

Aufgrund der Notwendigkeit die Inserts für unterschiedliche Analysen zu amplifizieren, wird die M13-PCR häufig durchgeführt. So wurde zum Beispiel mit ihr getestet, ob die

Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation von *E. coli* funktioniert hat oder, ob DNS-Extrakte mit Plasmid-DNS kontaminiert waren. Weiters wurden DNS-Standards für die Real-Time-PCR mit der M13-PCR amplifiziert.

Der Reaktionsansatz wurde analog zu dem der 16S rRNS-Gen-PCR hergestellt. Die Programmierung des PCR-Cylers war ebenfalls fast identisch mit jener der 16S rRNS-Gen-PCR. Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet wurde.

B.5.4 Entwurf von Primern

Primer wurden mithilfe der Programmeinheiten „Probe design“ und „Probe match“, die in das Software Paket ARB (Ludwig et al. 2004) integriert sind, entworfen. Das „Probe Design“-Tool durchsucht eine Sequenzdatenbank auf einem Server nach spezifischen, kurzen Sequenzen, deren Eigenschaften vorher in einer Suchmaske festgelegt wurden. Anschließend werden die erhaltenen Sequenzen mit dem „Probe Match“-Tool evaluiert, indem das Tool die Sequenzdatenbank nach gleichen und ähnlichen Sequenzen durchsucht.

Beim Primerdesign sollte darauf geachtet werden, dass sich Basenfehlpaarungen zu Nicht-Zielorganismen am 3'-Ende des Primers befinden, da die DNS-Polymerase vom 3'-Ende weg die DNS synthetisiert und auftretende Basenfehlpaarungen am 3'-Ende das Anlagern der DNS-Polymerase an die DNS-Matrize erschweren.

Beim Design von Primern für die quantitative Real-Time-PCR wurde zudem darauf geachtet, dass die PCR-Produkte eine Länge von 200 bis 400 Basenpaaren aufweisen, damit eine effiziente Amplifizierung gewährleistet war. Die Primer wurden anschließend mit NetPrimer² auf Sekundärstrukturen und Dimerbildung untersucht. Um die Affinität der Primer auch zu anderen DNS-Sequenzen, die sich nicht in der ARB-Datenbank befinden, zu untersuchen, wurden die Oligonukleotidsequenzen mit dem Nukleotid-Datensatz des NCBI-Datensuchprogramm „BLAST“ (basic local alignment search tool)³ verglichen (Altschul et al. 1990; Madden et al. 1996; Ma et al. 2002).

Alle Primer, die in dieser Studie verwendet wurden, wurden bei Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bestellt.

² <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

B.6 DNS-Mikroarray

Die DNS-Mikroarray-Technologie stellt eine wichtige methodische Erweiterung in der Biotechnologie dar, da es mit dieser Methode möglich ist große Mengen an Genen gleichzeitig zu untersuchen. Mikroarray bzw. Microchip wird ein Objektträger (normalerweise aus Glas) genannt, der auf seiner Oberfläche bis zu mehrere tausend diagnostische Nukleinsäuren (Sonden) mit unterschiedlicher DNS-Sequenz gebunden hat. Die unterschiedlichen Nukleinsäuren sind in einem Raster aus mikroskopisch kleinen Punkten angeordnet. Bei den Sonden kann es sich um synthetisch hergestellte Oligonukleotide oder PCR-Amplifikate handeln.

Die Sonden auf dem Objektträger werden in einem Experiment mit fluoreszenzmarkierter DNS hybridisiert. Anschließend wird der Objektträger gewaschen und nur an die Sonden gebundene fluoreszenzmarkierte DNS bleibt auf dem Objektträger hybridisiert. Die an Sonden gebundene fluoreszenzmarkierte DNS wird mit einem Scanner visualisiert.

Das Sediment aus Spitzbergen (Station J) wurde mit einem SRP-PhyloChip untersucht, der die 16S rRNS-Gene einer Vielzahl von SRP erfasst (Loy et al. 2002).

Hierfür mussten zuerst die 16S rRNS-Gene aus der zu untersuchenden Umweltprobe in einer 16S rRNS-Gen-PCR mit den Primerpaaren 630R/616V und 1492R/616V amplifiziert werden (B.5.1). Die PCR-Amplifikate wurden anschließend mit dem PCR-Purification-Kit aufgereinigt (B.6.2) und fluoreszenzmarkiert. Die fluoreszenzmarkierte DNS wurde mit dem Nucleotide Removal Kit aufgereinigt und in der Speed Vac einrotiert (B.6.3). Es folgte das Resuspendieren der DNS in Hybridisierungspuffer und das Auftragen auf den SRP-PhyloChip. Nach der Hybridisierung wurde der SRP-PhyloChip stringent gewaschen und mit dem GenePix Personal 4100A Mikroarray Scanner gescannt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Microsoft Excel.

B.6.1 SRP-PhyloChip Herstellung

Auf mit Aldehydgruppen beschichteten Glasobjektträgern (CSS-Silylated Slides; TeleChem, Sunnyvale, USA) wurden die am 5'-Ende aminomodifizierten Oligonukleotidsonden mit dem MicroGrid GMS 417 Arrayer nach Anleitung des Herstellers aufgetragen. Jede Sonde wurde in Triplikaten auf den Objektträger

gespottet. Anschließend wurden die Slides für mindestens 24 Stunden in einer Box bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Slides wurden unter kräftigem Schütteln zweimal für zwei Minuten in 0,2%iger SDS-Lösung gewaschen und unter kräftigem Schütteln zweimal für zwei Minuten in ddH₂O gewaschen. Die Objektträger wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Es folgte die Reduktion der freien Aldehyde auf der Oberfläche der Objektträger durch fünfminütiges Tränken in eine Natrium-Borhydridlösung. Die Reduktion wurde durch kurzes Eintauchen der Slides in eiskaltes 100%iges Ethanol gestoppt und erneut unter kräftigem Schütteln zweimal für eine Minute in 0,2%iger SDS-Lösung und zweimal für eine Minute in ddH₂O gewaschen.

Mit einem Luftstrahl wurden die Objektträger getrocknet und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

B.6.2 Aufreinigung von PCR Produkten mit dem QIAquick PCR Purification Kit

Nach einer PCR sind im Reaktionsgemisch unter anderem noch dNTPs, Primer, Proteine, Salze und DNS enthalten. Für manche Anwendungen ist es notwendig, die DNS von den anderen Komponenten einer PCR zu trennen. Hierfür wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet.

Die PCR-Produkte wurden nach den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Anschließend wurde die DNS in zwei mal 30 Mikroliter ddH₂O aufgenommen. Die DNS-Konzentration wurde mit dem Nanodrop-Spektrometer vermessen.

B.6.3 Fluoreszenzmarkierung der DNS

Um die DNS zu markieren, wurde das DecLabel DNA Labelling Kit #K0622 (MBI Fermentas, Lithuania) verwendet.

Lösungen:

Klenow-Fragment [5 U/ μ l]

MixC: dGTP, dATP, dTTP zu je 0,33 mM

dNTP Mix [jedes Nukleotid liegt 0,25 M vor]

Dekanucleotid-Mix in fünffach Reaktionspuffer

Cy5-dCTP [1 mM]; (Amersham Pharmacia Biotech)

Die Qualität des PCR-Produktes wurde auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und im Eppendorf Concentrator 5301 auf ein Volumen von ca. 15-20 Mikroliter aufkonzentriert. Danach wurde DNS-Konzentration im Nanodrop-Spektrometer vermessen.

Pro Fluoreszenzmarkierungsreaktion wurden 300 Nanogramm PCR-Produkt verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 35 Mikroliter verdünnt. Dem PCR-Produkt wurden zehn Mikroliter Dekanukleotide, die in fünffachem Reaktionspuffer gelöst waren, hinzugegeben.

Das Gemisch wurde bei 95°C für zehn Minuten inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden pro Reaktion drei Mikroliter Mix C, 0,5 Mikroliter dCTPs [1 mM], 0,5 Mikroliter Cy5-dCTPs und ein Mikroliter Klenow-Fragment hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 37°C für 45 Minuten inkubiert, auf 95°C für zehn Minuten erhitzt und auf Eis gestellt.

Es wurde erneut ein Mikroliter Klenow-Fragment hinzupipettiert und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden vier Mikroliter dNTPs hinzugegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die fluoreszenzmarkierte DNS wurde mit dem QIAquick Nucelotide Removal Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in zweimal 30 Mikroliter ddH₂O eluiert. Der DNS-Lösung wurden fünf Mikroliter von der Cy3-markierten PolyA-Probe und zehn Mikroliter einer Cy5-markierten Kontrolloligonukleotidprobe [0,05 M] hinzugegeben, um sie letztlich im Eppendorf Concentrator 5301 einzutrocknen und bei -20°C im Dunklen zu lagern.

B.6.4 SRP-PhyloChip Hybridisierung

Bevor man mit der Hybridisierung begann, wurden die Deckgläschen 40 Minuten vorher in 96%igem Ethanol gewaschen.

Dann wurden 20 Mikroliter des Hybridisierungspuffers auf die eingetrocknete, fluoreszenzmarkierte DNS pipettiert, zehn Minuten bei 94°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Die Mikroarray-Slides wurden in Hybridisierungskammern gelegt, die getrockneten Deckgläschen über die gespotteten Sonden auf den Slides gelegt und 25 Mikroliter Hybridisierungspuffer in jede Ecke pipettiert.

20 Mikroliter der in Hybridisierungspuffer aufgenommenen DNS wurden zwischen Deckgläschen und Objektträger pipettiert. Anschließend wurden die Hybridisierungskammern verschlossen und 18 Stunden bei 42°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen vom Objektträger entfernt, und der Objektträger wurde fünf Minuten in 50 Milliliter einer 55°C warmen TMAC Waschlösung unter gelegentlichem Schütteln gewaschen. Das Slide wurde zweimal in 50 Milliliter eiskaltem ddH₂O gewaschen und mit einem Luftstrom getrocknet. Die Lagerung der Slides erfolgte im Dunklen bei Raumtemperatur.

B.6.5 Analyse mit dem Mikroarray SRP-PhyloChip

Die Evaluierung der Hybridisierung mit dem SRP Phylo-Chip erfolgte mit dem GenePix Personal 4100A Mikroarray Scanner. Die Fluoreszenzsignale wurden mit der Genepix Pro 5.1 Software quantifiziert. Dafür wurde ein Raster von Kreisen verwendet, das jeden gespotteten Punkt auf dem Objektträger einer Sonde zuordnete. Die Software berechnete unter anderem den Median der Signalintensitäten innerhalb und außerhalb der einzelnen Kreise und gab die berechneten Daten in Form von Tabellen aus, die in Microsoft Excel weiter bearbeitet werden konnten.

Von jeder auf dem SRP-PhyloChip vorhandenen Sonde wurde nach der unten stehenden Formel das „Signal zu Hintergrund“-Verhältnis (SNR) berechnet.

$$SNR = \frac{F_{Med} - \left(\frac{F_{Non1} + F_{Non2}}{2} - \frac{B_{Non1} + B_{Non2}}{2} \right)}{B_{Med}}$$

SNR	= „Signal zu Hintergrund“ – Verhältnis
F_{Med}	= Median aller Pixel innerhalb des Rasterkreises
B_{Med}	= Median aller Pixel außerhalb des Rasterkreises
F_{Non1}	= Median aller Pixel der Nonsense-Sonde 1 innerhalb des Messkreises
F_{Non2}	= Median aller Pixel der Nonsense-Sonde 2 innerhalb des Messkreises
B_{Non1}	= Median aller Pixel der Nonsense-Sonde 1 außerhalb des Messkreises
B_{Non2}	= Median aller Pixel der Nonsense-Sonde 2 außerhalb des Messkreises

Da jede Sonde dreimal auf dem SRP-PhyloChip gespottet wurde, wurde der Mittelwert der einzelnen SNR-Werte berechnet. Wenn der Mittelwert einen höheren „threshold“-Wert als drei aufwies, wurde das Signal einer Sonde als positiv bewertet. Bei dem „threshold“-Wert drei handelt es sich um einen willkürlichen Wert.

B.7 Erstellung einer *dsrAB*-Genbank

Als erstes wurde das *dsrAB*-Gen mittels PCR aus der Umweltprobe amplifiziert. Mit jedem der drei unterschiedlichen DNS-Extrakte wurde eine eigene PCR durchgeführt. Die drei unterschiedlichen PCR-Reaktionen wurden nach der Amplifikation zusammengeführt und in einem Gel aufgereinigt. Die Fragmente mit einer Größe von ca. 1900 Basenpaaren wurden aus dem Gel herausgeschnitten, in das pCR[®]-XL-TOPO-Plasmid ligiert und in *E. coli* kloniert. Die transformierten *E. coli* wurden auf kanamycin-haltigen LB-Platten selektioniert. Klone, bei denen die M13-Screening-PCR auf ein Insert mit einer Größe von 1900 Basenpaaren schließen lies, wurden in Kanamycin haltigen flüssigem LB-Medium über Nacht wachsen gelassen. Die Klone wurden geerntet und deren Plasmide isoliert. Für die langfristige Stammhaltung der Klone mit richtigem Insert wurden Glycerinstocks angelegt. Die Inserts der Plasmide wurden sequenziert, die Sequenzdaten in ARB importiert und für weitere Analysen hergenommen.

B.7.1 Gelaufreinigung der PCR-Produkte

Um die Gen-Amplifikate nach der PCR für die Klonierung vorzubereiten, wurden sie mittels Gelaufreinigung in einer „low-melting-point“-Agarose-Gelelektrophorese von Verunreinigungen, wie unspezifischen DNS-Fragmenten und Primern, gereinigt.

Lösungen:

1 x TAE-Puffer

TE-Puffer

Auftragspuffer

DNS Längenstandard (KbL)

SYBR[®] Green I-Färbelösung

Für die „low-melting-point“-Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1,5%iges Agarosegel vorbereitet. Es wurden ca. 1,5 g NuSieve[®] 3:1 Agarose eingewogen und in 100 Milliliter 1 x TAE-Puffer langsam eingerührt. Das Verfahren ist analog zu dem in B.4 beschriebenen. Die DNS im Gel wurde nach Beendigung des Gellaufs für ca. eine Stunde in 100 Milliliter SYBR[®] Green I-Färbelösung gefärbt. Die gefärbten DNS-Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit Glaskapillaren aus dem Gel ausgestochen. Mit einer Pipette wurde das Gelstückchen in ein steriles 1,5 Milliliter ERG mit 50 Mikroliter TE-Puffer herausgeblasen und für zehn Minuten bei 80°C aufgeschmolzen. Die aufgeschmolzene DNS wurde wie in B.7.2.3.2 beschrieben für die Ligation eingesetzt.

B.7.2 Klonierung von Gen-Amplifikaten

B.7.2.1 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Die bei der Klonierung von Gen-Amplifikaten verwendeten kompetenten Zellstämme sind in Tabelle B.12, die Plasmide in Tabelle B.13 aufgeführt.

Tabelle B.6 Transformationskompetente Organismen

Art	Stamm	Transformations-system	Genotyp	T _{opt.} [°C]	Medium
<i>E. coli</i>	TOP10	Chemische Transformation	F ⁻ mcrA Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	37	LB

Tabelle B.7 Verwendete Plasmide und deren relevante Eigenschaften

Vektorbezeichnung	Größe	Eigenschaften	Bezugsquelle
pCR [®] 2.1-TOPO	3931 bp	Ampicillin-, Kanamycinresistenz, LacZα Fragment, T7 Promotor	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
pCR [®] -XL-TOPO	3519 bp	Kanamycin-, Zeocinresistenz, ccdB Killer Gen, T7 Promotor	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

B.7.2.2 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit

B.7.2.2.1 Klonierung

Der Vorteil der TOPO Klonierungs-Kits liegt darin, dass die Ligation von PCR-Produkten nicht von spezifischen, durch Restriktionsendonukleasen generierten einzelsträngigen Überhängen des DNS-Fragments abhängig ist. Das System basiert vielmehr auf der matrizenunabhängigen terminalen Transferaseaktivität der *Taq*-DNS-Polymerase, welche bei der PCR unspezifisch einzelne Desoxy-Adenosinnukleotide an die 3'-Enden der PCR-Amplifikate anhängt. Die als Vektor verwendeten TOPO-Plasmide besitzen ihrerseits einzelne 3'-Desoxy-Thymidin-Überhänge, über die das amplifizierte Gen in den Vektor ligiert werden kann. Diese Insertion wird durch eine Topoisomerase katalysiert, welche auf dem linearisierten Vektor die Insertionsstelle flankierend gebunden vorliegt. Das 3,9 kb große Plasmid pCR[®]2.1-TOPO trägt ferner, neben den Resistenzgenen gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin, das α-Fragment des *LacZ*-Gens, welches durch die Insertionsstelle unterbrochen wird. Auf diese Weise kann durch ein Blau-Weiß-Screening unter Verwendung von X-Gal auf das Vorhandensein des Inserts getestet werden, da nur ein selbst-ligierter Vektor das intakte *LacZ*-Gen trägt und somit X-Gal in ein blaues Produkt umsetzen kann. In Zellen mit Insert ist das Gen unterbrochen und somit nicht funktionstüchtig, diese erscheinen auf der Platte weiß. Die Transformation geschah in chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10-

Zellen. Die Selektion und Detektion der rekombinanten *E. coli*-Zellen erfolgte durch die plasmidkodierte Antibiotikum-Resistenz und Blau-Weiß-Screening.

B.7.2.2.2 Ligation

Reaktionsansatz	11 µl
PCR-Produkt	8 µl
Salzlösung	1,5 µl
Vektor (pCR [®] 2.1/ pCR [®] II)	1,5 µl

Der Ligationsansatz wurde kurz zentrifugiert, für zehn Minuten bei RT inkubiert und anschließend sofort transformiert.

B.7.2.2.3 Transformation

Die LB-Agarplatten mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml Kanamycin wurden bei 37°C etwa eine Stunde getrocknet, ein Wasserbad auf 42°C vorgeheizt, das im Kit enthaltene SOC-Medium auf RT erwärmt und die One Shot[®] chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu jedem Schraubdeckel-Gefäß mit den chemisch kompetenten Zellen wurden die gesamten elf Mikroliter aus dem Ligationsansatz zugegeben und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, im Anschluss für genau 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und nochmals für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 Mikroliter SOC-Medium wurde das Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 37°C auf einem Rundschüttler bei 200 rpm inkubiert. Während dessen wurden je 40 Mikroliter X-Gal-Stammlösung auf den vorgewärmten Agarplatten verteilt. Nach der Inkubation wurden pro Klonierungsansatz je 100 Mikroliter und 150 Mikroliter der SOC-Vorkultur ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

B.7.2.2.4 Identifizierung rekombinanter Klone

Im Anschluss an die Transformation erfolgte die Selektion auf Vorhandensein des Vektors mittels der plasmidkodierte Antibiotikum-Resistenzgene durch Antibiotikum-haltige Medien. Die Kontrolle, ob das Gen inseriert wurde, erfolgte über ein Blau-Weiß-Screening mittels X-Gal. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht und Verstärkung von eventuellen Blaufärbungen der Kolonien bei vier Grad Celsius für mindestens eine Stunde wurden die weißen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf eine Masterplatte (LB-Festmedium mit 100 µg/ml Kanamycin) übertragen. Nach Inkubation dieser Masterplatte bei 37°C wurden von ihr sowohl M13-Insertgrößentest-PCRs durchgeführt (B.5.3), als auch Übernachtkulturen in fünf Milliliter Kanamycin-haltigen LB-Flüssigmedium zur Herstellung von Glycerin-Kulturen (B.7.3.2) und für die Plasmidisolierung (B.7.4) angeimpft.

B.7.2.3 Klonierung von *dsrAB*-Gen-Amplifikaten mit dem TOPO[®] XL PCR Cloning Kit

B.7.2.3.1 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Amplifikaten in den im TOPO[®] XL PCR Cloning Kit enthaltenen Vektor pCR[®]-XL-TOPO funktioniert über ungepaarte 3'-Adenin-Nukleotide an den PCR-Produkten, welche mit den 3'-Thymidin-Nukleotiden des linearisierten Plasmids verknüpft werden. Die Selektion auf Insert-positive Klone geschieht durch eine Unterbrechung des für *E. coli* letalen *ccdB*-Gens, welches an den C-Terminus des *lacZ*-Fragments fusioniert ist. Wird kein DNS-Fragment in den Vektor ligiert, bleibt das *lacZ-ccdB*-Fusionsprotein intakt und tötet die transformierte Zelle ab. Zellen, bei denen das Gen durch ein Insert unterbrochen ist, können überleben. Zellen, die kein Plasmid aufgenommen haben, können über das im Medium enthaltene Antibiotikum selektioniert werden. Das pCR[®]-XL-TOPO Plasmid kodiert Resistenzgene für Kanamycin und Zeocin. Für die Transformation werden chemisch-kompetente *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte mit Kanamycin, das in einer Konzentration von 100 µg/ml im LB-Medium enthalten war.

B.7.2.3.2 Ligation

Für die Ligation wird nur frisches PCR-Produkt verwendet, da beim Einfrieren der PCR-Produkte die dATP-Überhänge abfallen. Es werden vier Mikroliter des PCR-Produktes und ein Mikroliter des Vektors (pCR[®]-XL-TOPO) bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wird zum Beenden der Reaktion ein Mikroliter der 6 x TOPO[®] Cloning Stop Solution zugegeben, gevortext, abzentrifugiert und die sechs Mikroliter sofort für die Transformation verwendet.

B.7.2.3.3 Transformation

Zwei LB-Platten (Kanamycin 50 µg/ml) wurden bei 37°C vorgewärmt und getrocknet. Chemisch kompetente *E. Coli* wurden auf Eis aufgetaut. Den Zellen wurde der gesamte Reaktionsansatz von sechs Mikroliter zugegeben. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden anschließend für 30 Sekunden auf 42°C erwärmt und wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 250 Mikroliter SOC-Medium hinzupipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ca. je 100 Mikroliter der SOC-Vorkultur wurden auf die vorgewärmten LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B.7.2.3.4 Identifizierung rekombinanter Klone

Die Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, auf eine LB-Masterplatte (Kanamycin 50µg/ml) überimpft und bei 37°C angezogen. Von der Masterplatte wurden die Klone zum einen für das Animpfen der M13-Insertgrößentest-PCR (B.5.3) und zum anderen zur Inokulation von fünf Milliliter-Übernachtskulturen verwendet. Die fünf Milliliter-Übernachtskulturen wurden für die Erstellung von Glycerinkulturen für die Stammhaltung (B.7.3.2) und zur Plasmid-Isolierung (B.7.4) verwendet.

B.7.3 Anzucht rekombinanter *E. coli*-Stämme und Stammhaltung

B.7.3.1 Anzucht und Zellernte

Die Anzucht rekombinanter Zellen wurde sowohl auf Platte als auch in Flüssigkultur durchgeführt. Das LB-Medium war in beiden Fällen mit 100 µg/ml Kanamycin (B.1.4.3.1) versetzt, um das Wachstum von Zellen ohne Plasmid zu unterbinden. Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C.

Für die Anzucht der Zellen in Flüssigkultur wurde ein LB-Röhrchen (Reagenzglas mit fünf Milliliter LB-Medium) unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie von der Platte angeimpft und unter Selektionsdruck bei 37°C über Nacht auf einem Rundschtüttler bei 200 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (14000 rpm, eine Minute) von zwei mal zwei Milliliter Kultur in einem sterilen zwei-Milliliter-ERG.

Für die Anzucht in größeren Kulturvolumina wurden 200 Milliliter-Erlenmayer-Kolben mit 100 Milliliter LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde mit einem Milliliter einer fünf Milliliter-Übernachtskultur angeimpft und auf einem Rundschtüttler bei 200 rpm und 37°C bis zur gewünschten Zelldichte angezogen. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde dabei in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Blindwert diente steriles LB-Medium.

B.7.3.2 Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurde der jeweilige Klon auf Kanamycin-haltige LB-Masterplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C angezogen, bei vier Grad Celsius gelagert.

Für die langfristige Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 700 Mikroliter einer Übernachtskultur in einem sterilen 1,5 Milliliter-Schraubdeckel-Gefäß vorgelegt, unter sterilen Bedingungen mit 300 Mikroliter Glycerol-Lösung (50%) versetzt, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei -80°C gelagert.

B.7.4 Plasmid Isolierung

Die Plasmid-Aufreinigung aus rekombinanten *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von organischer Präzipitierung der Proteine und Fällung der Plasmid-DNS mittels Isopropanol. Die so aufgereinigte Plasmid-DNS kann direkt für weitere Experimente, z. B. zur Sequenzanalyse, verwendet werden.

Lösungen:

Puffer P1

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

NaOH/SDS-Lösung

ddH ₂ O	8 ml
NaOH (2N)	1 ml
10% SDS	1 ml

Kaliumacetat/Acetat-Lösung

Kaliumacetat (5M)	6 ml
ddH ₂ O	2,85 ml
Eisessig	1,15 ml

Die geernteten Zellen wurden in 100 Mikroliter P1-Puffer resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 200 Mikroliter NaOH/SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1% SDS) zugegeben, die Suspension zehn Sekunden gevortext und für fünf Minuten auf Eis gestellt. Zum Fällern der Proteine wurden 150 Mikroliter Kaliumacetat/Acetat-Lösung beigegeben. Es wurde erneut gevortext und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, eine Minute) abgetrennt und der Überstand in ein frisches ERG überführt, wo er mit einem Volumen Isopropanol versetzt und die DNS für zehn Minuten bei RT ausgefällt wurde. Die DNS wurde abzentrifugiert (14000 rpm, eine Minute), der Überstand verworfen und das Pellet zweimal in 500 Mikroliter eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und jeweils wieder pelletiert (14000 rpm, eine Minute). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt kurz getrocknet. Die Plasmid-DNS wurde in 50 Mikroliter ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

B.8 Analyse der Sequenzdaten

B.8.1 Sequenzierung von DNS-Molekülen

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkten erfolgte nach dem „cycle-sequencing“ Prinzip. Dieses stellt eine Kombination aus der enzymatischen Didesoxy-Ketten-Abbruchmethode (Sanger et al. 1977) und der Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNS-Polymerase dar.

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) nach den Anleitungen des Herstellers in einem Thermocycler durchgeführt. Für die Reaktion wurden neben 2'-Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) auch 2',3'-Didesoxy-Nukleotid-Triphosphate (ddNTPs) und nur ein einziger Primer verwendet. Die in den unterschiedlichen Sequenzierreaktionen eingesetzten Primer sind in Tabelle B.8 angeführt und wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Die Primer TopoSeq-F, TopoSeq-R, UniV und UniR sind komplementär zu Zielsequenzen auf den TOPO-Klonierungsvektoren. Die mit „DSR“ bezeichneten Primer sind komplementär zu Zielsequenzen auf dem *dsrAB* Gen.

Tabelle B.8 Primer für die Sequenzierreaktionen

Primer	Sequenz ^b	Spezifität	Ta ^c	Referenz
DsrStJ-F	5' TGC CCS AAC KRC TGY GT 3'	<i>dsrA</i>		
DSR-Seq500F	5' CAG GAY GAR CTB CAC CG 3'	<i>dsrA</i>		
DSR-Seq1500R	5' CCC TGN GTR TGN AYR AT 3'	<i>dsrB</i>	50°C	Barisic (diese Arbeit)
TopoSeq-F	5' AGC TTG GTA CCG AGC T 3'	TOPO-Klonierungsvektoren		
TopoSeq-R	5' TCT AGA TGC ATG CTC GA 3'	TOPO-Klonierungsvektoren		
UniV	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	TOPO-Klonierungsvektoren	60°C	Invitrogen
UniR	5' GAA ACA GCT ATG ACC ATG 3'	TOPO-Klonierungsvektoren		

^b Abkürzungen nach IUPAC-Nomenklatur

^c Verwendete Annealing-Temperatur des Primers

Jedes der vier ddNTPs ist mit einem individuellen Farbstoff markiert. Es findet eine lineare Amplifikation der DNS statt. Die Verlängerung des Nukleinsäurestrangs bricht während der Reaktion ab, sobald die AmpliTaq DNS-Polymerase FS ein markiertes ddNTP in den DNS-Strang einbaut, da ihr an dieser Stelle keine 3'-OH-Gruppe zur Kettenverlängerung mehr zur Verfügung steht. Dies resultiert in unterschiedlich langen Kopien des Zielgens.

Die Reaktion wurde anschließend in den 3130xl Genetic Analyzer pipettiert. In diesem Gerät wurden die unterschiedlich großen Sequenzier-Produkte über eine mit einem Polymer gefüllte Kapillare aufgetrennt. Durch die Markierung der Sequenzier-Produkte an ihren Enden mit den Fluoreszenzfarbstoffen V3 Dye 1 (ddGTP), V3 Dye 2 (ddATP), V3 Dye 3 (ddTTP) und V3 Dye 4 (ddCTP) konnten die Sequenzierungsfragmente nach Laseranregung anhand ihrer Fluoreszenz von einer Photodiode detektiert und elektronisch aufgezeichnet werden.

Die beim 3130xl Genetic Analyzer mitgelieferte Software gibt die Sequenzinformationen als Fasta- und ab1-Datei aus. Die Dateien wurden mit dem Programm ChromasPro⁴ geöffnet und die DNS-Sequenzen in ChromasPro korrekturgelesen.

B.8.2 Schnellanalyse der Sequenzen

Zur groben taxonomischen Einordnung der erhaltenen Sequenzen wurde das Datensuchprogramm „BLAST“ (basic local alignment search tool)⁵ des National Institute of Health (USA) verwendet (Altschul et al. 1990; Madden et al. 1996; Ma et al. 2002). Dieser Suchalgorithmus durchsucht die Datensätze verschiedener Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen und sortiert diese entsprechend ihrer Relevanz.

B.8.3 Vergleichende Sequenzanalyse mit dem ARB Software-Paket

Die Bearbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit dem ARB Software Paket (Ludwig et al. 2004). ARB ist eine komplexe Sammlung an verschiedensten Programmen und Werkzeugen zur Erstellung und Verwaltung von Sequenz-Datenbanken, zur vergleichenden Analyse dieser Daten, sowie zur Konstruktion phylogenetischer Stammbäume. Bei Proteinen können die Phylogeniebäume sowohl anhand der DNS- als auch ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenzen berechnet werden.

Eine *dsrAB*-Datenbank, die im Rahmen von mehreren Publikationen errichtet wurde (Loy et al. 2004; Leloup et al. 2006), enthält bereits alignierte *dsrAB*-Sequenzen, welche das Gerüst für weitere Daten bilden. Zunächst müssen die Sequenzen so zueinander

⁴ <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ausgerichtet werden, dass homologe Bereiche untereinander liegen (Alignment). Zur anschließenden Berechnung des so genannten evolutionären Abstandes („estimated evolutionary distance“), welcher schließlich in Stammbäumen graphisch dargestellt werden kann, stehen in ARB unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Ferner enthält das Software-Paket Programme, welche anhand der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen die Entwicklung von spezifischen PCR-Primern und Oligonukleotidsonden ermöglichen.

B.8.4 Alignment der Proteinsequenzen mittels ARB

Die *dsrAB*-Genfragmentsequenzen wurden mittels der ARB Import-Funktion in die komplette *dsrAB*-ARB-Datenbank importiert. Die Sequenzen wurden mittels der Funktion „Fast Aligner“ des ARB-Sequenzeditors (ARB_EDIT 4.1) automatisch aligniert. Der „Fast Aligner“ vergleicht die neuen Daten mit dem bereits bestehenden Datensatz und richtet dementsprechend die Sequenzen so zueinander aus, dass homologe Bereiche untereinander liegen. Nach einer weiteren manuellen Optimierung des Alignments wurden die Verwandtschaftsverhältnisse der neuen Sequenzen zu anderen SRP ermittelt. Die *dsrAB*-Gensequenzen wurden nach dem Alignen der DNS in den GDE („Genetic Data Environment“) 2.2 Sequenzeditor geladen und dort in ihre Aminosäuresequenzen übersetzt, um das Aminosäure-Alignmet sowie die Korrektur der DNS-Sequenzen nochmals durchzuführen.

B.8.5 Erstellung phylogenetischer Bäume mittels ARB

Vor der Berechnung phylogenetischer Stammbäume wurden so genannte Konservierungsfiler erstellt. Diese Filter schließen hochvariable Sequenzpositionen aus, um ihren Einfluss auf die Sequenzanalysen zu minimieren. Auf *DsrAB*-Aminosäuresequenzen basierende Baumberechnungen wurden unter Verwendung eines „indel“-Filters durchgeführt. Dieser schließt Alignmentregionen, welche Insertionen oder Deletionen in den Sequenzen aufweisen, von der Sequenzanalyse aus. Die Berechnung von phylogenetischen Bäumen erfolgte mit den entsprechenden Funktionen der ARB Software. Dabei wurden verschiedene implementierte Kalkulationsmethoden (Neighbor-Joining, Fitch, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood) verwendet.

Für die eigentlich ungewurzelten Bäume wurde eine so genannte Außengruppe als Wurzel manuell bestimmt. Bei der Erstellung des DsrAB basierenden Bäumen wurden die zu den SRP gehörenden *Thermodesulfovibrio* spp. als Außengruppe verwendet.

B.8.5.1 Distanzmatrixmethoden: Neighbor-Joining und Fitch

Die Distanzmatrixverfahren Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) und Fitch (Fitch and Margoliash 1967) berechnen phylogenetische Bäume anhand von Distanzmatrizen, die sich aus der Sequenzinformation ableiten lassen und stellen die einfachste Methode einer Abschätzung von phylogenetischen Beziehungen aus genetischen Distanzen dar. Neighbor-Joining wird bevorzugt für Nukleinsäuresequenzen hergenommen, Fitch für Aminosäuresequenzen. Nach Berechnung der Distanzmatrix werden die ähnlichsten Sequenzen zu einer Gruppe zusammengefasst. Nun wird eine Distanzmatrix berechnet, aber die zwei zu einer Gruppe zusammengefassten Sequenzen werden als eine Sequenz betrachtet. Erneut werden die zwei ähnlichsten Sequenzen zu einer Gruppe zusammengefasst. Diese Schritte werden so oft wiederholt, bis alle Sequenzen zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Die Astlängen des berechneten Baumes korrelieren mit den Abständen der Distanz-Werte. Die Distanz-Werte werden nachfolgend in phylogenetische Abstände umgerechnet. Der Vorteil von Distanzmatrix-Verfahren ist der geringe Rechen- und Zeitaufwand. Ein Nachteil ist die Tatsache, dass nicht die originalen Sequenzdaten für die Baumberechnung verwendet werden, sondern die aus den Sequenzdaten abgeleiteten Distanzwerte.

B.8.5.2 Maximum-Parsimony

Der Maximum-Parsimony-Algorithmus beruht auf der Annahme, dass in der Evolutionsgeschichte die Erhaltung eines Merkmals wahrscheinlicher ist als dessen Veränderung. Weiters wird angenommen, dass die Geschwindigkeit, mit der sich Merkmale ändern, immer gleich bleibt. Dadurch wird der kürzeste Stammbaum berechnet, d.h. jener, der die wenigsten evolutiven Schritte benötigt (Felsenstein 1995). Um die Berechnung durchzuführen, wird jede vertikale Spalte von alignnten Sequenzen einzeln ausgewertet. Basierend auf der Anzahl von evolutionären Änderungen, die benötigt werden, um die beobachteten Daten zu erklären, wird jeder Baum bewertet.

Zum Schluss wird der Baum mit der minimalen Gesamt-Baumlänge und der geringsten möglichen Anzahl an Mutationen ausgewählt.

Da es oft mehrere Bäume gibt, die alle die geringste mögliche Anzahl an Mutationen aufweisen, wird zusätzlich ein „bootstrap“-Verfahren durchgeführt. „Bootstrapping“ ist eine Methode, die durch vielfaches zufälliges Umgestalten der Daten eine Abschätzung des statistischen Fehlers des Baumberechnungsverfahrens ermöglicht. Dabei wird eine vorher definierte Anzahl an Bäumen (in dieser Arbeit wurden 100 Bäume für die Analyse verwendet) berechnet und miteinander verglichen. Daraus ergeben sich für die Verzweigungen im Baum die sogenannten „bootstrap“-Werte, die die Stabilität der Verzweigungen widerspiegeln. Ein „bootstrap“-Wert von zum Beispiel 60% deutet darauf hin, dass in 60% dieser Pseudostichproben-Bäume eine bestimmte Verzweigung auftritt. Ein „bootstrap“-Wert, größer als 90%, wird als eine stabile Verzweigung betrachtet.

B.8.5.3 Maximum-Likelihood

Wie beim Maximum-Parsimony-Verfahren wird auch bei der Maximum-Likelihood-Methode der Sequenzdatensatz direkt zur Analyse benutzt. Die Maximum-Likelihood-Methode arbeitet mit den statistischen Methoden der Wahrscheinlichkeitsberechnung und zieht im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Methoden mehrere Aspekte in Betracht; zum Beispiel den Konservierungsgrad an bestimmten Positionen, die Wahrscheinlichkeit der Konservierung im Gegensatz zu einer Mutation oder das Verhältnis Transversion zu Transition.

Das Verfahren berechnet zuerst Zufallsbäume. Dann wird durch Verschieben der Verzweigungen versucht, einen Baum zu finden, der dem Sequenzdatensatz am ehesten entspricht. Da das Berechnen und Bearbeiten der Zufallsbäume und der Vergleich mit dem Originaldatensatz sehr rechenintensiv ist, handelt es sich beim Maximum-Likelihood-Verfahren um das Zeitaufwendigste von den Beschriebenen.

B.8.5.4 Erstellung eines Konsensusbaumes

Da sich mit jedem verschiedenen Rechenverfahren unterschiedliche Baumtopologien ergaben, wurden die Bäume entsprechend etablierter Richtlinien zu einem

Konsensusbaum (Ludwig et al. 1998) zusammengefasst. Der Konsensusbaum enthält nur Zweifach-Verzweigungen, wenn sie in allen verwendeten Verfahren reproduzierbar waren. Ansonsten sind die Verzweigungen als Busch dargestellt. Die Astlängen des Baums, und somit der phylogenetische Abstand der Arten zueinander, wurden der „Distanz-Matrix“-Analyse entnommen. Die Astlängen spiegeln aber die Werte der Distanz-Matrix nicht wider, da es beim Erstellen des Konsensusbaumes zu Fehlern in der Darstellung des phylogenetischen Abstandes zwischen den Sequenzen kommt.

Um eine korrekte Topologie der Bäume zu gewährleisten, wurden zunächst nur Vollsequenzen (>1500 Basenpaare) eingerechnet. Teilsequenzen wurden später zu Vollsequenzbäumen mit der „Parsimony Interactive“-Funktion hinzugefügt.

B.9 Statistische Methoden für die Auswertung der dsrAB-Genbank

B.9.1 Gruppierung der DsrAB-Sequenzen

Für die statistischen Analysen wurden die Gensequenzen zu OTUs (Operational taxonomic units) zusammengefasst. Dazu wurden jeweils alle DsrAB-Aminosäuresequenzen einer Datenbank untereinander verglichen. Nach einem Vergleich der maximalen Sequenzunterschiede innerhalb einer Gattung wurde ein Wert von 90% Aminosäuren-Sequenzidentität festgesetzt, um die Klone in Gruppen einzuteilen. Die Einteilung erfolgte mit dem von Holger Daims entwickelten Programm „WhatistheMatrix“ Version 1.0.

B.9.2 Coverage Berechnung

Die Coverage-Berechnung (Good 1953) gibt Auskunft darüber, wie sehr die Gensequenzen einer Genbank die gesamte Population der untersuchten Probe repräsentieren. Ein Coverage-Wert von 90% deutet darauf hin, dass ungefähr 90% aller OTUs in einer Probe erfasst wurden.

$$C_{\text{coverage}} = [1 - (n1 \div N)] \cdot 100\%$$

- n1* = Anzahl der OTUs, welche nur eine Sequenz enthalten
N = Anzahl aller Sequenzen in der Genbank

B.9.3 Rarefaction-Methode

Als weitere Methode zur Abschätzung der Sammelgüte wurde die Rarefaction-Analyse herangezogen. Diese Methode diente ursprünglich dazu, Proben miteinander zu vergleichen, die sich im Erfassungsaufwand unterscheiden (Shinozaki 1963). Es wurden die erwarteten Artenzahlen bei einer bestimmten Anzahl von Erfassungseinheiten berechnet. Die Berechnung der individuum-basierenden Rarefaction-Kurve wurde nach einer modifizierten Methode (Coleman 1981; Colwell et al. 2004) mit EstimateS durchgeführt⁶. Drei unterschiedliche OTU-Definitionen (88%, 90% und 92% Sequenzidentität) wurden verwendet.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\tau(h) = S_{\text{obs}} - \sum_{j=1}^H s_j \left(1 - \frac{h}{H}\right)^j$$

- $\tau(h)$ = zu erwartende Artenzahl für $h = 1, 2, 3 \dots H$
 S_{obs} = festgestellte Gesamtartenzahl
 h = Erfassungseinheit
 H = Gesamtzahl Erfassungseinheiten
 s_j = Anzahl an Spezies, die in j Erfassungseinheiten vorkommen

Kann die Rarefaction-Kurve durch eine Gerade der Steigung Null beschrieben werden, sind in der Genbank kaum neue OTUs zu erwarten (Achtziger 1992). Eine Extrapolation auf eine zu erwartende Gesamtartenzahl in der Umweltprobe ist nicht möglich.

⁶ Version 8.0.0; R. K. Colwell, <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>

B.9.4 Chao1 Estimator

Der Chao1 Richness Estimator (Chao 1984) gehört zu den nicht parametrischen Methoden der Statistik. Diese Verfahren berücksichtigen das Verhältnis von OTUs die öfters bzw. nur einmal beobachtet wurden. Basierend auf dem MRR-Modell (Mark release recapture Modell) wird zur Berechnung die Anzahl von OTUs, welche nur durch einen Klon (Singletons) bzw. durch zwei Klone (Doubletons) repräsentiert werden, herangezogen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine OTU in einer sehr diversen Gemeinschaft öfters als einmal beobachtet wird, ist gering und somit ist die Anzahl an nur einmal beobachteten OTUs in sehr diversen Gemeinschaften relativ hoch.

Diese Überlegungen bildeten die Grundlage für die mit dem Programm EstimateS nach der unten angegebenen Formel durchgeführten Berechnungen⁷:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

- S_{Chao1} = Anzahl an zu erwartenden OTUs
- S_{obs} = Anzahl der beobachteten OTUs
- F_1 = Singletons
- F_2 = Doubletons

B.9.5 Parsimony-Test

Der von Maddison und Slatkin entwickelte Parsimony-Test (P-Test) wurde erstmals von Martin für den Vergleich der mikrobiellen Diversität zweier unterschiedlicher Genbanken hergenommen (Slatkin and Maddison 1989; Slatkin and Maddison 1990; Maddison and Slatkin 1991; Martin 2002). Schloss und Handelsmann entwickelten 2006 das Programm TreeClimber, mit dem es leicht möglich war mit phylogenetischen Bäumen den P-Test durchzuführen (Schloss and Handelsman 2006). Um den P-Test durchzuführen, musste zuerst ein Baum im Newick-Format aus ARB exportiert werden. Aufgrund der fehlenden Überlappung einiger der verwendeten Sequenzen konnten

⁷ Version 8.0.0, R. K. Colwell, <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>

keine auf Distanzmatrizen basierenden Bäume berechnet werden, weshalb in dieser Arbeit für die P-Tests ausschließlich Parsimony-Bäume verwendet. Jeder im Baum vertretenen Sequenz wurde in einer separaten Datei ein Merkmal zugeordnet. Allen Sequenzen, die aus derselben Genbank stammten, wurde dasselbe Merkmal zugewiesen. Der Baum und die Datei mit den Informationen über die Merkmale der Sequenzen wurden anschließend in TreeClimber importiert. Weiters wurde die Anzahl der zu berechnenden Zufallsbäume auf 10000 festgelegt.

TreeClimber berechnete dann wieviele Änderungen der Merkmale (Parsimony Score) notwendig waren, um die Verteilung der beobachteten Merkmale im importierten Baum zu erklären. Hierfür wurde der Fitch-Algorithmus verwendet (Fitch 1971). Wenn der Parsimony Score des importierten Baumes niedriger war als der von 95% der Zufallsbäume, wurde davon ausgegangen, dass die Genbanken aus unterschiedlichen OTUs ohne gemeinsame Vorfahren (bzw. einem sehr alten gemeinsamen Vorfahren) zusammengesetzt waren. Wenn der Parsimony Score höher war als der von 95% der Zufallsbäume haben die OTUs wahrscheinlich gemeinsame Vorfahren. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie ähnliche Habitate besiedeln ist ebenfalls hoch.

B.10 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ermöglicht die Bestimmung der Kopienzahl einer Gensequenz in einer Probe. Dem Reaktionsgemisch wird der DNS-Farbstoff SYBR® Green I beigegeben, der in die große Furche doppelsträngiger DNS interkaliert und dabei fluoresziert. Der in die DNS integrierte Farbstoff absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm und gibt die aufgenommene Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm wieder ab. Wenn der Farbstoff nicht in DNS interkaliert, ist laut Hersteller die Fluoreszenzintensität um den Faktor 10000 niedriger.

Bei der Real-Time-PCR macht man sich den Umstand zu nutze, dass bei einer PCR-Effizienz von 100% es nach jedem Schritt (Denaturierung, Annealing, Elongation) zu einer Verdoppelung des PCR-Produktes kommt und dies durch eine Steigerung der Fluoreszenz um den Faktor zwei messbar ist. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen und wenn die Fluoreszenzintensität einen gewissen Schwellenwert (threshold) überschritten hat, wird die Anzahl von PCR-Schritten

registriert, die dafür nötig war. Der Begriff, der die Anzahl der PCR-Zyklen, bis zum Erreichen des Schwellenwertes beschreibt, wird in der Literatur auch „threshold cycle“ genannt.

So ist es möglich DNS-Standards mit bekannter Konzentration herzustellen, diese in der Real-Time-PCR zu amplifizieren und eine Eichgerade zu zeichnen. Parallel dazu lässt man Gene von Proben mit unbekannter Genkonzentration amplifizieren, misst nach jedem PCR-Schritt die Fluoreszenz und kann dann mit der Steigung der Eichgerade die Genkonzentration in der Probe berechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-Time-PCR mit dem iCycler IQ Thermocycler durchgeführt.

B.10.1 Gradienten-PCR

Während der Real-Time-PCR ist es notwendig eine hochspezifische Produktamplifikation zu erhalten. Die Spezifität einer PCR kann unter anderem durch die Annealing-Temperatur beeinflusst werden. Um die Spezifität der PCR einzustellen, wurden ein Klon aus der Zielgruppe und mehrere Klone, die von der PCR nicht erfasst werden sollten, ausgesucht und deren Plasmid-DNS in PCRs bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen amplifiziert.

Anschließend wurde für die weiteren Real-Time-PCRs die Annealing-Temperatur verwendet, bei der sich das PCR-Produkt der Zielorganismen gut und das der Nicht-Zielorganismen nicht mehr amplifizieren liesen.

Tabelle B.9 Reaktionsmischung für 25 Mikroliter PCR-Ansatz. Die Reagenzien sind mit denen in Tabelle B.1 Angeführten ident.

Reagenz	µl pro PCR-Ansatz
10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix [2,5 mM je dNTP]	2,5 µl
MgCl [25 mM]	3 µl
TMAC [0,5 M]	1 µl
Primer F [50 pmol/µl]	0,25 µl
Primer R (50 pmol/µl]	0,25 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,125 µl
ddH ₂ O	17,875 µl
DNS-Matrize	0,5 µl

Das Reaktionsgemisch wurde nach dem in Tabelle B.9 angeführten Schema pipettiert. In Tabelle B.10 sind die Primer, die für die Quantifizierungen entworfen wurden, abgebildet. Wie der Thermocyclers zu programmieren ist, ist in Tabelle B.11 ersichtlich. Mit der Gradienten-PCR wurde für das Primerpaar DsrA-OTU12-F/ DsrA-OTU12-R eine Annealing-Temperatur von 60,4°C ermittelt. Für das Primerpaar DsrB-1317-F/DsrB-1578-R konnten keine Bedingungen gefunden werden, bei denen in der PCR keine Nicht-Zielorganismen amplifiziert wurden.

Tabelle B.10 Für die Real-Time-PCR eingesetzte Primer

Primer	Sequenz	Spezifität	Ta [°]	Dimere	Hairpins	Referenz
DsrA-OTU12-F	5' CAC CGT GTC AAC CAA CCT T 3'	<i>dsrA</i> OTU12 StationJ	60,4°C	0	0	
DsrA-OTU12-R	5' GCA AAC AGC GGC TCA ATC 3'	<i>dsrA</i> OTU12 StationJ	60,4°C	0	0	Barisic (diese Arbeit)
DsrB-1317-F	5' GCC GCA ACA ACG TCG AGT 3'	Nicht spezifisch	-	2	0	
DsrB-1578-R	5' GCG CCG CAC ATG TTG AG 3'	Nicht spezifisch	-	2	0	

[°] Verwendete Annealing-Temperatur des Primers

Tabelle B.11 Programm für die Gradienten-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	30 x
Annealing	50-70°C	40 sek	
Elongation	72°C	30 sek	
finale Elongation	72°C	10 min	1

B.10.2 Bestimmung der idealen Primerkonzentrationen für die PCR

Es wurde eine Real-Time-PCR angesetzt, um die idealen Primerkonzentrationen für das Primerpaar DsrA-OTU12-F/DsrA-OTU12-R in einer PCR zu bestimmen. Dabei wurde jeder Primer in fünf verschiedenen Konzentration eingesetzt (100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM und 1000 nM). Somit ergaben sich 25 mögliche Reaktionen, die alle unterschiedliche Primerkonzentrationen aufwiesen.

Tabelle B.12 Primer-Pipettierschema der 25 unterschiedlichen Reaktionsgemische

Primer	100nM Vorwärts	250nM Vorwärts	500nM Vorwärts	750nM Vorwärts	1000nM Vorwärts
Rückwärts	0,1 µl V	0,25 µl V	0,5 µl V	0,75 µl V	1 µl V
100nM	0,1 µl R	0,1 µl R	0,1 µl R	0,1 µl R	0,1 µl R
Rückwärts	0,1 µl V	0,25 µl V	0,5 µl V	0,75 µl V	1 µl V
250nM	0,25 µl R	0,25 µl R	0,25 µl R	0,25 µl R	0,25 µl R
Rückwärts	0,1 µl V	0,25 µl V	0,5 µl V	0,75 µl V	1 µl V
500nM	0,5 µl R	0,5 µl R	0,5 µl R	0,5 µl R	0,5 µl R
Rückwärts	0,1 µl V	0,25 µl V	0,5 µl V	0,75 µl V	1 µl V
750nM	0,75 µl R	0,75 µl R	0,75 µl R	0,75 µl R	0,75 µl R
Rückwärts	0,1 µl V	0,25 µl V	0,5 µl V	0,75 µl V	1 µl V
1000nM	1 µl R	1 µl R	1 µl R	1 µl R	1 µl R

Die 25 verschiedenen Reaktionsgemische wurden analog zu dem in Tabelle B.9 angeführten Schema hergestellt. Der iCycler IQ Thermocycler (Biorad Laboratories GmbH, München) wurde wie in Tabelle B.11 programmiert, mit dem Unterschied, dass die Annealing-Temperatur bereits bekannt war. Die Reaktionskinetik der PCR-Gemische wurde, wie in B.10.4 beschrieben, analysiert. Die Primerkonzentrationen in dem Reaktionsgemisch, das als erstes den Schwellenwert (threshold) erreichte, wurden für die weiteren Real-Time-PCRs verwendet. Für den Primer DsrA-OTU12-R wurde eine ideale Konzentration von 1000 nM pro PCR-Ansatz bestimmt, die ideale Konzentration für den Primer DsrA-OTU12-F lag bei 750 nM pro PCR-Ansatz.

B.10.3 Erstellung von quantitativen DNS-Standards für die Real-Time-PCR

Die Quantifizierung eines bestimmten Gens in einer Umweltprobe mittels Real-Time-PCR erfolgte über den Vergleich der „threshold cycle“-Werte von Proben mit bekannter und unbekannter Genkonzentration. Aus diesem Grund war es notwendig, DNS-Standards mit genau bekannter Genkonzentration herzustellen.

Beim Erstellen der DNS-Standards aus Plasmiden ist darauf zu achten, dass „coiled“ und „supercoiled“ DNS-Strukturen der Plasmide zu einer reduzierten PCR Effizienz führen können (Suzuki et al. 2000). Um dieses Problem zu umgehen, wurden als DNS-Standards PCR-Produkte der zu amplifizierenden Gene verwendet. Zum Herstellen der DNS-Standards wurden die Vektorinserts des Klons J1-30 (*dsrAB*) mit dem in den flankierenden Sequenzregionen bindenden Primerpaar M13-F und M13-R (B.5.3)

amplifiziert und mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (B.6.2) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Die DNS-Konzentrationen der Eichstandards [ng/μl] wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ mit einem NanoDrop ND-1000 bestimmt. Mit dem DNA Molecular Weight Calculator⁸ wurde aus den bekannten Sequenzen der PCR-Produkte ihre Molmasse [g/mol] bestimmt und anschließend mit unten beschriebenen Formel die Konzentration der DNS-Lösung in Moleküle/μl umgerechnet. Von dieser Standardlösung wurde anschließend eine Verdünnungsreihe von jeweils 1:10 Verdünnungen in ddH₂O hergestellt und bei -20°C gelagert.

$$C_s = \frac{C_w}{M} \times N_A$$

- C_s = Kopienzahl der DNS-Matrizen pro μl
 C_w = DNS-Konzentration [g μl⁻¹]
 N_A = Avogadrozahl [6,022 × 10²³ mol⁻¹]
 M = Molmasse des PCR Produkts [g mol⁻¹]

B.10.4 Durchführung der Real-Time-PCR

Mit den in Abschnitt B.10 beschriebenen Methoden konnten die idealen Annealing-Temperatur und Konzentrationen der Reagenzien für die Real-Time-PCR ermittelt werden. Da mehrere Quantifizierungsreaktionen notwendig waren, wurde neben einem ready-to-use Real-Time-PCR-Kit aus Kostengründen auch ein aus den für die normale PCR verfügbaren Reagenzien selbst hergestelltes Reaktionsgemisch verwendet. Dem zweifach konzentrierten ready-to-use Reaktionscocktail „Platinum® SYBR® Green I qPCR SuperMix-UDG“ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) mussten nur die Primer, ddH₂O und die DNS-Extrakte hinzugegeben werden.

⁸ <http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>

B Material und Methoden

Tabelle B.13 Reaktionsmischung für einen 50 Mikroliter PCR-Ansatz mit dem Reaktionscocktail „Platinum® SYBR® Green I qPCR SuperMix-UDG“

Reagenzien	µl pro 50 µl PCR-Ansatz
2 x Platinum® SYBR® Green I qPCR SuperMix-UDG	25 µl
DsrA-OTU12-F (50pmol/µl)	0,75 µl
DsrA-OTU12-R (50pmol/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 45 µl
Matrizen-DNS	5 µl

Das zweite Reaktionsgemisch wurde nach dem in Tabelle B.14 ersichtlichen Schema pipettiert.

Tabelle B.14 Reaktionsmischung für einen 50 Mikroliter selbst bereiteten Real-Time-PCR-Ansatz.

Reagenzien	µl pro 50 µl PCR-Ansatz
10x Puffer	5 µl
dNTP-Mix [2,5 mM je dNTP]	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	6 µl
TMAC [0,5 M]	2 µl
DsrA-OTU12-F [50pmol/µl]	0,75 µl
DsrA-OTU12-R [50pmol/µl]	1 µl
SybrGreen (1:500)	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
ddH ₂ O	ad 45 µl
Matrizen-DNS	5 µl

Die Quantifizierung der DNS-Standards und DNS-Extrakte wurde in Triplikaten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde in einer 96-well Microtiterplatte (MJ Research, Waltham, MA, USA) pipettiert und mit selbstklebenden optischen Folien (Biorad) verschlossen. Der ThermoCycler wurde, wie in Tabelle B.15 gezeigt, programmiert.

Eine im ThermoCycler integrierte Digitalkamera hat die Änderungen in der Fluoreszenzintensität während der PCR dokumentiert und die Daten an einen Computer weitergeleitet.

Tabelle B.15 Programmierung des iCycler IQ Thermocycler für die Quantifizierung von OTU 12

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	40 x
Annealing	60,4 °C	40 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

Nach dem Ende des letzten PCR-Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse gestartet (B.10.5).

Die Daten, die während der Real-Time-PCR an den Computer weitergegeben wurden, wurden von der iCycler IQ Optical System Software V 3.0a (Biorad Laboratories GmbH, München) erfasst und weiterverarbeitet. Das Programm kann den „threshold cycle“ (Ct) bestimmen, der definiert ist als Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzintensität der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Da ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ct einer Reaktion und dem Logarithmus der Menge an anfänglich eingesetzten Matrizen-DNS-Molekülen besteht, können die Ct-Werte der DNS-Standards dafür verwendet werden, eine Geradengleichung aufzustellen. Der Ct-Wert einer Probe mit unbekannter Genkonzentration und der Wert der Steigung der Eichgerade ermöglichen das Berechnen der Zielmolekülzahl in der Probe.

Aus der Steigung der Geraden wurde mit der erwähnten Software auch die Effizienz der PCR errechnet. Weiters gibt die Software auch den R-Wert der Eichgerade an. Die Daten wurden in das Programm Excel V7.0 exportiert und weiter bearbeitet.

B.10.5 Schmelzkurvenanalyse

Die Real-Time-PCR-Produkte wurden mit einer Schmelzkurvenanalyse auf dem iCycler begutachtet. Das Standard-Temperaturprofil zur Schmelzkurvenanalyse begann mit der Einstellung der Temperatur auf 55°C. Anschließend wurde die Temperatur mit einem Gradienten von 0.5°C/Zyklus auf 95°C erhöht. Dabei wurde die Abnahme der Fluoreszenzintensität gemessen, die aus der Dissoziation des SybrGreen/DNS-Komplexes resultiert. Die aufgezeichneten Daten wurden mit der iCycler Data Analysis Software ausgewertet. Die erste Ableitung der Abnahme der Fluoreszenzintensität pro Temperaturschritt (dI/dT) ergibt die Schmelzkurve, in der das spezifische Produkt als einheitlicher Peak erscheinen sollte. Anhand der Schmelzkurve kann die Messtemperatur optimiert werden. Sollten Nebenpeaks durch Primerdimere auftreten, so muss die Messtemperatur höher gewählt werden, bzw. die Primerkonzentrationen justiert werden.

B.11 Quantifizierung der Nukleinsäuren aus der DNS Extraktion mittels PicoGreen®

Die DNS-Konzentrationen der Extraktionen wurden mit dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) nach Herstelleranweisung im Nanodrop ND-3300 Fluorospektrometer (NanoDrop Technologies Inc., USA) vermessen. PicoGreen® ist ein sensitiver Farbstoff, der in doppelsträngige DNS (dsDNS) interkaliert und in dieser Form über stark erhöhte Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einem Emissionsmaximum bei 520 nm verfügt.

Die erhaltenen Fluoreszenzwerte eines im Kit mitgelieferten λ -Phagen-DNS-Mengenstandards in verschiedenen Konzentrationen wurden dann mit Hilfe des Programms Excel V7.0 gegen ihre Menge [ng] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der erhaltenen Geradengleichung konnten aus den Fluoreszenzwerten der extrahierten DNS-Lösungen die Konzentrationen [ng/ μ l] bestimmt werden.

C Ergebnisse

C.1 Mikroarray Analyse von Station J

Aus dem Sediment von Station J wurde aus Core C DNS extrahiert (B.2) und die 16S-rRNS-Gene mit den universellen Primerpaaren 1492R/616V und 630R/616V amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden „gepoolt“, fluoreszenzmarkiert (B.6.3) und auf dem SRP-PhyloChip hybridisiert (B.6.4). Der SRP-PhyloChip wurde gescannt und die Daten in Microsoft-Excel analysiert (B.6.5).

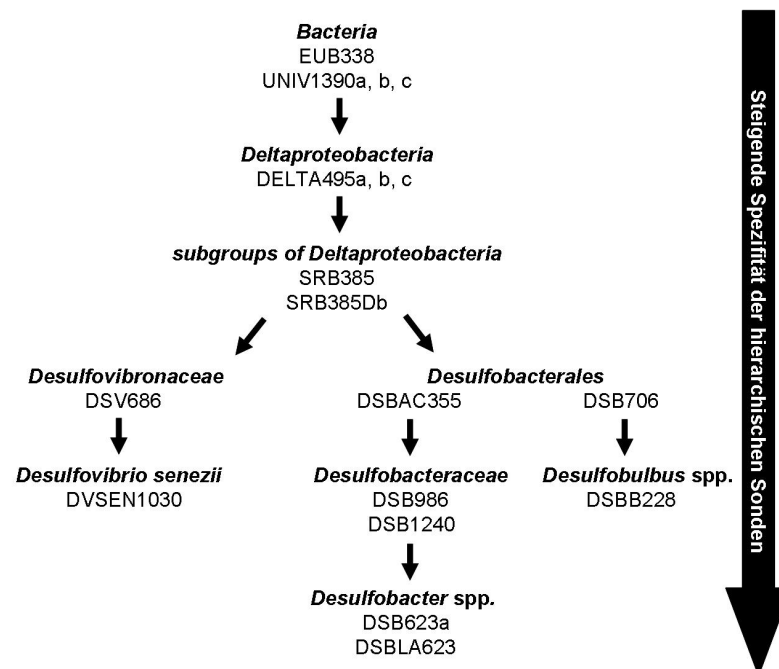


Abbildung C.1 Flussdiagramm, das die Anwesenheit von verschiedenen Gruppen der SRP im marinen Sediment an der Küste Spitzbergens, resultierend aus den positiven Signalen der Sonden, illustriert.

Die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse deuten darauf hin, dass im marinen Sediment bei Station J Organismen der Familien der *Desulfobulbaceae* und der *Desulfobacteraceae* vorhanden sind. Innerhalb der Familie der *Desulfobulbaceae* lieferte der SRP-PhyloChip positive Signale für *Desulfobulbus* spp. In der Familie der *Desulfobacteraceae* gaben die Sonden bei *Desulfobacter* spp. ein positives Signal. Die Ergebnisse lassen auch auf das Vorhandensein von *Desulfovibrio senezii* aus der Familie der *Desulfovibrionaceae* schließen.

Alle mit dem SRP-PhyloChip identifizierte Organismen in Station J gehören der Klasse der Deltaproteobakterien an.

C.2 Analyse der *dsrAB*-Genbank von Station J

Mit drei verschiedenen DNS-Extraktionsprotokollen (B.2) wurde DNS aus den Sedimentproben von Station J (Core C) isoliert und die *dsrAB*-Gene in einer PCR mit *dsrAB*-Primern amplifiziert (B.5.2). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (B.4) war eine Bande bei ca. 1,9 kbp sichtbar.

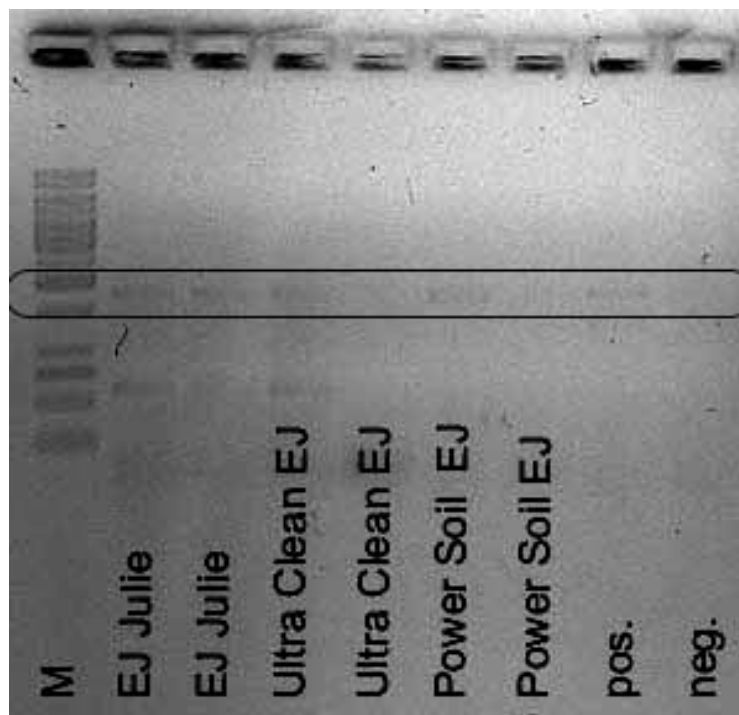


Abbildung C.2 Gelelektrophoretische Auftrennung einer PCR von Umweltproben aus Station J mit den *dsrAB*-Primern. Bei vier Proben sind schwache Banden erkennbar. EJ Julie wurde mit der DNS-Extraktion nach dem modifizierten Griffith Protokoll durchgeführt (B.3.1.3).

Die PCR-Produkte wurden kloniert (B.7.2.3) und die Klone mit der richtigen Insertgröße sequenziert (B.5.3, B.8.1). Die Sequenzdaten wurden in das Softwarepaket ARB importiert und analysiert (B.8).

C.2.1 Phylogenetische Analyse

Die aus Station J erhaltenen *dsrAB*-Sequenzen wurden einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Aus den alignierten Aminosäuresequenzen der DsrAB und veröffentlichten *dsrAB*-Sequenzen (GenBank) wurden phylogenetische Bäume mit Maximum-Likelihood, Maximum-Parsimony und dem Distanz-Modell Fitch berechnet und zu einem Konsensusbaum zusammengefasst. Hochvariable Sequenzabschnitte, die Insertionen und Deletionen enthielten, wurden mittels Filter aus den Berechnungen ausgeschlossen. Die *dsrAB*-Sequenzen wurden in OTUs (operational taxonomic units) eingeteilt, wobei eine OTU durch 90%ige Sequenzidentität (mit Filter) auf Aminosäureebene definiert wurde. In der im Zuge dieser Arbeit erstellten *dsrAB*-Genbank konnten 28 verschiedene OTUs bestimmt werden.

16 monophyletische OTUs sind im *dsrAB*-Baum tiefzweigend und ohne bekannte, kultivierte Verwandte. Andere Diversitätsstudien konnten *dsrAB*-Sequenzen isolieren, die auf einen gemeinsamen, bislang unbekanntem Vorfahren dieser tiefzweigenden Gruppe schließen lassen (Chang et al. 2001; Castro et al. 2002; Fukuba et al. 2003; Liu et al. 2003; Loy et al. 2004; Mussmann et al. 2005; Bagwell et al. 2006; Leloup et al. 2006; Lloyd et al. 2006; Schmalenberger 2007).

Der Familie der *Desulfobacteraceae* sind sieben OTUs zuordenbar. Die OTU 8 bis OTU 11 gehören ebenfalls zu der Klasse der Deltaproteobakterien. OTU13 kann keinem Phylum eindeutig zugeordnet werden.

Es gab nur einen Hinweis auf eine Chimäre, deren Sequenz daraufhin aus der Genbank gelöscht wurde.

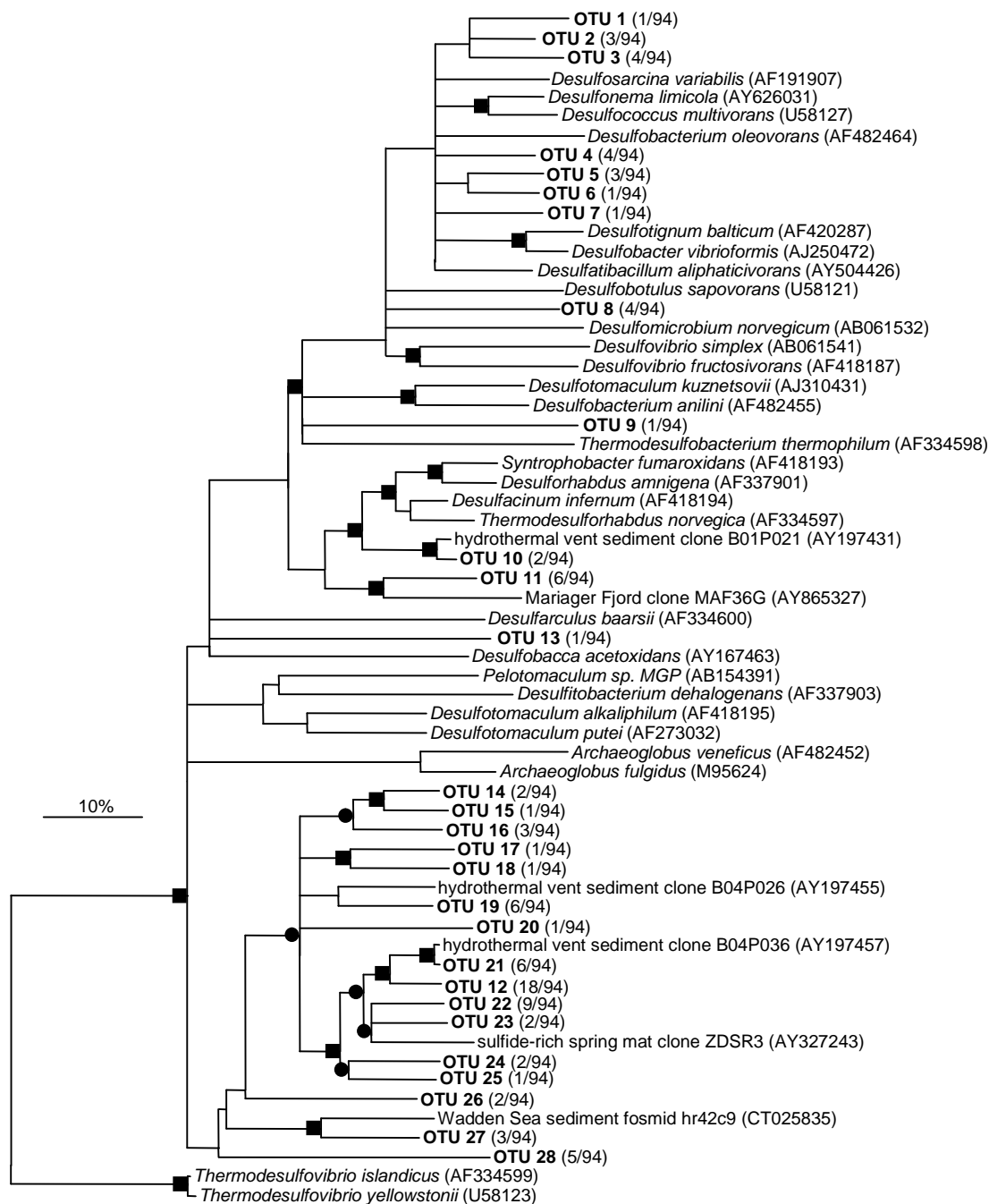


Abbildung C.3 Phylogenetischer Konsensusbaum der DsrAB-Aminosäuresequenzen (hergeleitet von den *dsrAB*-Sequenzen größer als 1700 bp) basierend auf dem FITCH-Distanzmatrix-Verfahren. Die Berechnungen wurden mit einem „indel“-Filter und den Baumberechnungsverfahren Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood und Fitch durchgeführt. Die dargestellten OTUs umfassen Klone dieser Arbeit mit maximal 10 % Nukleotidsequenzunterschied. In Klammer ist die Anzahl der Klone, die der nebenstehenden OTU zugeordnet werden konnten, im Vergleich zur Gesamtanzahl der Klone angegeben. Der Längenbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%. Bootstrap-Werte wurden beim Maximum-Parsimony Verfahren ermittelt. Das Symbol ■ steht für einen Bootstrap-Wert über 90%, das Symbol ● für über 75%.

C.2.2 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden nur Gensequenzen mit mehr als 700 Basen ausgewählt. Insgesamt wurden 94 Klone sequenziert. Von 18 Klonsequenzen wurde nur die *dsrA* teilweise sequenziert, vom Klon J1-25 nur Teile der *dsrB*. Bei 58 Klonen konnte die Sequenz zwischen den *dsrAB*-Primern vollständig bestimmt werden. Von 17 Klonen wurden sowohl Teile der *dsrA* als auch Teile der *dsrB* sequenziert, aber deren klonierte *dsrAB*-Fragmente konnten nicht vollständig sequenziert werden.

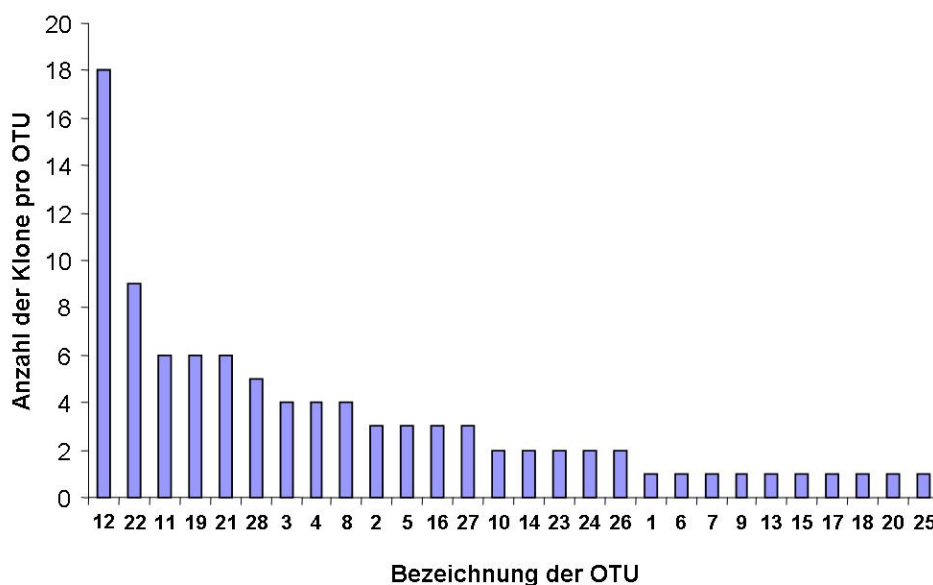


Abbildung C.4 „rank abundance“-Kurve der mikrobiellen Diversität in der *dsrAB*-Genbank. Die OTU-Definition wurde mit 90% Sequenzidentität festgelegt.

Die Sequenzen wurden zu OTUs zusammengefasst. Für die OTU-Definition wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Sequenzidentität von 90% hergenommen. Die *dsrAB*-Genbank von Station J enthält 28 OTUs, 10 davon sind mit nur einem Klon vertreten.

C.2.3 Coverage Bestimmung

Die Coverageberechnung nach Good (Good 1953) ergab, dass für die OTU-Definitionen 88% und 90% Sequenzidentität 89,4% der Diversität in der Genbank

erfasst wurden. Der Erfassungsgrad bei einer OTU-Definitionen von 92% lag bei 85,1%.

C.2.4 Rarefaction-Analyse und Chao1 Estimator

Mittels der Rarefaction-Analyse kann abgeschätzt werden, ob eine ausreichende Anzahl an Klonen in der *dsrAB*-Genbank untersucht wurde, um die Diversität innerhalb der Genbank zu erfassen. Nähert sich die Kurve asymptotisch einer Geraden mit der Steigung Null an, kann davon ausgegangen werden, dass keine neuen OTUs in der Genbank gefunden werden können.

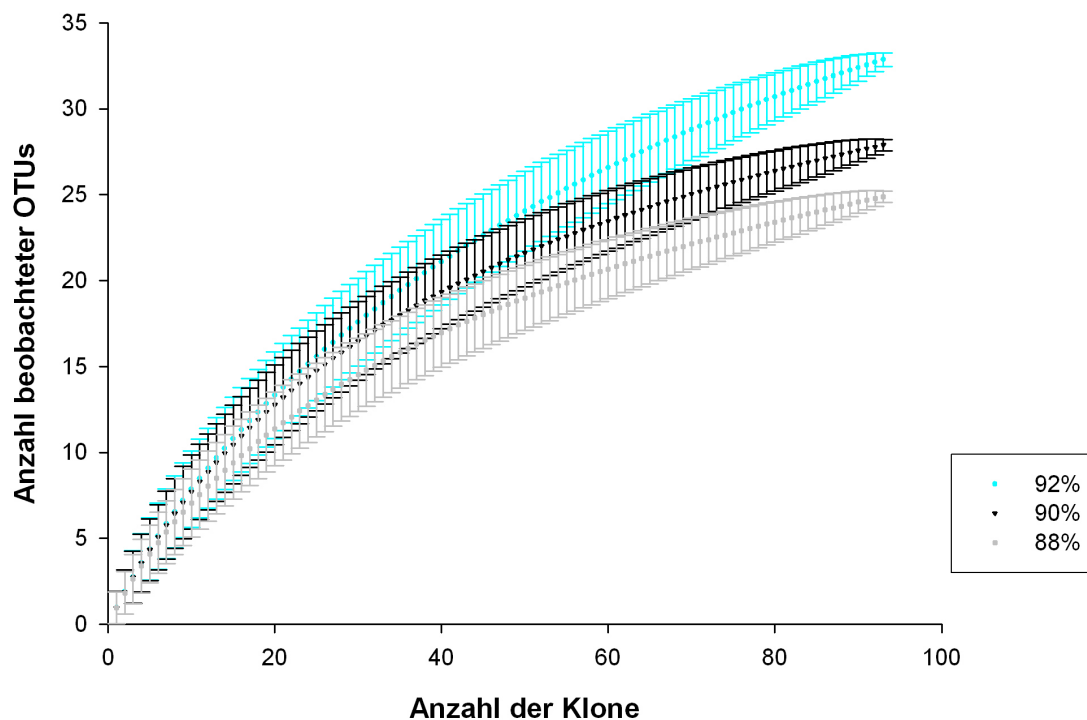


Abbildung C.5 Rarefactionanalyse der sequenzierten *dsrAB*-Fragmente der *dsrAB*-Genbank berechnet mit drei verschiedenen OTU-Definitionen. Zu jedem berechneten Punkt ist die Standardabweichung aufgetragen.

Rarefaction-Analysen wurden mit drei OTU-Definitionen (88%, 90% und 92% Sequenzidentität) vollzogen. Alle drei Kurven flachen zwar ab, aber die Steigung der Tangenten nähert sich nicht an Null an. Dies bedeutet, dass nicht ausreichend Klone sequenziert wurden, um die vollständige Diversität in der *dsrAB*-Genbank zu erfassen.

Um die Anzahl an OTUs in der Genbank abzuschätzen zu können, wurden auch Chao1-Werte berechnet. In Abbildung C.5 wurden die Chao1-Schätzungen gegen die Anzahl der beobachteten Klone aufgetragen. Mit dieser Methode wurde die Anzahl der OTUs (90% Sequenzidentität) in der Genbank auf 36 geschätzt.

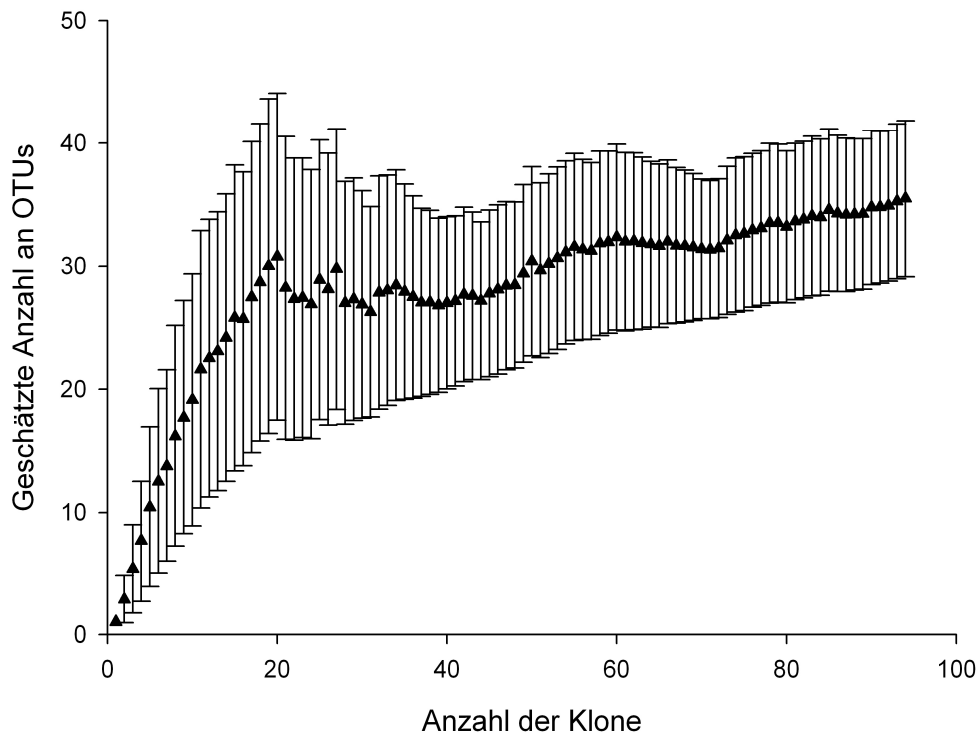


Abbildung C.6 Chao1-Analyse der Sedimentproben von Station J. Zu jedem Punkt wurde die Standardabweichung aufgetragen

C.3 Analyse von unterschiedlichen *dsrAB*-Genbanken von marinen Sedimenten

Bis November 2006 sind zehn Publikationen erschienen, in denen *dsrAB* Genbanken von marinen Sedimenten erstellt wurden (Tabelle C.1). Die in den Publikationen ermittelten *dsrAB*-Sequenzen wurden von der NCBI-Homepage heruntergeladen, in ARB importiert und alignt.

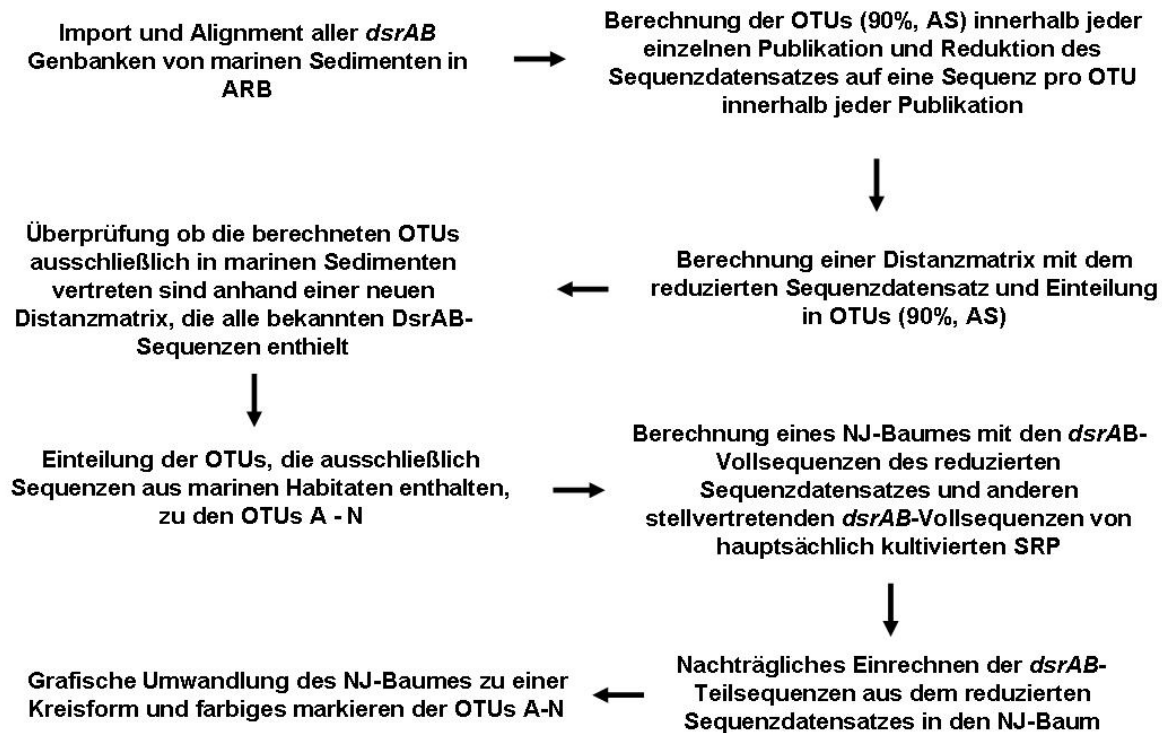


Abbildung C.7 Schematische Darstellung des Arbeitsvorganges bei der Erstellung des circulären Baumes in Abbildung C.8

Anschließend wurden die DNS-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen umgeschrieben. Um für die späteren statistischen Analysen weniger Datenmaterial zu haben, wurde bei jeder einzelnen Publikationen deren Genbank auf eine *dsrAB*-Sequenz pro OTU (90%, AS) reduziert. Da die DNS-Sequenzen innerhalb der einzelnen Genbanken unterschiedliche Längen aufwiesen, war es nötig Filter, die von Genbank zu Genbank unterschiedlich waren, bei der Berechnung der OTUs einzusetzen. Außerdem enthielten einigen Publikationen Sequenzen minderer Qualität, weshalb es notwendig war, nachträglich zu überprüfen ob einige OTUs aufgrund von Sequenzierungsungenauigkeiten oder anderen Fehlern angezeigt wurden. OTUs, die durch Sequenzierungsungenauigkeiten entstanden waren, wurden für die weiteren Analysen nicht herangezogen. Mit den reduzierten Sequenzdaten aller zehn Publikationen und der dieser Arbeit wurde erneut eine Distanzmatrix auf Aminosäurebasis berechnet. DsrAB-Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von mindestens 90% wurden zu OTUs eingeteilt. Um zu überprüfen, ob diese OTUs bis jetzt ausschließlich in marinen Sedimenten gefunden wurden, wurden deren DsrAB-Sequenzen und alle anderen publizierten DsrAB-Sequenzen in eine neue Distanzmatrix eingerechnet. Die OTUs, die nur DsrAB-Sequenzen aus marinen

Sedimenten enthielten, wurden zu den OTUs A – N eingeteilt. Anschließend wurde ein Neighbour-Joining-Baum mit dem reduzierten Sequenzdatensatz berechnet (Abbildung C.8) und die OTUs A - N mit Farbe umrandet.

Tabelle C.1 Liste mit allen bis November 2006 publizierten *dsrAB*-Genbanken von marinen Sedimenten. Jeder *dsrAB*-Genbank wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ID zugeordnet.

ID	Autor	Anzahl an OTUs/Sequenzen in der Genbank	Sequenziertes Gen	Bezeichnung der Proben	Tiefe	Temperatur
1	(Dhillon et al. 2003)	5/40	<i>dsrAB</i>	0-5cm des Sediments 5-23cm des Sediments	2013 m	3-16°C 16-140°C
2	(Fukuba et al. 2003)	9/14	<i>dsrA</i>	Sagami Sea Knoll	134 m	<4°C
3	(Jouliau et al. 2001)	5/26	<i>dsrAB</i>	Kysing	Flachwasser	4°C
4	(Leloup et al. 2006)	21/25	<i>dsrAB</i>	P824-GC	1024 m	<4°C
5	(Liu et al. 2003)	34/174	<i>dsrAB</i>	M300 M306 W301 W306 W307	387 m 340 m 119 m 630 m 997 m	~ 5°C
6	(Nakagawa et al. 2004)	2/2	<i>dsrA</i>	C F H	1384 m 1380 m 1383 m	NB 4°C 3-50°C
7	(Nakagawa et al. 2004)	16/18	<i>dsrAB</i>	INDO NBC SUIYO	2421 m 975 m 1385 m	max. 250°C max. 311°C max. 310°C
8	(Nercessian et al. 2005)	13/32	<i>dsrAB</i>	AM IR3	~2600 m ~2300 m	~50-100°C hydrothermal vent
9	(Thomsen et al. 2001)	19/46	<i>dsrAB</i>	Station 6	16 m	5,4°C
10	(Lloyd et al. 2006)	16/30	<i>dsrAB</i>	Core 5	~876 m	~6°C
11	Barisic (diese Arbeit)	28/94	<i>dsrAB</i>	Station J	214 m	0,4°C

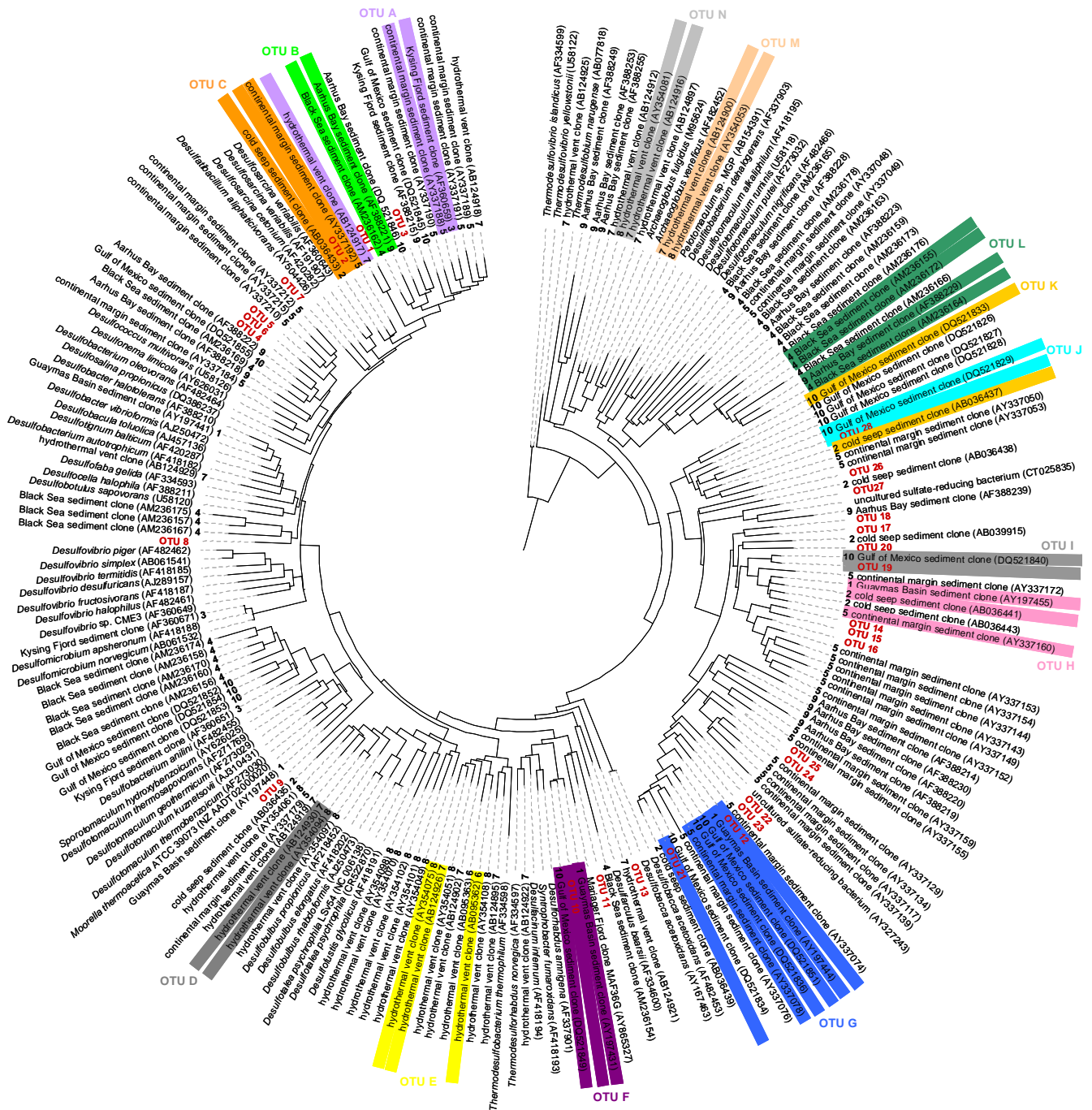


Abbildung C.8 Neighbor-Joining-Baum mit den *dsrAB*-Sequenzen des reduzierten Sequenzdatensatzes der Genbanken ID 1 bis ID 11. Es wurde zuerst ein Baum mit *dsrAB*-Sequenzen größer als 1500 bp und „indel“-Filter gerechnet. *dsrAB*-Sequenzen, die kleiner als 1500 bp waren, wurden mit der „Parsimony Interactive“-Funktion hinzugefügt. Die *dsrAB*-Sequenzen aus den Genbanken ID 1 bis ID 11 mit mehr als 90% Sequenzidentität wurden zu einer OTU (OTU A bis OTU N) zusammengefasst und in einer Farbe umrandet.

Weiters wurde gezählt, wie viele gemeinsame OTUs in den unterschiedlichen Genbanken vorhanden sind (Tabelle C.2).

Tabelle C.2 Tabelle mit der Anzahl an gemeinsamen OTUs, die in den einzelnen *dsrAB*-Genbanken teilen zu finden ist. Jede *dsrAB*-Genbank hat eine ID zugewiesen bekommen.

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		1	0	0	2	0	0	0	1	2	2
2	1		0	0	2	0	0	0	0	1	1
3	0	0		0	1	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0		0	0	0	0	3	1	1
5	2	2	1	0		0	1	0	0	1	3
6	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0
7	0	0	1	0	1	1		4	0	0	0
8	0	0	0	0	0	1	4		0	0	0
9	1	0	0	3	0	0	0	0		1	1
10	2	1	0	1	1	0	0	0	1		6
11	2	1	0	1	3	0	0	0	1	6	

C.3.1 Vergleich von unterschiedlichen *dsrAB*-Genbanken mit TreeClimber

Auf Grundlage der Tabelle C.2 wurden P-Tests durchgeführt (Martin 2002). Analysiert wurden Genbanken, die drei oder mehr gemeinsame OTUs hatten oder deren Umweltproben, aus denen die Genbanken erstellt wurden, nah voneinander entnommen wurden (**ID 9** und **ID 3**). Weiters wurde die in dieser Arbeit erstellte Genbank mit den *dsrAB*-Genbanken **ID 1-5**, **ID 9** und **ID 10** verglichen. Nur die *dsrAB*-Genbanken **ID 6** (zu geringe Anzahl an OTUs für statistische Analysen), **ID 7** und **ID 8** (aufgrund der heißen Habitats) wurden nicht mit der in dieser Arbeit erstellten Genbank verglichen. Zusätzlich wurde eine Analyse gemacht in der der gesamte Sequenzdatensatz der Genbanken **ID 1-11** verglichen wurde, eine andere Analyse mit Sequenzen, die nur den Deltaproteobakterien zugeordnet werden können bzw. eine Analyse, die alle Sequenzen außer denen der Deltaproteobakterien beinhaltet hat.

Der Sequenzdatensatz jeder Genbank wurde auf eine Sequenz pro OTU reduziert. Mit den zu vergleichenden Sequenzdaten wurden in ARB Parsimony-Bäume gerechnet. Die Parsimony-Bäume wurden mit dem Programm „Treeclimber“ analysiert, um zu bestimmen, wie sehr sich die Genbanken voneinander unterscheiden und, ob die beobachtete Verteilung einzelner Sequenzen zwischen den unterschiedlichen

C Ergebnisse

Genbanken mit der Phylogenie korreliert. Für die Bestimmung des P-Wertes (Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Merkmale zufällig verteilt sind) wurden 10000 Zufallsbäume gerechnet. Ein P-Wert wurde als signifikant eingestuft, wenn 95% der Zufallsbäume einen höheren P-Wert (kumulative P-Wert kleiner als 0,05) als der zu analysierende Baum aufwies.

Tabelle C.3 Ergebnisse der Analysen mit dem Programm TreeClimber.

		P-Wert	Kumulativer P-Wert	Signifikanz
Genbanken ID 1 bis ID 11		0,0002	0,0151	+
Deltaproteobakterien der Genbanken ID 1 bis ID 11		0,0002	0,0069	+
Genbanken ID 1 bis ID 11 ohne Deltaproteobakterien		0,0004	0,0074	+
Genbank 1 (Anzahl der OTUs)	Genbank #2 (Anzahl der OTUs)			
ID 11 (28)	ID 1 (5)	0,7896	0,9998	-
ID 11 (28)	ID 2 (9)	0,1628	0,2055	-
ID 11 (28)	ID 3 (5)	0,0018	0,0028	+
ID 11 (28)	ID 4 (21)	0,0008	0,0027	+
ID 11 (28)	ID 5 (34)	0,0168	0,0333	+/-
ID 11 (28)	ID 9 (19)	0,0007	0,004	+
ID 11 (28)	ID 10 (16)	0,0285	0,0421	+/-
ID 7 (16)	ID 8 (13)	0,1405	0,2105	-
ID 3 (5)	ID 9 (19)	0,2508	0,2883	-
ID 4 (21)	ID 9 (19)	0,0085	0,0137	+

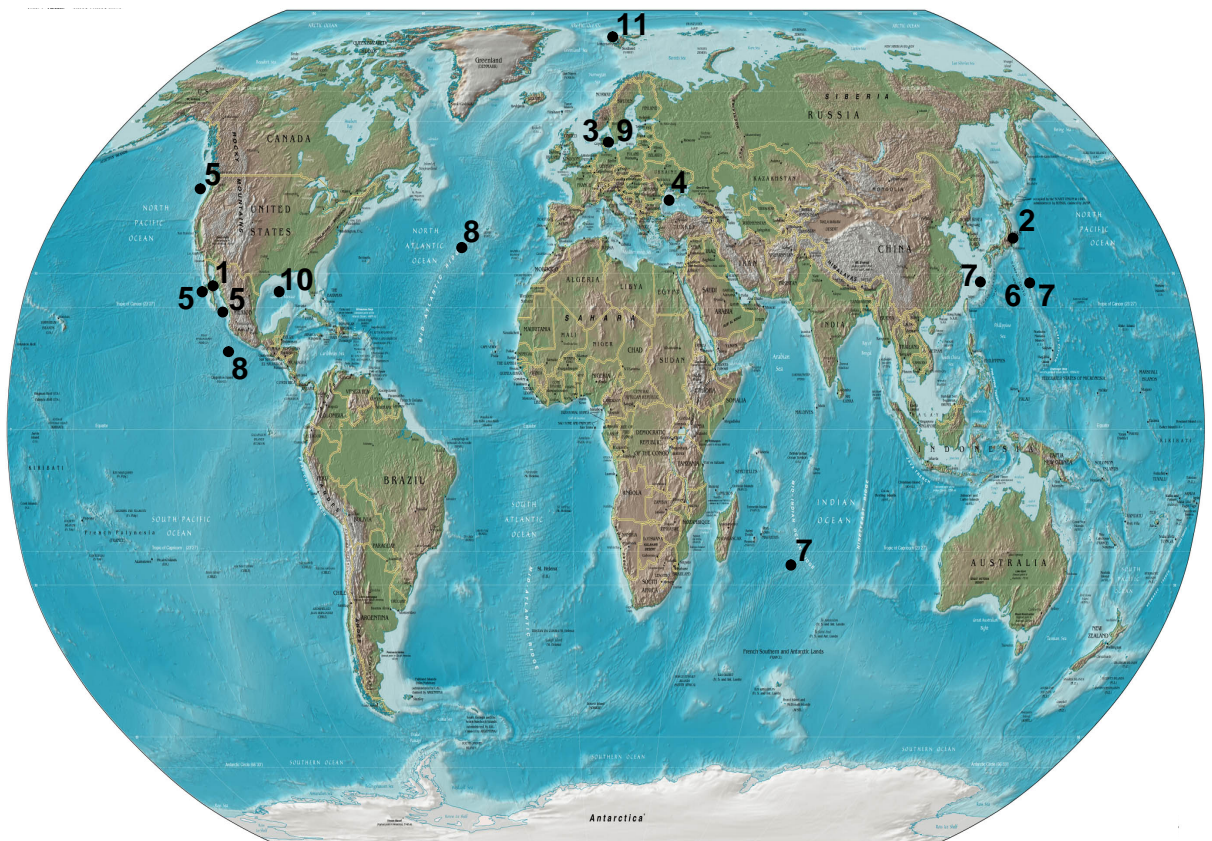


Abbildung C.9 Weltkarte mit den Orten von denen die Proben für die *dsrAB*-Genbanken ID 1 bis ID 11 gesammelt wurden. Die Ziffern geben die in dieser Arbeit zugeordneten ID an. Die Genbanken ID 6 und ID 7 wurden mit Sedimenten desselben Habitats erstellt. Die Sedimente der Genbanken ID 3 und ID 9 waren wenige Kilometer voneinander entfernt, die Auflösung der Karte erlaubt aber keine genauere Markierung.

C.4 Quantifizierungen in Station J

Die quantitative Verteilung von SRP innerhalb der obersten elf Zentimeter des Sediments von Station J sollte mittels Real-Time-PCR untersucht werden. Hierfür wurden zwei Primerpaare (B.5.4) entworfen, welche die OTU 12 bzw. eine übergeordnete monophyletische Gruppe (OTU 12, OTU 14-OTU 25) erfassen sollten (Tabelle B.10). Mit dem Primerpaar, das für die Quantifizierung der monophyletischen Gruppe eingesetzt wurde, konnte keine spezifische Amplifikation erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Für das OTU 12-spezifische Primerpaar konnten spezifische Bedingungen ermittelt werden (B.10). Nach der Primerevaluierung wurde mit dem Ultra Clean Soil Kit (B.3.1.1) DNS aus dem Sediment (Core C, Core B und Core A) extrahiert.

Die DNS-Konzentrationen der DNS-Extraktionen wurden mit dem Nanodrop Fluorometer vermessen (B.11). Mittels Real-Time-PCR wurde die Kopienzahl der 16S rRNS-Gene von *Bacteria* und *Archaea* und die *dsrA*-Gene von OTU 12 in den 1:100-Verdünnungen der DNS-Extraktionen bestimmt (B.11). Für die Quantifizierung der 16S-rRNS-Gene wurde das Primerpaar 1389Vs/1492R verwendet. Die PCR-Bedingungen waren mit denen der OTU 12 Real-Time-PCR ident mit dem Unterschied, dass eine Annealing-Temperatur von 52°C verwendet wurde.

Die Kopienzahl der *dsrA*-Gene von OTU 12 wurde pro ein Nanogramm DNS, pro ein g Sediment und relativ zur Gesamtanzahl der erfassbaren Mikroorganismen berechnet. Die Werte der DNS-Konzentrationsbestimmungen von den einzelnen Extrakten wichen bei unterschiedlichen Messungen stark voneinander ab, weshalb die Berechnung der Kopienzahl der *dsrA*-Gene von OTU 12 pro ein Nanogramm DNS als nicht zuverlässig angesehen wurde. Die Kopienzahlen der *dsrA*-Gene von OTU 12 pro ein Gramm Sediment weisen zwischen Berechnungen für Core B und Core C ebenfalls große Schwankungsbreiten auf (Daten im Anhang). Aus diesem Grund wurden nur Werte über die relative Häufigkeit der *dsrA*-Gene von OTU 12 in die Ergebnisse übernommen. Für die Berechnung wurde angenommen, dass eine prokaryotische Zelle im Durchschnitt 3,6 Kopien des 16S-rRNS-Gens (Klappenbach et al. 2001) und meistens nur eine Kopie der *dsrAB* (Klein et al. 2001; Klein 2004) enthält.

Die relative Häufigkeit von OTU 12 (1,5-2,9%) war in einer Tiefe von acht bis neun Zentimeter am größten. Ein zweiter Peak ist bei einer Tiefe von fünf bis sechs Zentimeter zu beobachten gewesen. Hier betrug die relative Häufigkeit 1,4-2,2%.

Tabelle C.4 Tabelle mit den relativen Häufigkeiten von OTU 12 im Sediment bei Station J.

Tiefe [cm]	Relative Häufigkeit in Core B [%]	Relative Häufigkeit in Core C [%]	Mittelwert der relativen Häufigkeiten [%]
1 cm	0,50%	0,36%	0,43%
2 cm	0,73%	0,71%	0,72%
3 cm	0,67%	0,41%	0,54%
4 cm	1,23%	0,68%	0,95%
5 cm	2,11%	1,09%	1,60%
6 cm	1,70%	1,43%	1,57%
7 cm	0,79%	1,01%	0,90%
8 cm	1,30%	1,55%	1,42%
9 cm	2,86%	1,04%	1,95%
10 cm	1,13%	1,12%	1,12%
11 – 15 cm	0,99%	0,86%	0,93%

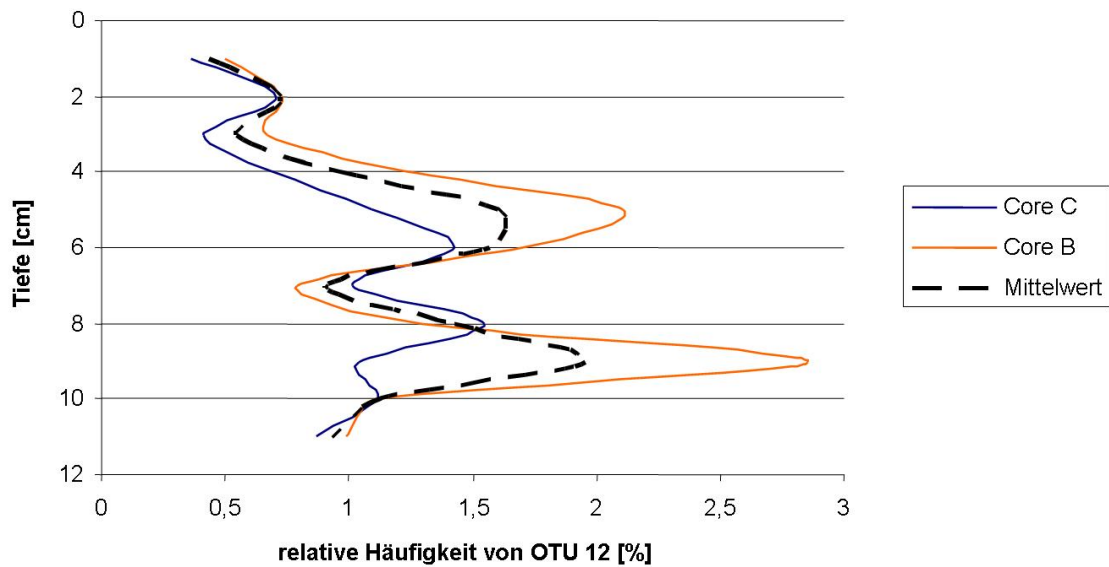


Abbildung C.10 Verteilung der OTU 12 im marinen Sediment an der Küste Spitzbergens bei Station J. Es wurden bei Station J zwei Proben genommen und analysiert (Core B und Core C). Die Kurven zeigen die relative Anzahl der *dsrA*-Fragmente von OTU 12 in den zwei Cores im Vergleich zu 3,6 16S-rRNS-Genen. Der Mittelwert, der aus den Daten der einzelnen Quantifizierungen berechnet wurde, ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Die mit der Real-Time-PCR erhaltenen Amplifikate wurden in einer Schmelzkurvenanalyse untersucht (B.10.5). Da keine Peaks bei Temperaturen unter 72°C zu verzeichnen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass keine Primerdimere gebildet wurden. Die Produkte der Real-Time-PCR wurden anschließend mit dem Topo TA Cloning Kit kloniert und sequenziert, um zu überprüfen, ob die Real-Time-PCR spezifisch das *dsrA*-Genfragment von OTU 12 amplifiziert hat. Die Sequenzanalyse ergab, dass die amplifizierten Real-Time-PCR-Produkte mehr als 90% Sequenzidentität zum *dsrA*-Fragment von OTU 12 hatten.

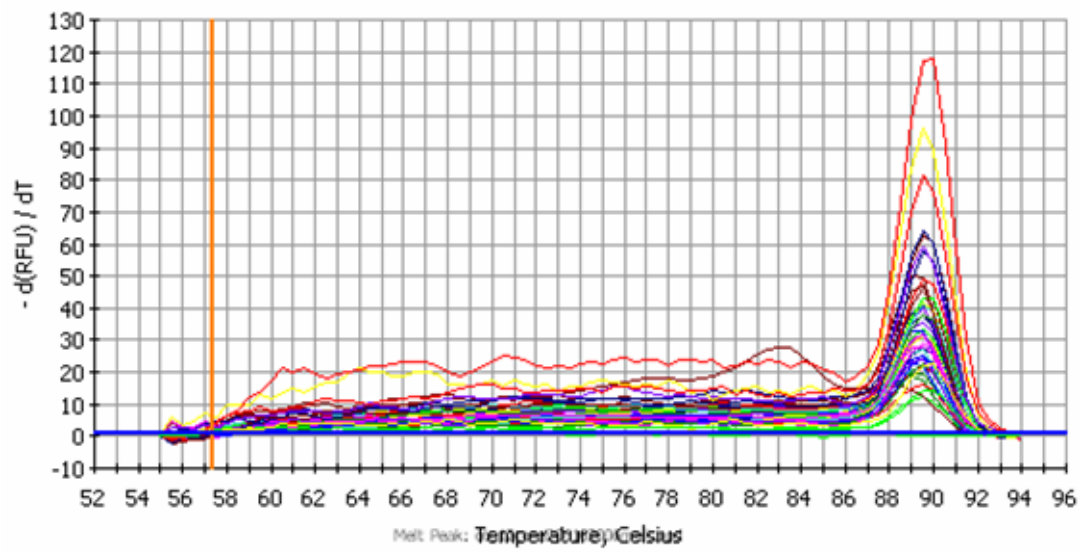


Abbildung C.11 Schmelzkurviendiagramm der Real-Time-PCR-Amplifikate mit den Standard-Matrizen und Umwelt-DNS. Die Signalabnahme des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green ($-d(\text{RFU})/dT$) ist abhängig von der Temperatur ($^{\circ}\text{C}$).

D Diskussion

D.1 Diversität der SRP in Svalbard Station J Sediment

Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Diversität von SRP im arktischen, marinen Sediment an der Küste von Spitzbergen ergänzen die bereits in anderen Publikationen gewonnenen Daten um eine *dsrAB*-Genbank (Knoblauch and Jørgensen 1999; Knoblauch et al. 1999; Knoblauch et al. 1999; Ravenschlag et al. 1999; Sahm et al. 1999; Ravenschlag et al. 2000; Ravenschlag et al. 2001; Finke et al. 2006; Vandieken et al. 2006; Vandieken et al. 2006; Vandieken et al. 2006). Die *dsrAB*-Genbank wurde von den ersten zehn Zentimetern des Sediments gewonnen und beinhaltet wahrscheinlich nicht alle *dsrAB*-Sequenzen von SRP in dem Sediment von Station J, da Sulfatreduktionsraten in anderen Sedimenten rund um die Küste Spitzbergens bis in eine Tiefe von 30 Zentimetern gemessen werden konnten (Knoblauch et al. 1999). Die Schätzung des Chao1-Estimator, dass in der Klonbibliothek neben den beobachteten 28 OTUs noch sieben zusätzliche zu erwarten gewesen wären, deckt sich näherungsweise mit der Coverageberechnung, die bei einer OTU-Definition von 90% Aminosäureähnlichkeit eine Coverage von 89,4% aufweist. Die Rarefaction-Analyse lässt ebenfalls darauf schließen, dass nicht alle OTUs in der Klonbibliothek erfasst wurden und dass mit weiterem Sequenzieraufwand nur wenige neue OTUs gefunden werden könnten. Die in dieser Studie erstellte *dsrAB*-Genbank weist im Vergleich zu anderen marinen Sediment-*dsrAB*-Genbanken die höchste Anzahl an OTUs auf. Eine *dsrAB*-Genbank, die von Sedimenten am Rand von zwei Kontinentalplatten erstellt wurde (Liu et al. 2003), weist zwar 34 OTUs auf, wurde allerdings aus DNS-Extraktionen von fünf Sedimentproben von unterschiedlichen Orten gewonnen. Somit steht für das Habitat bei Station J die bislang größte Menge an unterschiedlichen *dsrAB*-Sequenzinformationen zur Verfügung. In wieweit die Genbank allerdings die tatsächliche mikrobielle Diversität in dem Sediment erfasst, ist nicht abzuschätzen, da die statistischen Berechnungen nicht die „Evenness“ in Betracht ziehen.

Habitate mit Temperaturen unter vier Grad Celsius werden als extreme Habitate eingestuft. Da die Temperatur des Sediments von dem die *dsrAB*-Genbank gewonnen wurde 0,4°C aufweist und somit nur geringfügig über dem Gefrierpunkt von Wasser liegt, ist aus einem anthropozentrischen Gesichtspunkt die Bezeichnung als extremes Habitat gerechtfertigt. Frühere Studien an anderen extremen Habitaten mit einem hohen Salzgehalt (Martínez-Murcia 1995) bzw. niedrigen pH-Wert bei hoher Temperatur (Moyer et al. 1994) zeigten, dass diese extremen Habitate nur eine geringe bakterielle Diversität aufzuweisen hatten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde erwartet, dass in marinen Sedimenten mit Temperaturen unter vier Grad Celsius ebenfalls nur eine geringe bakterielle Diversität zu erwarten war. Ravenschlag zeigte allerdings, dass die Diversität im arktischen, marinen Sediment viel höher war als ursprünglich angenommen (Ravenschlag et al. 1999). Eine 16S-rRNS-Genbank, die von marinem Sediment an der Küste Spitzbergens erstellt wurde, enthielt über 40% an Sequenzen, welche den 16S-rRNS-Genen von kultivierten SRP ähnelten. Weiters konnte in slot-blot bzw. dot-blot-Hybridisierungen und mit FISH gezeigt werden, dass die Gruppe der Deltaproteobakterien im Sediment um die Küste Spitzbergens sehr abundant ist (Ravenschlag et al. 1999; Sahm et al. 1999; Sahm et al. 1999; Ravenschlag et al. 2001) und dass bis zu 70% der Sulfat Reduzierenden Bakterien (SRB) große Ähnlichkeit zu der Gruppe von *Desulfosarcina-Desulfococcus* haben.

D.1.1 Betrachtung der einzelnen OTUs der *dsrAB*-Genbank von Station J

Die *dsrAB*-Genbank von Station J weist sieben OTUs (OTU 1 bis OTU 7; 25% der OTUs) auf, die gemeinsam mit den *dsrAB*-Sequenzen von *Desulfosarcina* spp., *Desulfococcus* spp., *Desulfonema* spp., *Desulfobacterium* spp. *Desulfotignum* spp. *Desulfobacter* spp. und *Desulfobacillum* spp. in eine Gruppe fallen. Diese der Familie der *Desulfobacteraceae* zugehörigen Bakterien sind strikt anaerobe, chemoorganotrophe oder chemolithotrophe Organismen.

Die *Desulfobacteraceae* können eine Vielzahl von organischen Verbindungen als Elektronendonoren verwenden und vollständig oxidieren, was in Sedimenten, in denen eine diverse mikrobielle Gemeinschaft eine weite Palette an Kohlenstoffverbindungen

produziert, einen Vorteil im Vergleich zu auf ein Substrat beschränkte Organismen darstellt (Widdel 1980; Widdel 1988; Finster et al. 1997; Brandt et al. 1999; Galushko et al. 1999; Knoblauch et al. 1999; Widdel and Rabus 2001).

OTU 8 und OTU 9 sind aufgrund der geringen Sequenzidentität der *dsrAB* zu der *dsrAB* von kultivierten SRP phylogenetisch nicht näher zuordenbar. Die *dsrAB*-Sequenzen der OTU 8 gehört zu den Deltaproteobakterien, die der OTU 9 sind zu Vertretern der Phyla *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes* (manche *Desulfotomaculum* spp. und *Thermodesulfobacterium* spp. haben die *dsrAB* durch lateralen Gentransfer erhalten; (Klein et al. 2001)) und zu Vertretern der Ordnung der Deltaproteobakterien verwandt. Wegen des großen Sequenzunterschiedes der *dsrAB* ist nicht abschätzbar, ob es sich bei OTU 9 um ein Proteobakterium handelt oder um einen Vertreter aus einem anderen Phylum, der die *dsrAB* durch lateralen Gentransfer erhalten hat.

OTU 10 fällt gemeinsam mit der Familie der *Syntrophobacteraceae* in eine Gruppe. Bis jetzt wurden nur mesophile und thermophile Vertreter der Familie der *Syntrophobacteraceae* aus anoxischen, aquatischen Habitaten kultiviert. *Desulforhabdus amnigena* wurde aus dem Klärschlamm einer Abwasseranlage isoliert und kann sowohl H₂ als auch kurze Fettsäuren wie z.B.: Acetat als Elektronendonoren verwenden (Kuever et al. 2005). *Thermodesulforhabdus norvegica* wurde aus einem 70°C heißen Wassertank einer Ölplattform isoliert und kann unterschiedliche organische Säuren als Elektronendonoren verwenden. Wachstum mit Propionat, Format Butanol oder Propanol als Elektronendonoren konnte nicht beobachtet werden (Beeder et al. 1995). *Desulfacinum infernum* wurde aus dem Öl/Wasser-Gemisch der Gewinnungsanlage eines heißen Erdölfeldes isoliert, ist in der Lage autotroph zu wachsen, bildet keine Endosporen aus und ist unbeweglich. Als Elektronendonoren kann eine breite Palette von organischen Säuren und Alkoholen verwendet werden (Sievert and Kuever 2000; Rozanova et al. 2001). Es ist möglich, dass OTU 10 eine dormante Form innerhalb der thermo- und mesophilen *Syntrophobacteraceae* ist oder dass es Vertreter innerhalb dieser Familie gibt, die sich an kalte Habitats angepasst haben .

OTU 11 dürfte einen gemeinsamen Vorfahren mit den *Syntrophobacteraceae* gehabt haben, aber aufgrund des Fehlens von nah verwandten *dsrAB*-Sequenzen kultivierter *Syntrophobacteraceae* ist nicht ersichtlich, ob die OTU 11 zu dieser Familie gehört. Bahr hat *dsrAB*-Sequenzen aus einem Salzsumpf (AY741563; 89% Nukleinsäureähnlichkeit), Madrid (AY753126; 77% Nukleinsäureähnlichkeit), Tiquia (DQ966805; 89% Nukleinsäureähnlichkeit) und Klein (AY865327; 78% Nukleinsäureähnlichkeit) aus marinen Sedimenten erhalten, die die höchsten Ähnlichkeiten auf DNS-Ebene innerhalb der *dsrAB*-Genbank zur *dsrAB*-Sequenz von OTU 11 aufweisen, was darauf hindeutet, dass OTU 11 in aquatischen Lebensräumen zu finden ist.

OTU 13 ist phylogenetisch nicht einzuordnen, da weder verwandte *dsrAB*-Sequenzen von kultivierten noch von unkultivierten SRP zur Verfügung stehen. Falls die *dsrAB* nicht durch lateralen Gentransfer erhalten wurde, handelt es sich um ein Proteobakterium.

Die in dieser Arbeit erstellte Genbank wird von 16 OTUs (OTU 12, OTU 14 - OTU 28) dominiert, deren *dsrAB* nur eine geringe Ähnlichkeit zu der *dsrAB* von kultivierten SRP hat. Diese OTUs bilden eine monophyletisch Gruppe, obwohl die Diversität innerhalb dieser Gruppe sehr hoch ist. Aufgrund der hohen Diversität ist nicht vorherzusagen, ob diese 16 OTUs alle demselben Phylum zugeordnet werden können, da lateraler Gentransfer innerhalb dieser Gruppe möglich sein könnte. Die *dsrAB*-Gene könnten von noch unbekanntem Phylum oder Phyla von denen noch nicht bekannt ist, stammen. Es wäre auch möglich, dass die *dsrAB*-Sequenzen einem Phylum zugeordnet werden können von dem zwar bekannt ist, dass es Vertreter enthält, die Sulfat reduzieren können, aber die *dsrAB*-Sequenzen von Vertretern aus einer anderen Klasse stammen. Weitere Möglichkeiten wären, dass es sich um nicht mehr funktionelle Gene von ehemaligen SRP handelt, was aber aufgrund des intakten Leserahmens ungewöhnlich wäre, oder dass manche bekannte SRP mehr als eine Version der *dsrAB* besitzen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte aber nur in *Chlorobium tepidum* und *Pyrobaculum aerophilum* mehr als ein *dsrAB*-Gen pro Genom gefunden werden (Eisen et al. 2002; Fitz-Gibbon et al. 2002).

Die Erstellung einer Genbank mittels PCR und Klonierung ist systematischen Fehlern unterworfen (von Wintzingerode et al. 1997; Polz and Cavanaugh 1998). Trotzdem ähneln oft Werte über die relative Häufigkeit von OTUs in einer Genbank, die mit vielen Klonen vertreten sind, denen von FISH (Juretschko et al. 2002; Acinas et al. 2005). Aus diesem Grund ist es zulässig darüber zu spekulieren, dass OTU 12, OTU 14 bis OTU 28 auch quantitativ eine dominante Rolle in dem Habitat von Station J spielen.

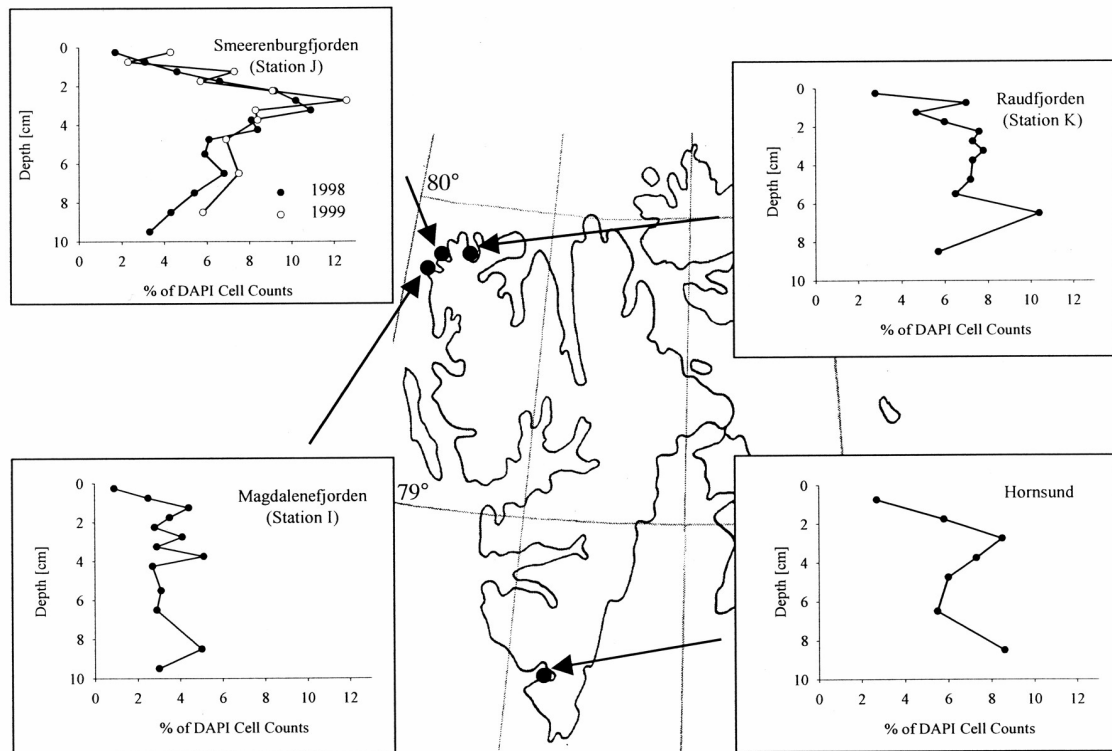


Abbildung D.1 Nachweis und Quantifizierung von der *Desulfosarcina-Desulfococcus*-Gruppe an verschiedenen Stellen entlang der Küste Svalbards (Grafik entnommen aus Ravenschlag et al., 2000)

Ravenschlag hat bei Hornsund an der Küste von Spitzbergen eine 16S-rRNS-Genbank von marinem Sediment erstellt. Aufgrund der kurzen Distanz und der ähnlichen Umweltbedingungen der Habitate bei Station J und Hornsund, ist es möglich, dass die mikrobiellen Gemeinschaften ähnlich zusammengesetzt sind. In der 16S rRNS-Genbank waren 50% der 16S-rRNS-Klonsequenzen Vertretern der Deltaproteobakterien zugehörig, 40% konnten Vertretern von Gammaproteobakterien zugeordnet werden, die meisten davon fielen in die Nähe von SOB. Andere 16S-rRNS-Gen-Studien haben ebenfalls die hohe Abundanz von Gammaproteobakterien, deren Sequenzen ähnlichen

denen von SOB sind, in marinen Sedimenten bestätigt (Bowman et al. 2000; Asami et al. 2005).

Die quantitative Dominanz von Klonen, die Vertreter der Deltaproteobakterien sind, ist sowohl in marinen 16S-rRNS- als auch *dsrAB*-Genbanken zu beobachten.

In den Arbeiten von Dhillon und Lloyd wurden 16S-rRNS- und *dsrAB*-Genbanken erstellt, die eine hohe Bedeutung von Vertretern mit tiefzweigenden *dsrAB*-Sequenzen und der Deltaproteobakterien im marinen Sediment suggerieren. (Dhillon et al. 2003; Lloyd et al. 2006) Deren 16S-rRNS-Genbanken enthielten allerdings nur wenige Klone von Vertretern der Gammaproteobakterien.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Proteobakterien und die Linie mit den tiefzweigenden *dsrAB*-Sequenzen eine wichtige Rolle im Sediment bei Station J spielen könnten. Wahrscheinlich werden in Zukunft die 16S-rRNS-Gene der Organismen mit diesen tiefzweigenden *dsrAB*-Sequenzen bestimmt werden können. Möglichkeiten, um dies zu erreichen, wären Genomsequenzierungen von unkultivierten Organismen, die Kultivierung von einem dieser SRP, „recognition of individual genes“-FISH (RING-FISH) in Verbindung mit einer Sequenzierung der 16S-rRNS-Gene oder BAC-Klonbanken mit DNS-Fragmenten, die sowohl *dsrAB*-Gene als auch 16S-rRNS-Gene enthalten.

D.1.2 Analyse mit dem SRP-PhyloChip

Die Ergebnisse der SRP-PhyloChip-Analyse bestätigen zum Teil die in der *dsrAB*-Genbank gewonnenen Daten. Das Vorkommen von *Desulfobacteraceae* im Sediment wurde sowohl durch die Genbank als auch durch die SRP-PhyloChip-Analyse suggeriert. Die 16S-rRNS-Gene der Familie der *Desulfobulbaceae* konnten mit dem SRP-PhyloChip identifiziert werden, in der Genbank waren aber keine *dsrAB*-Sequenzen enthalten, die *Desulfobulbaceae* zugeordnet werden konnten.

Zusätzlich wurden 16S-rRNS-Gene von *Desulfovibrio senezii* gefunden. In der Genbank waren keine *dsrAB*-Gene von Vertretern der *Desulfovibrionaceae* vorhanden. Alle mit dem SRP-PhyloChip identifizierten Organismen gehören der Klasse der Deltaproteobakterien an.

Positive Signale wurden auch mit anderen auf dem Chip gespotteten Sonden erhalten, aber aufgrund des hierarchischen Sondenkonzeptes können Sonden nur dann als verlässlich positiv angesehen werden, wenn, sowohl alle untergeordneten als auch übergeordneten Sonden, ein positives Signal geben. Der Grund für „falsche“ positive Signale kann unter anderem Kreuzhybridisierungen sein (Wu et al. 2005). Weiters kann es auch zu unspezifischen Hybridisierungen kommen, bei denen die Basenfehlpaarung zum Nicht-Zielorganismus am Rand der Sonde auftritt und deshalb ein „falsches“ positives Signal erscheint. Aufgrund der Tatsache, dass „falsche“ positive Signale bei Hybridisierungen möglich sind, können übergeordnete Sonden nicht als positiv betrachtet werden, wenn die untergeordneten Sonden nicht positiv sind, obwohl die Möglichkeit besteht, dass es sich um „echte“ positive Signale handelt.

Kultivierungsunabhängige Studien über die mikrobielle Diversität in marinen Sedimenten haben ergeben, dass viele Organismen in den Sedimenten vorhanden sind, die nur wenig verwandt mit bekannten, kultivierten Organismen sind (Rochelle et al. 1992; Devereux and Mundfrom 1994; Gray et al. 1999; Gray et al. 2000; Kato and Takai 2000). Da der SRP-PhyloChip hauptsächlich Sonden enthält, die kultivierte Organismen erfassen, und mit der Genbank gezeigt wurde, dass nur wenige *dsrAB*-Sequenzen in die Nähe von *dsrAB*-Sequenzen kultivierter SRP fallen, ist zu erwarten, dass mit dem SRP-PhyloChip nur ein kleiner Bruchteil der tatsächlichen mikrobiellen Diversität erfasst werden kann.

Die Möglichkeiten, die 16S-rRNS-PhyloChips bieten, sind viel versprechend, da mit einem einzigen Experiment innerhalb kurzer Zeit eine große Menge an Daten gesammelt werden kann. Allerdings stört die Tatsache, dass nur ein Bruchteil der aus Umweltproben isolierten 16S-rRNS-Genen große Ähnlichkeit mit den 16S-rRNS-Sequenzen von kultivierten Organismen hat und deshalb bei Analysen mit 16S-rRNS-PhyloChips ein großer Teil der Information über die mikrobiellen Diversität nicht erfasst wird. Ein weiterer problematischer Punkt beim SRP-PhyloChip besteht darin, dass mit dem Chip SRP erfasst werden sollen. Da es sich aber beim 16S-rRNS-Gen um kein funktionelles Markergen handelt, kann anhand der 16S-rRNS nicht abgeschätzt werden, ob der Organismus auch tatsächlich zur Sulfatreduktion befähigt ist. Deshalb ist es nur möglich, die 16S-rRNS-Gene von kultivierten SRP auf den Chip aufzutragen, um Informationen über SRP in einem Habitat zu erhalten.

D.1.3 Quantifizierung von OTU 12 im marinen Sediment

Bei der Real-Time-PCR handelt es sich zurzeit um die sensitivste Methode zur Quantifizierung von DNS. Neben ihrer universellen Einsetzbarkeit ist dies nur einer der Gründe weshalb diese Methode für eine Vielzahl von mikrobiologischen Studien hergenommen wurde (Hristova et al. 2000; Nogva et al. 2000; Suzuki et al. 2000; Takai et al. 2000; Gruntzig et al. 2001; Hermansson and Lindgren 2001; Hristova et al. 2001; Stults et al. 2001; Becker et al. 2002; Dionisi et al. 2002; Campbell and Wright 2003; Hristova et al. 2003; Kolb et al. 2003; Nogva et al. 2003; Panicker et al. 2004; Seurinck et al. 2005; Leloup et al. 2006).

Ein großer Nachteil im Vergleich zu anderen Quantifizierungsverfahren (zum Beispiel FISH) liegt darin, dass die ermittelten Zielmolekülzahlen keine absoluten Werte über die Häufigkeit der Zellen mit dem Zielmolekül liefern können, da erstens nur der relative Wert an Zielsequenzen anhand von Fluoreszenzeinheiten gemessen wird und zweitens während der PCR-Reaktion eine 100%ige Effizienz von Nöten wäre, was aber in der Praxis nicht möglich ist (Tichopad et al. 2003). Somit ist es nur möglich, in einer zweiten Real-Time-PCR die Anzahl der 16S-rRNS-Gene desselben DNS-Extrakts zu bestimmen, um dann auf die Zielmoleküle pro 16S-rRNS-Gene rückzurechnen. Da aber mikrobielle Genome zwischen einer und 15 Genkopien des 16S-rRNS-Gens aufweisen können, kann der in dieser Arbeit verwendete Wert von 3,6 16S-rRNS-Genen pro Genom zu einer nicht vernachlässigbaren Abweichung bei der Berechnung der relativen Häufigkeit von OTU 12 im Vergleich zu den realen Abundanz führen⁹.

Falls die zu OTU 12 zuordenbaren Organismen mehr als 3,6 16S-rRNS-Gene pro Genom haben, ist die relative Häufigkeit dieser OTU im Sediment höher, bei weniger 16S-rRNS-Gene pro Zelle ist der in dieser Arbeit angegebene Wert zu hoch.

Die Möglichkeit, dass OTU 12 mehr als ein *dsrAB*-Gen enthält, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall wäre die Abundanz der OTU 12 in dieser Arbeit überschätzt worden, da davon ausgegangen wurde, dass im Genom nur eine *dsrAB*-Kopie enthalten ist. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte aber nur in *Chlorobium tepidum* und *Pyrobaculum aerophilum* mehr als ein *dsrAB*-Gen gefunden werden (Eisen et al. 2002; Fitz-Gibbon et al. 2002).

⁹ <http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/index.php>

Ravenschlag hat gezeigt, dass im Sediment bei Station J die Gruppe *Desulfosarcina-Desulfococcus* eine große Rolle spielt. Interessanterweise ist die mit FISH und rRNS slot blot Hybridisierungen gemessene Abundanz (acht bis zwölf Prozent der mit DAPI gezählten Zellen) dieser Gruppe in einer Tiefe zwischen zwei bis vier Zentimeter am höchsten (Ravenschlag et al. 2000). Da die höchste Sulfatreduktionsraten (SRR) aber in einer Tiefe von sieben Zentimeter gemessen wurde, scheint anderen SRP eine größere Bedeutung bei der Reduktion von Sulfat zuzukommen.

In einer anderen Arbeit hat Ravenschlag ebenfalls die vertikale Verbreitung von

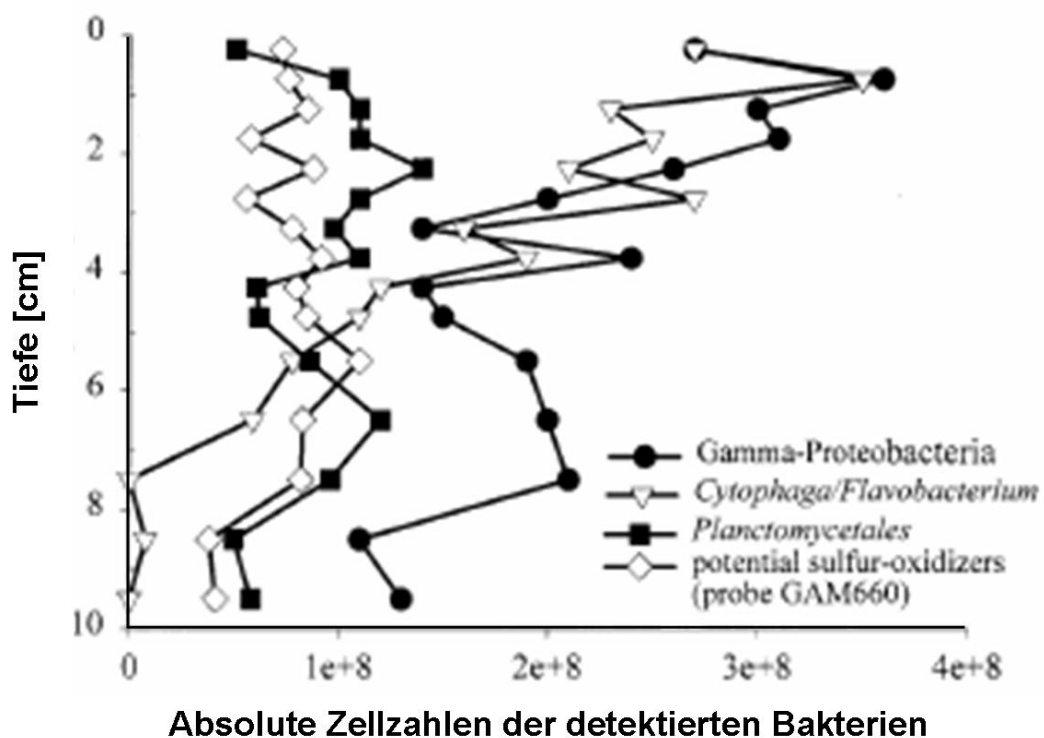


Abbildung D.2 Das vertikale Profil mit den absoluten Zellanzahlen der detektierten Bakterien. Es ist der Mittelwert von zwei parallelen Sedimentkernen gezeigt. (Grafik aus Ravenschlag 2001 übernommen)

Bakterien im Sediment bei Station J untersucht (Ravenschlag et al. 2001). Ihre Arbeit bestätigte die hohe Abundanz der Deltaproteobakterien in marinen Sedimenten. Weiters zeigte sie, dass die Abundanz der bekannten Bakterien mit größerer Tiefe abnimmt. Eine Ausnahme stellen die Gammaproteobakterien und *Planctomycetales* dar, deren Häufigkeit in einer Tiefe zwischen fünf bis acht Zentimeter wieder zunimmt (Abbildung D.2). Aus den Ergebnissen der Arbeiten von Ravenschlag lässt sich schließen, dass über

die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den marinen Sedimenten bei Station J mit über fünf Zentimeter Tiefe relativ wenig bekannt ist.

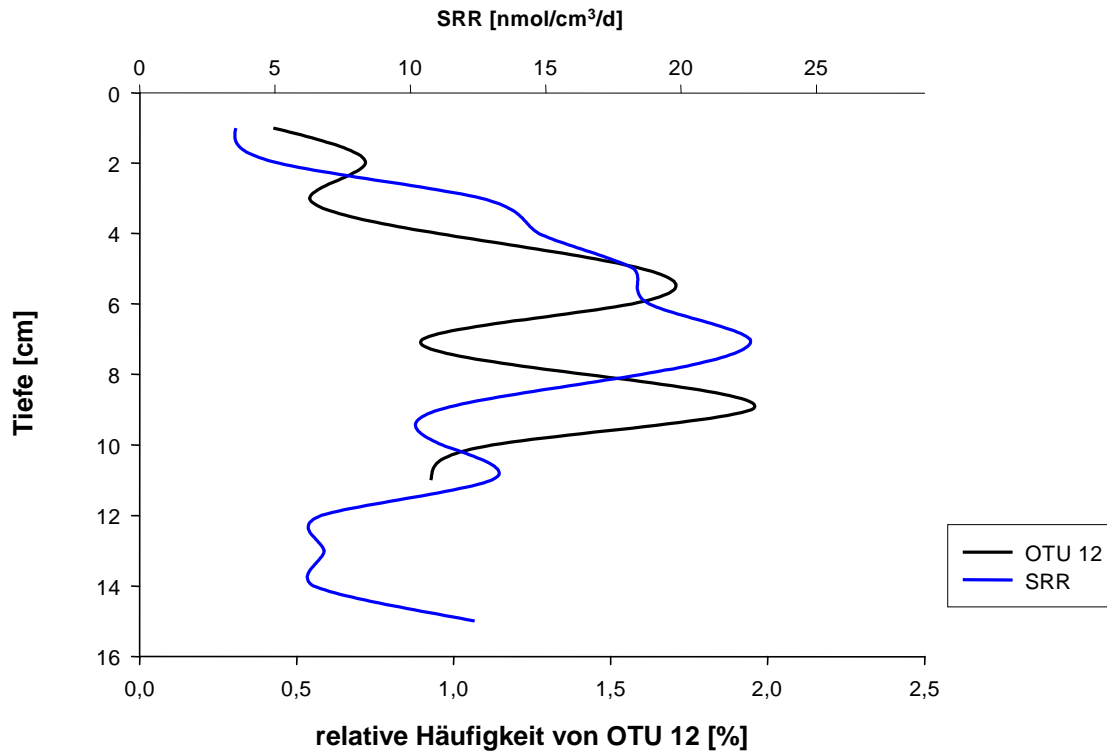


Abbildung D.3 Verteilung der OTU 12 im marinen Sediment an der Küste Spitzbergens bei Station J. Die Sulfatreduktionsrate im Sediment bei Station J wurde ebenfalls gemessen (Robador, nicht publiziert). Die Kurve zeigt den Mittelwert der relativen Anzahl der *dsrA*-Fragmente von OTU 12 im Vergleich zu 3,6 16S-rRNS-Genen.

Die Verteilung von OTU 12 im marinen Sediment scheint ungewöhnlich, da die relative Häufigkeit in zwei unterschiedlichen Tiefen besonders hoch zu sein scheint. Da diese Verteilung sowohl in Core B als auch Core C zu beobachten war, wird davon ausgegangen, dass es sich bei den zwei Peaks um kein experimentell verursachtes Phänomen handelt. Die Organismen, die sich OTU 12 zuordnen lassen, könnten aufgrund ihrer signifikanten Abundanz (bis zu zwei Prozent) eine wichtige Rolle in dem Habitat bei Station J spielen. Wieso die relative Häufigkeit von OTU 12 gerade in der Tiefe (sieben Zentimeter) bei der die höchsten SRR gemessen wurden, stark zurück geht, ist mit den vorhandenen Daten nicht zu erklären und stellt eine Fragestellung für zukünftige Studien dar. Eine Erklärung dürfte sein, dass in sieben Zentimeter Tiefe besser angepasste Organismen OTU12 verdrängen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass

um die Tiefe von sieben Zentimetern Organismen mit einer relativ hohen Kopienzahl von 16S-rRNS-Genen leben. Dies würde den Wert für die relative Häufigkeit von OTU 12 stark beeinflussen, da dieser über die Quantifizierung der 16S-rRNS-Gene in den einzelnen Sedimentschichten bestimmt wurde. Die Nischenbildung und Spezialisierung von OTU 12 auf bestimmte Sulfatkonzentrationen wäre eine weitere Option, die die gewonnenen Daten erklären könnten.

D.2 Analyse der *dsrAB*-Genbanken von marinen Sedimenten

D.2.1 Betrachtung der ausschließlich aus marinen Sedimenten isolierten OTUs

Der NJ-Baum in Abbildung C.8 zeigt, dass alle *dsrAB*-Genbanken außer **ID 6** (nur zwei OTUs, Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004a) und **ID 8** (Hydrothermalquelle, Nercessian et al. 2005) *dsrAB*-Sequenzen enthalten, die Vertretern der *Desulfobacteraceae* zugeordnet werden können. Drei OTUs, die alle in der Nähe von *Desulfosarcina* spp. fallen, konnten in mehr als einer *dsrAB*-Genbank gefunden werden. OTU A und OTU C enthalten jeweils drei Klone aus unterschiedlichen Genbanken, OTU B nur zwei. Jede dieser drei OTUs enthält Klone aus Genbanken, die von Sedimenten aus unterschiedlichen Tiefen erstellt wurden. Gemeinsamkeiten sind bis auf eine Ausnahme (**ID 7**; Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004b) die Temperatur (weniger als vier Grad Celsius), welche die Habitate hatten. Für die Genbank **ID 7** wurde Sediment entlang eines Temperaturgradienten von 250°C bis 311°C genommen.

Die bereits weiter oben diskutierten metabolischen Fähigkeiten der *Desulfobacteraceae* in marinen Sedimenten, dürften die Erklärung dafür sein, wieso in allen *dsrAB*-Genbanken, die von marinen Sedimenten mit Temperaturen unter 50°C gewonnen wurden, *dsrAB*-Sequenzen gefunden wurden konnten, die sich der Familie der *Desulfobacteraceae* zuordnen lassen (**ID 1 - ID 5**, **ID 9 - ID 11**). 16S-rRNS-Genbanken bestätigen das Vorhandensein von *Desulfobacteraceae* in marinen Habitaten (Rooney-Varga et al. 1998; Edgcomb et al. 1999; Sahm et al. 1999; Urakawa et al. 1999; Asami et al. 2005; Musmann et al. 2005). Über den Genus *Desulfosarcina* lässt sich sagen,

dass bis jetzt keine thermophilen Spezies beschrieben wurden. Hohe Salzkonzentrationen (10 g/l NaCl, 2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) und anoxische Bedingungen sind für das Wachstum in Kultur notwendig. Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden. Der Stoffwechsel der Bakterien ist sehr variabel, da Sulfat und andere oxidierte Schwefelverbindungen als Elektronenakzeptor verwendet werden können, bei deren Fehlen aber Laktat, Pyruvat, Acetat, und Propionat fermentiert werden können. Den Bakterien steht auch eine breite Palette an Elektronendonoren zur Verfügung: Format, Acetat, Propionat, Fett- und andere organische Säuren, Alkohole, aromatische Verbindungen und H_2 (Widdel 1980; Widdel 1988; Finster et al. 1997; Brandt et al. 1999; Galushko et al. 1999; Knoblauch et al. 1999; Widdel and Rabus 2001).

Vertreter der Ordnung der *Desulfovibrionales* sind in den marinen *dsrAB*-Genbanken nur mit einer OTU (AF360671) in einer Genbank (**ID 3**; 4°C, Joulian et al. 2001) vertreten, obwohl die *Desulfovibrionales* aus fast allen aquatischen inklusive marinen Habitaten isoliert werden konnten. Bis 2004 waren nur strikt anaerobe kultivierte Vertreter in Habitaten mit Temperaturen über 15°C bekannt (Kuever et al. 2005). 2006 konnte Vandieken zwei psychrotolerante Bakterien der Gattung *Desulfobacterium* aus den permanent kalten Sedimenten an der Küste Spitzbergens beschreiben die noch bei Temperaturen von minus zwei Grad Celsius wachsen können (Vandieken et al. 2006). Zwei Gründe wieso nur in einer *dsrAB*-Genbank *Desulfovibrionales* zu finden sind, könnten sein, dass entweder die verwendeten *dsrAB*-Primer die *dsrAB*-Gene der in den Sedimenten vorhandenen *Desulfovibrionales* nicht erfassen oder die Abundanz von Vertretern dieser Ordnung in den Sedimenten nur sehr gering ist.

Um die *dsrAB*-Sequenz von *Desulfobacterium anilini* dürfte es einen weiteren marinen Sediment-Cluster von *dsrAB*-Sequenzen geben. Alle kultivierten Vertreter, die Ähnlichkeiten zu *Desulfobacterium anilini* haben, wurden aus marinen Sedimenten isoliert und können ein breites Spektrum an organischen Verbindungen als Elektronendonoren verwenden. Die Einteilung von *Desulfobacterium anilini* innerhalb des Genus *Desulfobacterium* müsste überdacht werden, da 16S-rRNS- und *dsrAB*-Sequenzanalysen darauf hindeuten, dass es sich bei dem Bakterium um eine neue

Familie oder neuen Genus innerhalb der Deltaproteobakterien handeln könnte (Loy et al. 2003; Zverlov et al. 2005). Drei *dsrAB*-Genbanken (**ID 3**; 4°C, Joulian et al. 2001; **ID 4**; <4°C, Leloup et al. 2006; **ID 10**; ~6°C, Lloyd et al. 2001) enthalten Sequenzen, die in die Nähe von *Desulfobacterium anilini* fallen.

Eine *dsrAB*-Sequenz (AY197448) von nur einer Genbank (**ID 1**; 3°C-140°C, Dhillon et al. 2003) fällt in den Cluster der *Firmicutes Desulfotomaculum spp. und Moorella spp.*, welche die *dsrAB* durch lateralen Gentransfer erhalten haben. Es wird vermutet, dass der Donor dieses lateral vererbten *dsrAB*-Gens entweder eine unbekannte Linie der SRP ist oder dass es sich um einen Vorfahren von *Desulfobacterium anilini* handeln könnte. In *dsrAB*-Bäumen haben diese grampositiven Bakterien und *Desulfobacterium anilini* einen monophyletischen Ursprung (Zverlov et al. 2005). *Desulfotomaculum* Spezies können viele organische Moleküle als Substrat während der Sulfatreduktion hernehmen. Bei der Abwesenheit von Sulfat können sie auch durch Fermentation Energie gewinnen. Vandieken konnte *Desulfotomaculum arcticum* aus permanent kalten Sedimenten an der Küste von Spitzbergen isolieren, obwohl kein Wachstum bei Temperaturen von unter 26°C beobachtet werden konnte (Vandieken et al. 2006). Da *Desulfotomaculum* Spezies Sporen ausbilden können, dürften sie in kalten Habitaten nur überleben. Bis jetzt konnten nämlich nur meso- und thermophile Spezies isoliert werden, was der Grund dafür sein dürfte, dass bis jetzt nur eine *dsrAB*-Sequenz in Genbanken von kalten, marinen Sedimenten gefunden werden konnte.

Die Familie der *Desulfobulbaceae* ist eine was ihren Stoffwechsel betrifft sehr diverse Gruppe, die chemoorganotrophe, chemolithoheterotrophe oder chemolithoautotrophe Vertreter enthalten kann. Als Elektronenakzeptor wird meistens Sulfat (Ausnahme *Desulfocapsa sulfexigens*), Sulfit oder Thiosulfat (Ausnahme *Desulfofustis spp.*) verwendet (Kuever et al. 2005). Manche Vertreter dieser Familie können auch elementaren Schwefel reduzieren. Einfache organische Verbindungen wie langkettige Fettsäuren und Alkohole werden als Elektronendonoren verwendet. Wachstum mittels Disproportionierung von Schwefel kann ebenfalls vorkommen (Finster et al. 1998). Bis jetzt konnten nur meso- und psychrophile *Desulfobulbaceae* isoliert werden. Die Isolate stammen aus Salz-, Brack- und Süßwasser-Habitaten (Kuever et al. 2005).

dsrAB-Sequenzen, die dieser Familie zugeordnet werden können, konnten in vier Genbanken identifiziert werden. Interessanterweise stammen die meisten *dsrAB*-Sequenzen aus Genbanken, die von marinen Hydrothermalquellen gemacht wurden, was bedeuten könnte, dass auch hyperthermophile Vertreter vorhanden sein könnten. OTU D konnte in zwei unterschiedlichen Genbanken (**ID 7**; Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004b; **ID 8**; Hydrothermalquelle, Nercessian et al. 2005) beobachtet werden. Trotz meso- und psychrophiler Isolate, aber fehlender Thermophiler, scheint aufgrund der Datenbank-Analyse die Familie der *Desulfobulbaceae* nur eine untergeordnete Rolle in kalten, marinen Sedimenten zu spielen. Ob dies an ungeeigneten Primern zur Detektion dieser Familie liegt, oder ob diese Familie tatsächlich nur spärlich in kalten, marinen Sedimenten vorhanden ist, ist mit den vorhandenen Daten nicht zu klären.

Die *dsrAB*-Sequenzen des Phylums *Thermodesulfobacteria* und der Deltaproteobakterien weisen eine höhere Ähnlichkeit als deren rRNS-Gene auf. Dies deutet darauf hin, dass die *Thermodesulfobacteria* das *dsrAB*-Gen durch lateralen Gentransfer erhalten haben (Klein et al. 2001). *Thermodesulfobacterium* spp. wurden aus Habitaten mit hohen Temperaturen isoliert und sind chemoorganotrophe oder chemolithoautotrophe Organismen. Drei marine *dsrAB*-Genbanken (alle Hydrothermalquellen; **ID 6**, **ID 7**, **ID 8**) enthalten Sequenzen, die gemeinsam mit den *dsrAB*-Sequenzen von *Thermodesulfobacterium* spp. in eine Gruppe fallen. OTU E konnte in allen drei Genbanken beobachtet werden. Es scheint, dass diese Vertreter sich über große Entfernungen ausbreiten konnten, was in weiterer Folge bedeuten könnte, dass einige Spezies in vielen, weit voneinander entfernten Hydrothermalquellen weltweit anzutreffen wären.

Vertreter der Ordnung *Syntrophobacterales* lassen sich in fünf marinen *dsrAB*-Genbanken finden (**ID 1**; 13°C-140°C, Dhillon et al. 2003; **ID 4**; <4°C, Leloup et al. 2006; **ID 7**; **ID 10**; ~6°C, Lloyd et al. 2001; **ID 11**; 0,4°C, Barisic, diese Arbeit). OTU F konnte in drei Genbanken (**ID 1**, **ID 10**, **ID 11**) beobachtet werden, die Temperaturen unter 6°C aufweisen, allerdings aus unterschiedlichen Tiefen stammen. Viele Vertreter der *Syntrophobacterales* sind neben der Sulfatreduktion auch zur Fermentation befähigt. Einfache organische Moleküle werden als Elektronendonoren verwendet (Kuever et al.

2005). Auch hier scheint es sich um eine sehr wichtige Ordnung von Bakterien in marinen Sedimenten zu handeln.

Die bereits weiter oben diskutierte tiefzweigende *dsrAB*-Linie, der keine kultivierten Organismen zugeordnet werden können, ist in marinen *dsrAB*-Genbanken sehr abundant. Abgesehen von den *dsrAB*-Genbanken von Hydrothermalquellen (**ID 6**, **ID 7**, **ID 8**) und den Genbanken **ID 3** (4°C, Joulian et al. 2001) und **ID 4** (<4°C, Leloup et al. 2006), enthalten alle anderen *dsrAB*-Genbanken von marinen Sedimenten Sequenzen, die in diese Linie fallen. Wenn man die *dsrAB*-Sequenzen der OTUs der Hydrothermalquellen weglässt, enthält diese Linie 58 der 126 OTUs, die im Rahmen von *dsrAB*-Genbanken definiert wurden. Fünf OTUs, die in mehr als einer *dsrAB*-Genbank gefunden wurden, lassen sich innerhalb dieser tiefzweigenden Gruppe definieren. OTU G enthält *dsrAB*-Sequenzen aus vier unterschiedlichen Genbanken (**ID 1**; 13°C-140°C, Dhillon et al. 2003; **ID 5**; ~5°C, Liu et al. 2003; **ID 10**; ~6°C, Lloyd et al. 2001; **ID 11**; 0,4°C, Barisic, diese Arbeit), OTU H wurde in drei Genbanken gefunden (**ID 1**; 13°C-140°C, Dhillon et al. 2003; **ID 2**; <4°C, Fukuba et al. 2003; **ID 5**; ~5°C, Liu et al. 2003) und OTU I (**ID 10**; ~6°C, Lloyd et al. 2001, **ID 11**; 0,4°C, Barisic, diese Arbeit), OTU J (**ID 2**, **ID 10**) und OTU K (**ID 10**, **ID 11**) in jeweils zwei.

Insgesamt betrachtet dürfte diese Linie eine wichtige Rolle in marinen Sedimenten spielen, da sie in so vielen Studien nachgewiesen werden konnte. In zukünftigen Arbeiten sollte es ein Ziel sein, diese Gruppe phylogenetisch einzuordnen und falls möglich zu kultivieren.

Eine zweite tiefzweigende Linie von *dsrAB*-Sequenzen, der keine *dsrAB*-Gene von kultivierten Organismen zugeordnet werden können, kann in drei Genbanken (**ID 4**; <4°C, Leloup et al. 2006; **ID 5**, **ID 9**; 5,4°C, Thomsen et al. 2001) gefunden werden. Dieser tiefzweigende Cluster fällt in die Nähe von grampositiven, sporenbildenden *Bacteria*, wie *Desulfotomaculum* spp., *Desulfosporosinus* spp., *Pelotomaculum* spp. und *Carboxydotherrmus* spp. und enthält OTU L, die in zwei *dsrAB*-Genbanken gefunden werden konnte.

In der Nähe von *Archaeoglobus* spp. lassen sich OTU M und OTU N finden, die ebenfalls nur in marinen Sedimenten zu finden sind. Beide enthalten jeweils zwei *dsrAB*-Sequenzen von den Genbanken der Hydrothermalquellen **ID 7** (Nakagawa et al. 2004b) und **ID 8** (Nercessian et al. 2005). Frühere Studien haben ergeben, dass die Gattung *Archaeoglobus* die *dsrAB*-Gene durch lateralen Gentransfer erhalten haben (Klein et al. 2001). Die dem Phylum der *Euryarchaeota* zugeordneten hyperthermophilen *Archaea* wurden aus geothermalen marinen Sedimenten isoliert und sind strikt anaerob. Chemolithoautotrophes und chemoorganotrophes Wachstum sind möglich.

D.2.2 Analyse der marinen *dsrAB*-Genbanken mit Treeclimber

Um mikrobielle Gemeinschaften zu beschreiben, hat Martin vorgeschlagen einen Parsimony-Test (P-Test) durchzuführen, der die mikrobielle Diversität zweier Genbanken bewerten kann (Martin 2002). Dazu adaptierte er die Nullhypothese einer von Maddison und Slatkin entwickelten statistischen Methode. Die modifizierte Nullhypothese besagt, dass die beobachteten phylogenetischen Unterschiede durch die Anhäufung von zufälligen Variationen zustande gekommen sind und dass die analysierten Gemeinschaften aus einer gemeinsamen Vorläufergemeinschaft evolviert sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten P-Tests sind einigen systematischen Fehlern unterworfen. Zum einen wurden die *dsrAB*-Genbanken mit fünf unterschiedlichen Primersets entworfen, die auch eine unterschiedliche Diversität erfassen. Genbank **ID 1** (13°C-140°C, Dhillon et al. 2003) **ID 3** (4°C, Joulain et al. 2001) **ID 6** (Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004a) **ID 8** (Hydrothermalquelle, Nercessian et al. 2005) und **ID 9** (5,4°C, Thomsen et al. 2001) wurden mit den von Wagner publizierten Primern erstellt (Wagner et al. 1998). Für die Genbanken **ID 4** (<4°C, Leloup et al. 2006) und **ID 7** (Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004b) wurden degenerierte Varianten der von Wagner erstellten Primer verwendet (Klein et al. 2001). Karkhoff-Schweizer hat die Primer für die Genbanken **ID 2** (<4°C, Fukuba et al. 2003) und **ID 5** (~5°C, Liu et al. 2003) entworfen (Karkhoff-Schweizer et al. 1995). Die Genbanken **ID 10** (~6°C, Lloyd et al. 2001) und **ID 11** (Tabelle B.4) wurden ebenfalls mit zwei jeweils unterschiedlichen Primersets erstellt.

Die Verwendung von unterschiedlichen Primern führte aber nicht nur zur Erfassung von unterschiedlichen Organismen, sondern auch zu unterschiedlich langen PCR-Amplifikaten, die sich aus diesem Grund bei fehlender Überlappung nicht untereinander vergleichen lassen. So lassen sich keine auf Distanzmatrizes basierenden Baumrechnungsverfahren durchführen, da bei geringer bzw. fehlender Überlappung keine zuverlässigen Distanzwerte berechnet werden können. Deshalb wurden mit den langen *dsrAB*-Sequenzen Parsimony-Bäume auf Nukleinsäurebasis berechnet und die kurzen Sequenzen mit dem „Parsimony Interactive“-Tool eingerechnet (B.8.5). Die resultierenden Parsimony-Bäume wurden ausschließlich für die P-Tests hergenommen, obwohl unterschiedliche Baumberechnungsverfahren zu untereinander abweichenden P-Werten führen können (Schloss and Handelsman 2006).

Ein weiteres Problem beim Vergleich der Genbanken lag darin, dass in manchen Genbanken die *dsrAB*-Sequenzen nach der Sequenzierung nicht korrektur gelesen wurden, sondern gleich für die Analyse herangezogen wurde. Dadurch kann eine durch Sequenzierfehler bedingte höhere Diversität suggeriert werden, die sich auf die nachfolgende statistische Auswertung auswirkt.

Mit dem P-Test kann auch der Einfluss einzelner Umweltparameter auf die mikrobielle Diversität untersucht werden. Martin hat die Auswirkungen von Dünger auf die mikrobielle Gemeinschaft eines Bodens analysiert (Martin 2002). Ein Grund die P-Tests in meiner Arbeit durchzuführen war um die Frage zu klären ob Druck und Temperatur die Gemeinschaft der SRP in marinen Sedimenten beeinflussen. Die Menge der in den *dsrAB*-Genbanken abgelegten Sequenzen dürfte aber nicht ausreichen, um statistisch signifikante Aussagen bezüglich des Einflusses von Temperatur und Druck zu erhalten. Genbanken aus Habitaten, bei denen aufgrund ihrer Geographie oder Anzahl an gemeinsamen OTUs zu erwarten war, dass der P-Test insignifikant sein könnte, wurden analysiert. Diese Auswertungen ergaben, dass sich die Genbanken auch von Habitaten mit ähnlichen Tiefen und Temperaturen voneinander unterscheiden. Ob dies durch experimentell verursachte Variationen, wie zum Beispiel unterschiedliche Primersets, Coverage-Werte, Zeitpunkt der Probenahme, etc., bedingt ist oder ob sich die mikrobiellen Gemeinschaften tatsächlich unterscheiden, konnte nicht geklärt werden.

Weiters wurde untersucht, wie groß die Unterschiede aller bis jetzt publizierten marinen *dsrAB*-Genbanken (**ID 1** bis **ID 11**) zueinander sind und ob die, in den marinen Sedimenten erfassbare Gemeinschaft der SRP, sich aus einer gemeinsamen Vorläufergemeinschaft entwickelt hat. Der P-Test dieser Analyse war signifikant, was bedeutet, dass sich die Sequenzen in den Genbanken stark voneinander unterscheiden. Da es möglich ist auch Untergruppen innerhalb von Genbanken mit dem P-Test zu analysieren, wurden auch die *dsrAB*-Sequenzen der Deltaproteobakterien bzw. alle *dsrAB*-Sequenzen exklusive der Deltaproteobakterien untersucht. Beide Analysen ergaben signifikante P-Werte. Aufgrund der geringen Anzahl an OTUs (acht Genbanken beinhalten weniger als 20 OTUs), die in den *dsrAB*-Genbanken vertreten sind, ist die statistische Aussagekraft dieser Meta-Analysen nicht besonders hoch. Trotzdem deuten die Daten darauf hin, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften der SRP in den einzelnen Habitaten stark voneinander unterscheiden.

Die in dieser Arbeit erstellte Genbank (**ID 11**) wurde mit jeder bis jetzt publizierten marinen *dsrAB*-Genbank (exklusive Genbanken von Hydrothermalquellen) verglichen. Die Analyse mit den Genbanken **ID 1** (fünf OTUs; 13°C-140°C, Dhillon et al. 2003) und **ID 2** (neun OTUs; <4°C, Fukuba et al. 2003) führte zu einem insignifikanten P-Wert. Hier muss aber erwähnt werden, dass es aufgrund der geringen Anzahl an OTUs nicht möglich ist, zu sagen, dass die Genbanken homogen sind. Der P-Wert in den Analysen mit allen anderen Genbanken **ID 3** (4°C, Joulian et al. 2001) bis **ID 10** (~6°C, Lloyd et al. 2001) war signifikant, obwohl die P-Werte bei der Analyse mit den Genbanken **ID 5** (~5°C, Liu et al. 2003) und **ID 10** (~6°C, Lloyd et al. 2001) die Grenzwerte zwischen Signifikanz/Insignifikanz darstellen. Dies bedeutet, dass sich die in dieser Arbeit erstellte *dsrAB*-Genbank von fast allen marinen *dsrAB*-Genbanken stark unterscheidet. Da die Orte, von denen die Proben genommen wurden, nicht ausreichend untersucht und dokumentiert wurden, kann der Einfluss der Standortunterschiede, wie Salzkonzentration, Bodeneintrag, Entfernung zum Festland, chemische Zusammensetzung des Bodens, Wasserströmungen, etc. neben den experimentellen Unterschieden für die Heterogenität der Genbanken verantwortlich sein.

Die Analyse der Genbanken **ID 7** (Hydrothermalquelle, Nakagawa et al. 2004b) und **ID 8** (Hydrothermalquelle, Nercessian et al. 2005) weist einen insignifikanten P-Wert auf. Da die Anzahl an OTUs in beiden Genbanken etwa gleich groß ist, sind die Genbanken statistisch gut miteinander vergleichbar. Da in beiden Genbanken zusätzlich vier gemeinsame OTUs zu finden sind (OTU D, OTU E, OTU M und OTU N) kann der Nullhypothese widersprochen und festgestellt werden, dass die Habitate der Genbanken **ID 7** und **ID 8** eine gemeinsame mikrobielle Vorläufergemeinschaft hatten.

Die Genbanken **ID 3** und **ID 9** (5,4°C, Thomsen et al. 2001) wurden ebenfalls mit dem P-Test verglichen. Aufgrund der großen Nähe der Habitate, aus denen die Sedimente für die Genbanken entnommen wurden, scheint die Insignifikanz des P-Wertes nicht überraschend. Leider sind statistische Analysen mit der Genbank **ID 3** aufgrund der geringen Anzahl an OTUs (fünf OTUs) nur wenig aussagekräftig. Trotzdem wird an dieser Stelle spekuliert, dass die mikrobiellen Gemeinschaften in den Habitaten dieser Genbanken aus einer gemeinsamen Vorläufergemeinschaft evolviert sind.

Die Genbanken **ID 4** (<4°C, Leloup et al. 2006) und **ID 9**, die drei gemeinsame OTUs aufweisen, wurden ebenfalls mit dem P-Test analysiert. Der P-Wert war signifikant, was bedeutet, dass ein Großteil der in den Genbanken vertretenen *dsrAB*-Sequenzen keine gemeinsamen Vorläufer hatte, bzw. in Anbetracht der Theorie, dass alle *dsrAB*-Sequenzen monophyletisch sind (Wagner et al. 1998; Klein et al. 2001; Klein 2004), der gemeinsame Vorläufer sehr alt ist.

E Zusammenfassung

Die dissimilatorische Sulfatreduktion ist eine der wichtigsten biologisch durchgeführten Stoffwechselreaktionen auf der Erde. Dies liegt unter anderem daran, dass bis zu 50% des organischen Kohlenstoffs in marinen Sedimenten im Rahmen der an die Sulfatreduktion gekoppelten Redoxreaktionen remineralisiert werden. 71% der Planetenoberfläche sind von Meerwasser bedeckt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Diversität der *dsrAB*-Gene im marinen Sediment an der Küste Spitzbergens durch die Erstellung einer *dsrAB*-Genbank untersucht werden. So konnten neben SRP von denen bekannt ist, dass sie in marinen Sedimenten zu finden sind, neue Entwicklungslinien gefunden werden, denen bislang keine kultivierten SRP zuordenbar sind. Diese neuen Entwicklungslinien aber auch Proteobakterien dürften eine wichtige Rolle im Sediment bei Station J spielen. Mit dem SRP-PhyloChip konnten ebenfalls Hinweise auf das Vorhandensein von Vertretern der *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteraceae* und *Desulfobulbaceae* in den Sedimenten, die alle in die Klasse der Deltaproteobakterien fallen, gesammelt werden.

Mit Real-Time-PCR wurde die Abundanz einer OTU (OTU 12), die in diese neue Entwicklungslinie fällt und mit den meisten Klonen in der *dsrAB*-Genbank vertreten war, gemessen. Mit einer relativen Häufigkeit von bis zu 2% ist OTU 12 in dem untersuchten Habitat zahlenmäßig außergewöhnlich dominant. Auffällig ist, dass bei der Tiefe von sieben Zentimetern bei der die höchsten Sulfatreduktionsraten gemessen wurden, die Abundanz von OTU 12 abnimmt, während die Abundanz bei den Tiefen von fünf, sechs und neun Zentimetern am höchsten ist.

Zusätzlich wurden alle bis zum November 2006 publizierten *dsrAB*-Genbanken von marinen Sedimenten statistischen Analysen unterzogen. Vierzehn OTUs sind nur in marinen Habitaten zu finden sind. Die Daten suggerieren, dass *Desulfobacteraceae* und die neue, tiefzweigende Entwicklungslinie in allen kalten, marinen Sedimenten vorhanden sind. Weiters wurden statistische Tests durchgeführt, die zeigten, dass sich die publizierten *dsrAB*-Genbanken in ihrer Zusammensetzung stark voneinander unterscheiden. Aufgrund der geringen vorhanden Datenmenge bleibt unklar ob die Unterschiede durch biogeographische oder experimentelle Faktoren verursacht wurden.

F Literaturverzeichnis

- Achtziger, R., U. Nigman and H-Zwölfer (1992). "Rarefaction-Methoden und ihre Einsatzmöglichkeiten bei der zooökologischen Zustandsanalyse und Bewertung von Biotopen." Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz(1): 89-105.
- Acinas, S. G., R. Sarma-Rupavtarm, et al. (2005). "PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8966-9.
- Alewell, C. and A. Giesemann (1996). "Sulfate reduction in a forested catchment as indicated by d34S values of sulfate in soil solutions and runoff." Isotopes Environm. Health Studies **32**: 203-210.
- Alewell, C. and M. Novak (2001). "Spotting zones of dissimilatory sulfate reduction in a forested catchment: the 34S-35S approach." Environ. Pollut. **112**(3): 369-377.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Amann, R. I., L. Krumholz, et al. (1990). "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology." J. Bacteriol. **172**(2): 762-770.
- Amann, R. I., W. Ludwig, et al. (1995). "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol. Rev. **59**(1): 143-169.
- Arendsen, A. F., M. F. Verhagen, et al. (1993). "The dissimilatory sulfite reductase from *Desulfosarcina variabilis* is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = 9/2 iron-sulfur clusters." Biochemistry **32**(39): 10323-30.
- Asami, H., M. Aida, et al. (2005). "Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture." Appl Environ Microbiol **71**(6): 2925-33.
- Bagwell, C. E., X. Liu, et al. (2006). "Effects of legacy nuclear waste on the compositional diversity and distributions of sulfate-reducing bacteria in a terrestrial subsurface aquifer." FEMS Microbiol Ecol **55**(3): 424-31.
- Becker, S., M. Fahrbach, et al. (2002). "Quantitative tracing, by Taq nuclease assays, of a synechococcus ecotype in a highly diversified natural population." Appl Environ Microbiol **68**(9): 4486-94.
- Beeder, J., T. Torsvik, et al. (1995). "Thermodesulforhabdus norvegicus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water." Arch Microbiol **164**(5): 331-6.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2002). "GenBank." Nucleic Acids Res. **30**(1): 17-20.
- Berner (2004). "A model for calcium, magnesium and sulfate in seawater over phanerozoic time." American Journal of Science **304**: 438-453.
- Blazejak, A., C. Erseus, et al. (2005). "Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (*Oligochaeta*) from the Peru margin." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1553-61.
- Bowman, J. P., S. M. Rea, et al. (2000). "Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hils, Eastern Antarctica." Environ. Microbiol. **2**(2): 227-237.

F Literaturverzeichnis

- Brandt, K. K., B. K. Patel, et al. (1999). "Desulfocella halophila gen. nov., sp. nov., a halophilic, fatty-acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of the Great Salt Lake." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 1**: 193-200.
- Burggraf, S., H. W. Jannasch, et al. (1990). "Archeoglobus profundus sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria." System. Appl. Microbiol. **13**: 24-28.
- Campbell, M. S. and A. C. Wright (2003). "Real-time PCR analysis of Vibrio vulnificus from oysters." Appl Environ Microbiol **69**(12): 7137-44.
- Castro, H., K. R. Reddy, et al. (2002). "Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades." Appl. Environ. Microbiol. **68**(12): 6129-6137.
- Catling (2005). "How Earth's atmosphere evolved to an oxic state: A status report." Earth and Planetary Science Letters **237**: 1-20.
- Chang, Y. J., A. D. Peacock, et al. (2001). "Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site." Appl. Environ. Microbiol. **67**(7): 3149-3160.
- Chao, A. (1984). "Non-parametric estimation of the number of classes in a population." Scand. J. Statistics **11**: 265-270.
- Coleman, B. D. (1981). "On random placement and species-area relations." Mathematical Biosciences **54**(3-4): 191-215.
- Colwell, R. K., C. X. Mao, et al. (2004). "Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves." Ecology **85**(10): 2717-2727.
- Cottrell, M. T. and S. C. Cary (1999). "Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*." Appl. Environ. Microbiol. **65**(3): 1127-1132.
- Crane, B. R. and E. D. Getzoff (1996). "The relationship between structure and function for the sulfite reductases." Curr Opin Struct Biol **6**(6): 744-56.
- Cypionka, H. (2000). "Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species." Annu. Rev. Microbiol. **54**: 827-848.
- Dahl, C., N. M. Kredich, et al. (1993). "Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes." J Gen Microbiol **139**(8): 1817-28.
- Dahl, C., M. Molitor, et al. (2001). "Siroheme-sulfite reductase-type protein from *Pyrobaculum islandicum*." Methods Enzymol. **331**: 410-419.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham, et al. (1989). "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells." Science **243**(4896): 1360-1363.
- Devereux, R. and G. W. Mundfrom (1994). "A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment." Appl. Environ. Microbiol. **60**(9): 3437-3439.
- Dhillon, A., A. Teske, et al. (2003). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin." Appl. Environ. Microbiol. **69**(5): 2765-2772.
- Dionisi, H. M., A. C. Layton, et al. (2002). "Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR." Appl. Environ. Microbiol. **68**(1): 245-253.

- Dubilier, N., C. Mulders, et al. (2001). "Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm." Nature **411**(6835): 298-302.
- Duve, D. (1998). "Clues from present-day biology: the thioester world." The molecular origins of life. Assembling pieces of the puzzle: 219-236.
- Edgcomb, V. P., J. H. McDonald, et al. (1999). "Estimation of bacterial cell numbers in humic acid-rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA." Appl. Environ. Microbiol. **65**(4): 1516-1523.
- Eisen, J. A., K. E. Nelson, et al. (2002). "The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9509-14.
- Eschemann, A., M. Kühl, et al. (1999). "Aerotaxis in *Desulfovibrio*." Environ. Microbiol. **1**(6): 489-494.
- Felsenstein, J. (1995). PHYLIP: phylogeny inference package. Seattle, Department of Genetics, University of Washington.
- Finke, N., V. Vandieken, et al. (2006). "Acetate, lactate, propionate, and isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediments, Svalbard." FEMS Microbiol Ecol.
- Finster, K., W. Liesack, et al. (1998). "Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment." Appl Environ Microbiol **64**(1): 119-25.
- Finster, K., W. Liesack, et al. (1997). "*Desulfospira joergensenii*, gen. nov., sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium isolated from marine surface sediment." Systematic and Applied Microbiology **20**(2): 201-208.
- Fitch, W. M. (1971). "Toward Defining Course of Evolution - Minimum Change for a Specific Tree Topology." Systematic Zoology **20**(4): 406-&.
- Fitch, W. M. and E. Margoliash (1967). "Construction of phylogenetic trees." Science **155**(760): 279-84.
- Fitz-Gibbon, S. T., H. Ladner, et al. (2002). "Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 984-9.
- Frederiksen, T. M. and K. Finster (2004). "The transformation of inorganic sulfur compounds and the assimilation of organic and inorganic carbon by the sulfur disproportionating bacterium *Desulfocapsa sulfoexigens*." Antonie Van Leeuwenhoek **85**(2): 141-9.
- Friedrich, M. W. (2002). "Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms." J. Bacteriol. **184**(1): 278-289.
- Fukuba, T., M. Ogawa, et al. (2003). "Phylogenetic diversity of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea cold seep sediment." Mar Biotechnol (NY) **5**(5): 458-68.
- Fukushima, M., K. Kakinuma, et al. (2002). "Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence." J Clin Microbiol **40**(8): 2779-85.
- Fuseler, K. and H. Cypionka (1995). "Elemental sulfur as an intermediate of sulfide oxidation with oxygen by *Desulfobulbus propionicus*." Archives of Microbiology **164**(2): 104-109.
- Galushko, A., D. Minz, et al. (1999). "Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium." Environ Microbiol **1**(5): 415-20.
- Good, I. J. (1953). "The population frequency of species and the estimation of population parameters." Biometrika **40**(237-264).

- Gray, N. D., R. Howarth, et al. (1999). "Substrate uptake by uncultured bacteria from the genus *Achromatium* determined by microautoradiography." Appl Environ Microbiol **65**(11): 5100-6.
- Gray, N. D., R. Howarth, et al. (2000). "Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*." Appl. Environ. Microbiol. **66**(10): 4518-4522.
- Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, et al. (2000). "Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition." Appl. Environ. Microbiol. **66**(12): 5488-5491.
- Gruntzig, V., S. C. Nold, et al. (2001). "Pseudomonas stutzeri nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR." Appl Environ Microbiol **67**(2): 760-8.
- Habicht, K. S. and D. E. Canfield (1997). "Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments." Geochim Cosmochim Acta **61**(24): 5351-61.
- Hansen, T. A. (1994). "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes." Antonie van Leeuwenhoek **66**: 165-185.
- Hattori, S., Y. Kamagata, et al. (2000). "Thermacetogenium phaeum gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **50**(4): 1601-1609.
- Hermansson, A. and P. E. Lindgren (2001). "Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR." Appl Environ Microbiol **67**(2): 972-6.
- Hittel, D. S. and G. Voordouw (2000). "Overexpression, purification and immunodetection of DsrD from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough." Antonie Van Leeuwenhoek **77**(3): 271-80.
- Hristova, K., B. Gebreyesus, et al. (2003). "Naturally occurring bacteria similar to the methyl tert-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2616-23.
- Hristova, K. R., C. M. Lutenecker, et al. (2001). "Detection and quantification of methyl tert-butyl ether-degrading strain PM1 by real-time TaqMan PCR." Appl Environ Microbiol **67**(11): 5154-60.
- Hristova, K. R., M. Mau, et al. (2000). "*Desulfotomaculum* genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies." Environ. Microbiol. **2**(2): 143-159.
- Huber, H., H. Jannasch, et al. (1997). "*Archeoglobus veneficus* sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers." System. Appl. Microbiol. **20**: 374-380.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, et al. (1998). "Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity." J. Bacteriol. **180**(18): 4765-4774.
- Hugenholtz, P., C. Pitulle, et al. (1998). "Novel division level bacterial diversity in a yellowstone hot spring." J. Bacteriol. **180**(2): 366- 376.
- Itoh, T., K.-I. Suzuki, et al. (1999). "*Caldivirga maquilingsensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines." Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 1157-1163.
- Jørgensen, B. B. (1977). "The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark)." Limnol. Oceanogr. **22**: 814-832.

- Jørgensen, B. B. (1982). "Mineralization of organic matter in the sea-bed - the role of sulphate reduction." Nature **296**: 643-645.
- Joulian, C., N. B. Ramsing, et al. (2001). "Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments." Appl. Environ. Microbiol. **67**(7): 3314-3318.
- Juretschko, S., A. Loy, et al. (2002). "The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach." Syst. Appl. Microbiol. **25**: 84-99.
- Juretschko, S., G. Timmermann, et al. (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*- like bacteria as dominant populations." Appl. Environ. Microbiol. **64**(8): 3042-3051.
- Kane, M. D., L. K. Poulsen, et al. (1993). "Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences." Appl. Environ. Microbiol. **59**(3): 682-686.
- Karkhoff-Schweizer, R. R., D. P. Huber, et al. (1995). "Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR." Appl. Environ. Microbiol. **61**(1): 290-296.
- Kato, C. and K. Takai (2000). "[Microbial diversity of deep-sea extremophiles--Piezophiles, Hyperthermophiles, and subsurface microorganisms]." Biol Sci Space **14**(4): 341-52.
- Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, et al. (2001). "rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database." Nucleic Acids Res **29**(1): 181-4.
- Klein, M. (2004). Dissimilatory (bi-) Sulfite Reductase as a Marker for Phylogenetic and Ecological Studies of Sulfate-Reducing Prokaryotes, Technische Universität München.
- Klein, M., M. Friedrich, et al. (2001). "Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes." J. Bacteriol. **183**(20): 6028-6035.
- Kniemeyer, O., T. Fischer, et al. (2003). "Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium." Appl. Environ. Microbiol. **69**(2): 760-768.
- Knoblauch, C. and B. B. Jørgensen (1999). "Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments." Environ. Microbiol. **1**(5): 457-467.
- Knoblauch, C., B. B. Jørgensen, et al. (1999). "Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in arctic marine sediments." Appl. Environ. Microbiol. **65**(9): 4230-4233.
- Knoblauch, C., K. Sahm, et al. (1999). "Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. **49**(4): 1631-1643.
- Kolb, S., C. Knief, et al. (2003). "Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2423-9.
- Koschorreck, M., K. Wendt-Potthoff, et al. (2003). "Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina." Environ Sci Technol **37**(6): 1159-62.
- Krekeler, D., A. Teske, et al. (1998). "Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat." FEMS Microbiol. Ecol. **25**(2): 89-96.

- Krumholz, L. R., S. H. Harris, et al. (1999). "Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles." Appl. Environ. Microbiol. **65**(6): 2300-2306.
- Kuever, J., F. Rainey, et al. (2005). Desulfobulbaceae fam. nov. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology 988-999.
- Kuever, J., F. Rainey, et al. (2005). Desulforhabdus Oude Elferink, Maas, Harmsen and Stams 1997, 1274 VP (Effective publication: Oude Elferink, Maas, Harmsen and Stams 1995, 123). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: 1029-1030.
- Kuever, J., F. Rainey, et al. (2005). Desulfovibrionales ord. nov. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology 925-958.
- LeGall, J. F., G. (1988). "Dissimilatory reduction of sulfur compounds." Biology of Anaerobic Microorganisms: 587-639.
- Lehman, R. M., F. F. Roberto, et al. (2001). "Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer." Appl. Environ. Microbiol. **67**(5): 2095-2106.
- Leloup, J., L. Quillet, et al. (2006). "Diversity of the dsrAB (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France." FEMS Microbiol Ecol **55**(2): 230-8.
- Liu, X., C. E. Bagwell, et al. (2003). "Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats." Appl. Environ. Microbiol. **69**(10): 6073-6081.
- Lloyd, K. G., L. Lapham, et al. (2006). "An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments." Appl Environ Microbiol **72**(11): 7218-30.
- Loy, A., K. Küsel, et al. (2004). "Microarray and Functional Gene Analyses of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Low Sulfate, Acidic Fens Reveal Cooccurrence of Recognized Genera and Novel Lineages." Appl. Environ. Microbiol. **70**(12): 6998-7009.
- Loy, A., K. Küsel, et al. (2003). "Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in an acidic fen: Comparison of 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray hybridization with dissimilatory (bi)sulfite reductase gene surveys." Appl. Environ. Microbiol. **submitted**.
- Loy, A., A. Lehner, et al. (2002). "Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment." Appl. Environ. Microbiol. **68**(10): 5064-5081.
- Ludwig, W., O. Strunk, et al. (1998). "Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis." Electrophoresis **19**(4): 554-568.
- Ludwig, W., O. Strunk, et al. (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Res. **32**(4): 1363-1371.
- Ma, B., J. Tromp, et al. (2002). "PatternHunter: faster and more sensitive homology search." Bioinformatics **18**(3): 440-5.
- Madden, T. L., R. L. Tatusov, et al. (1996). "Applications of network BLAST server." Methods Enzymol **266**: 131-41.

- Maddison, W. P. and M. Slatkin (1991). "Null Models for the Number of Evolutionary Steps in a Character on a Phylogenetic Tree." Evolution **45**(5): 1184-1197.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2000). Brock. Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall.
- Magot, M., P. Caumette, et al. (1992). "*Desulfovibrio longus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an oil-producing well." Int. J. Syst. Bacteriol. **42**(3): 398-403.
- Manz, W., M. Eisenbrecher, et al. (1998). "Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides." FEMS Microbiol. Ecol. **25**: 43-61.
- Martin, A. P. (2002). "Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities." Appl Environ Microbiol **68**(8): 3673-82.
- Martínez-Murcia, A., S. G. Acinas, and F. Rodríguez-Valera (1995). "Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments." FEMS Microbiol Ecol **17**: 247-256.
- McCulloch, M. T. (1996). "Isotopic constraints on the age and early differentiation of the Earth." J R Soc West Aust **79 Pt 1**: 131-9.
- Miller (1998). "The endogenous synthesis of organic compounds." The molecular origins of life. Assembling pieces of the puzzle: 59-85.
- Mizuno, N., G. Voordouw, et al. (2003). "Crystal structure of dissimilatory sulfite reductase D (DsrD) protein--possible interaction with B- and Z-DNA by its winged-helix motif." Structure **11**(9): 1133-40.
- Molitor, M., C. Dahl, et al. (1998). "A dissimilatory sirohaem-sulfite-reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*." Microbiology **144**(Pt 2): 529-541.
- Mori, K., H. Kim, et al. (2003). "A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring." Extremophiles **7**(4): 283-90.
- Moyer, C. L., F. C. Dobbs, et al. (1994). "Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii." Appl Environ Microbiol **60**(3): 871-9.
- Muller, J. A., A. S. Galushko, et al. (1999). "Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfohalobium acetatum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate." Arch Microbiol **172**(5): 287-94.
- Musmann, M., K. Ishii, et al. (2005). "Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea." Environ Microbiol **7**(3): 405-18.
- Nakagawa, T., S. Hanada, et al. (2002). "Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan)." FEMS Microbiol. Ecol. **41**: 199-209.
- Nakagawa, T., J. Ishibashi, et al. (2004). "Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Western Pacific." Appl Environ Microbiol **70**(1): 393-403.
- Nakagawa, T., S. Nakagawa, et al. (2004). "Phylogenetic diversity of sulfate-reducing prokaryotes in active deep-sea hydrothermal vent chimney structures." FEMS Microbiol Lett **232**(2): 145-52.

F Literaturverzeichnis

- Nercessian, O., N. Bienvenu, et al. (2005). "Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments." Environ Microbiol **7**(1): 118-32.
- Nogva, H. K., A. Bergh, et al. (2000). "Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*." Appl Environ Microbiol **66**(9): 4029-36.
- Nogva, H. K., S. M. Dromtorp, et al. (2003). "Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR." Biotechniques **34**(4): 804-8, 810, 812-3.
- Odom, J. M. S., R. Jr, eds (1993). The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives. New York, Springer-Verlag.
- Ouattara, A. S., B. K. Patel, et al. (1999). "Isolation and characterization of *Desulfovibrio burkinensis* sp. nov. from an African ricefield, and phylogeny of *Desulfovibrio alcoholivorans*." Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 639-643.
- Panicker, G., M. L. Myers, et al. (2004). "Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR." Appl Environ Microbiol **70**(1): 498-507.
- Patterson (1955). "Age of the Earth." Science(212): 69-75.
- Patterson (1956). "Age of meteorites and the Earth." Geochimica et Cosmochimica Acta(10): 230-237.
- Phelps, C. D., L. J. Kerkhof, et al. (1998). "Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene." FEMS Microbiology Ecology **27**: 269-279.
- Philippot *et al.* (2007). "Early Archaean Microorganisms Preferred Elemental Sulfur, Not Sulfate" Science **317**, 1534
- Pierik, A. J., M. G. Duyvis, et al. (1992). "The third subunit of desulfovirdin-type dissimilatory sulfite reductases." Eur J Biochem **205**(1): 111-5.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." Appl. Environ. Microbiol. **64**(10): 3724-3730.
- Pott, A. S. and C. Dahl (1998). "Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur." Microbiology **144** (Pt 7): 1881-94.
- Ravenschlag, K., K. Sahm, et al. (2001). "Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard)." Appl Environ Microbiol **67**(1): 387-95.
- Ravenschlag, K., K. Sahm, et al. (2000). "Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments." Appl. Environ. Microbiol. **66**(8): 3592-3602.
- Ravenschlag, K., K. Sahm, et al. (1999). "High bacterial diversity in permanently cold marine sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3982-9.
- Rochelle, P. A., J. C. Fry, et al. (1992). "DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities." FEMS Microbiol Lett **79**(1-3): 59-65.
- Rooney-Varga, J. N., B. R. Genthner, et al. (1998). "Phylogenetic and physiological diversity of sulphate-reducing bacteria isolated from a salt marsh sediment." Syst. Appl. Microbiol. **21**(4): 557-568.
- Rosing, M. T. (1999). "13C-Depleted carbon microparticles in >3700-Ma sea-floor sedimentary rocks from west greenland." Science **283**(5402): 674-6.

- Rozanova, E. P., T. P. Turova, et al. (2001). "[Desulfacinum subterraneum sp.nov.--a new thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a high temperature oil field]." Mikrobiologija **70**(4): 536-42.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-86.
- Sahm, K., C. Knoblauch, et al. (1999). "Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine Arctic sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3976-81.
- Sahm, K., B. J. MacGregor, et al. (1999). "Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment." Environ. Microbiol. **1**(1): 65-74.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. **74**(12): 5463-5467.
- Sass, H., H. Cypionka, et al. (1997). "Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin." FEMS Microbiol. Ecol. **22**(3): 245-255.
- Schedel, M., Vanselow, M. & Trüper (1979). "Siroheme sulfite reductase from Chromatium vinosum. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties." Arch. Microbiol.(121): 29-36.
- Scheid, D. and S. Stubner (2001). "Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots." FEMS Microbiol. Ecol. **36**(2-3): 175-183.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2006). "Introducing TreeClimber, a test to compare microbial community structures." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2379-84.
- Schmalenberger, A. D., HL; Küsel, K, (2007). "DsrAB sequences from an acidic fen reveal high unique diversities of sulfate-reducing bacteria in a depth gradient." Environmental Microbiology in press.
- Schramm, A., C. M. Santegoeds, et al. (1999). "On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge." Appl. Environ. Microbiol. **65**(9): 4189-4196.
- Seurinck, S., T. Defoirdt, et al. (2005). "Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater." Environ Microbiol **7**(2): 249-59.
- Shen, Y., R. Buick, et al. (2001). "Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaeal era." Nature **410**(6824): 77-81.
- Shinozaki, K. (1963). "Note on the species-area-curve." Proceedings of the 10th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan.: 5.
- Sievert, S. M. and J. Kuever (2000). "Desulfacinum hydrothermale sp. nov., a thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece)." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 3**: 1239-46.
- Slatkin, M. and W. P. Maddison (1989). "A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles." Genetics **123**(3): 603-13.
- Slatkin, M. and W. P. Maddison (1990). "Detecting isolation by distance using phylogenies of genes." Genetics **126**(1): 249-60.

F Literaturverzeichnis

- Stackebrandt, E., C. Sproer, et al. (1997). "Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. **47**(4): 1134-1139.
- Stetter, K. O., G. Lauerer, et al. (1987). "Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: Evidence for a novel branch of archaeobacteria." Science **236**: 822-824.
- Stubner, S. (2004). "Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR." J Microbiol Methods **57**(2): 219-30.
- Stubner, S. and K. Meuser (2000). "Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses." FEMS Microbiol. Ecol. **34**(1): 73-80.
- Stults, J. R., O. Snoeyenbos-West, et al. (2001). "Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2781-9.
- Sung, Y., K. M. Ritalahti, et al. (2003). "Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2964-74.
- Suzuki, M. T., L. T. Taylor, et al. (2000). "Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays." Appl Environ Microbiol **66**(11): 4605-14.
- Takai, K., A. Sugai, et al. (2000). "Palaeococcus ferrophilus gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 2**: 489-500.
- Teske, A., N. B. Ramsing, et al. (1998). "Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt)." Appl. Environ. Microbiol. **64**(8): 2943-2951.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Thomsen, T. R., K. Finster, et al. (2001). "Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment." Appl. Environ. Microbiol. **67**(4): 1646-1656.
- Tichopad, A., M. Dilger, et al. (2003). "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up." Nucleic Acids Res **31**(20): e122.
- Urakawa, H., K. Kita-Tsukamoto, et al. (1999). "Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis." Microbiology **145 (Pt 11)**: 3305-15.
- Valley, J. W., A. J. Cavosie, et al. (2006). "Comment on "Heterogeneous Hadean hafnium: evidence of continental crust at 4.4 to 4.5 Ga"." Science **312**(5777): 1139; author reply 1139.
- Vandieken, V., C. Knoblauch, et al. (2006). "Desulfotomaculum arcticum sp. nov., a novel spore-forming, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a permanently cold fjord sediment of Svalbard." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 4): 687-90.
- Vandieken, V., C. Knoblauch, et al. (2006). "Desulfovibrio frigidus sp. nov. and Desulfovibrio ferrireducens sp. nov., psychrotolerant bacteria isolated from Arctic fjord sediments (Svalbard) with the ability to reduce Fe(III)." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 4): 681-5.

- Vandieken, V., M. Mussmann, et al. (2006). "Desulfuromonas svalbardensis sp. nov. and Desulfuromusa ferrireducens sp. nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 5): 1133-9.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, et al. (1997). "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis." FEMS Microbiol. Rev. **21**: 213-229.
- Wächterhäuser (1998). "Origin of life in an iron-sulfur world." The molecular origins of life. Assembling pieces of the puzzle: 206-218.
- Wagner, M., M. Horn, et al. (2003). "Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of prokaryotes." Curr. Opin. Microbiol. **In press**.
- Wagner, M., A. J. Roger, et al. (1998). "Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration." J. Bacteriol. **180**(11): 2975-2982.
- Widdel, F. (1980). Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoessäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. Göttingen, Georg-August-Universität.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. Biology of anaerobic microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 469-585.
- Widdel, F. (1992). The genus *Desulfotomaculum*. The Prokaryotes, 2nd ed. New York, Springer: 1792-1799.
- Widdel, F. and N. Pfennig (1981). "Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov." Arch. Microbiol. **129**: 395-400.
- Widdel, F. and R. Rabus (2001). "Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons." Curr Opin Biotechnol **12**(3): 259-76.
- Widdel, F. H., T A. (1992). The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. New York, Balows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H.
- Wilde, S. A., J. W. Valley, et al. (2001). "Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago." Nature **409**(6817): 175-8.
- Wind, T. and R. Conrad (1995). "Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil." FEMS Microbiol. Ecol. **18**(4): 257-266.
- Wind, T., S. Stubner, et al. (1999). "Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots." Syst. Appl. Microbiol. **22**(2): 269-279.
- Wolfe, B. M., S. M. Lui, et al. (1994). "Desulfovirdin, a multimeric-dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Purification, characterization, kinetics and EPR studies." Eur J Biochem **223**(1): 79-89.
- Wu, C., R. Carta, et al. (2005). "Sequence dependence of cross-hybridization on short oligo microarrays." Nucleic Acids Res **33**(9): e84.
- Zverlov, V., M. Klein, et al. (2005). "Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited." J. Bacteriol. **187**(6): 2203-8.

G Anhang

G.1 Rohdaten der Quantifizierung von OTU 12

Quantifizierung von OTU 12 in Core B

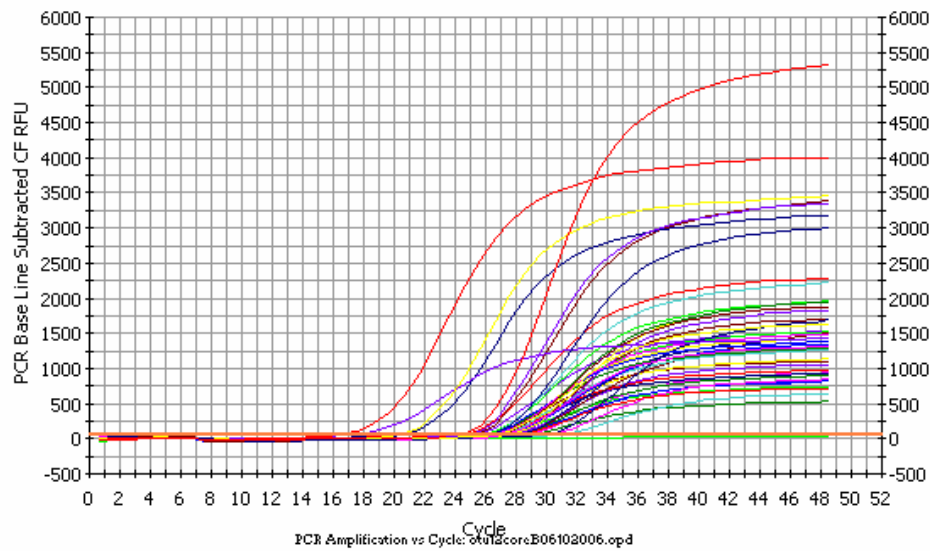
Tiefe	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.
1 cm	28,27	1,572	3,73E+01	6,71E+01	3,46E+01	27,53	7,79E-01
2 cm	30,14	1,032	1,08E+01	1,72E+01	6,11E+00	29,51	5,78E-01
3 cm	27,9	1,68	4,78E+01	6,20E+01	2,01E+01	27,55	4,95E-01
4 cm	28,05	1,637	4,33E+01	6,33E+01	2,18E+01	27,54	5,20E-01
5 cm	25,81	2,285	1,93E+02	4,65E+02	2,58E+02	24,68	1,01E+00
6 cm	26,29	2,146	1,40E+02	2,04E+02	8,56E+01	25,8	5,97E-01
7 cm	27,05	1,925	8,42E+01	8,61E+01	3,73E+01	27,12	6,89E-01
8 cm	26,55	2,069	1,17E+02	1,60E+02	4,50E+01	26,13	4,26E-01
9 cm	26,25	2,156	1,43E+02	2,38E+02	8,57E+01	25,57	6,09E-01
10 cm	26,75	2,011	1,03E+02	1,25E+02	2,65E+01	26,48	3,11E-01
11 cm	27,41	1,823	6,65E+01	9,19E+01	2,66E+01	26,96	4,41E-01
1 cm	27,58	1,771	5,90E+01	6,71E+01	3,46E+01	27,53	7,79E-01
2 cm	29,39	1,25	1,78E+01	1,72E+01	6,11E+00	29,51	5,78E-01
3 cm	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4 cm	27,56	1,778	6,00E+01	6,33E+01	2,18E+01	27,54	5,20E-01
5 cm	24,38	2,698	4,99E+02	4,65E+02	2,58E+02	24,68	1,01E+00
6 cm	25,98	2,235	1,72E+02	2,04E+02	8,56E+01	25,8	5,97E-01
7 cm	27,84	1,698	4,98E+01	8,61E+01	3,73E+01	27,12	6,89E-01
8 cm	26,14	2,19	1,55E+02	1,60E+02	4,50E+01	26,13	4,26E-01
9 cm	25,09	2,492	3,10E+02	2,38E+02	8,57E+01	25,57	6,09E-01
10 cm	26,55	2,07	1,17E+02	1,25E+02	2,65E+01	26,48	3,11E-01
11 cm	26,96	1,953	8,97E+01	9,19E+01	2,66E+01	26,96	4,41E-01
1 cm	26,72	2,021	1,05E+02	6,71E+01	3,46E+01	27,53	7,79E-01
2 cm	29	1,361	2,29E+01	1,72E+01	6,11E+00	29,51	5,78E-01
3 cm	27,2	1,882	7,62E+01	6,20E+01	2,01E+01	27,55	4,95E-01
4 cm	27,01	1,937	8,65E+01	6,33E+01	2,18E+01	27,54	5,20E-01
5 cm	23,86	2,848	7,05E+02	4,65E+02	2,58E+02	24,68	1,01E+00
6 cm	25,13	2,479	3,02E+02	2,04E+02	8,56E+01	25,8	5,97E-01
7 cm	26,47	2,094	1,24E+02	8,61E+01	3,73E+01	27,12	6,89E-01
8 cm	25,7	2,316	2,07E+02	1,60E+02	4,50E+01	26,13	4,26E-01
9 cm	25,36	2,414	2,59E+02	2,38E+02	8,57E+01	25,57	6,09E-01
10 cm	26,14	2,188	1,54E+02	1,25E+02	2,65E+01	26,48	3,11E-01
11 cm	26,52	2,078	1,20E+02	9,19E+01	2,66E+01	26,96	4,41E-01

Standardreihe

Eingesetzte
Kopien

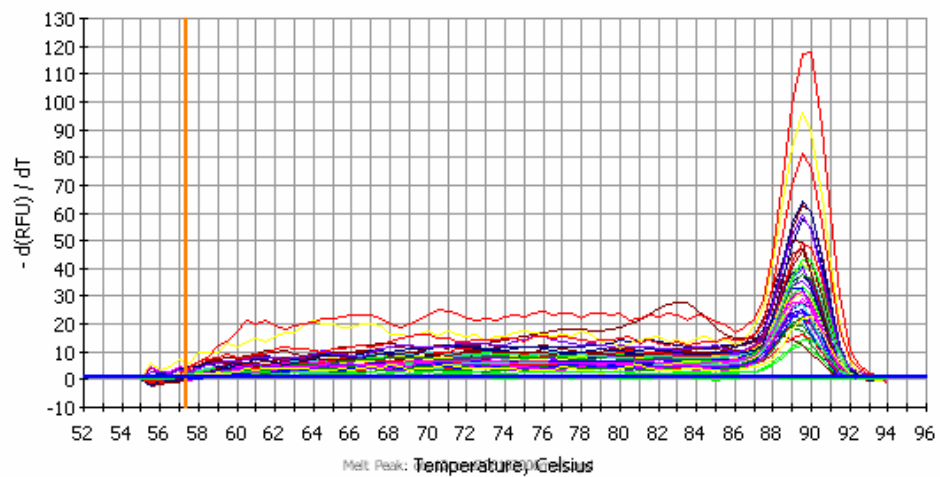
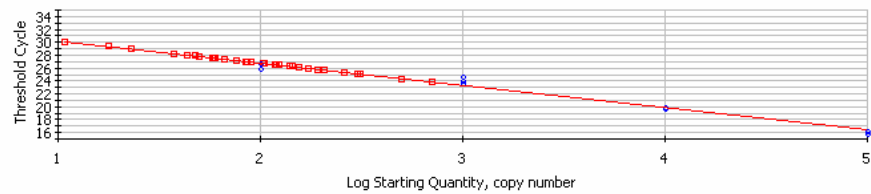
100	26,84	2	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	26,25	5,14E-01
1000	24,78	3	1,00E+03	1,00E+03	0,00E+00	24,17	5,95E-01

10000	19,79	4	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00	19,83	5,11E-02
100000	16,31	5	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00	16,03	3,90E-01
100	25,91	2	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	26,25	5,14E-01
1000	24,15	3	1,00E+03	1,00E+03	0,00E+00	24,17	5,95E-01
10000	19,86	4	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00	19,83	5,11E-02
100000	15,76	5	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00	16,03	3,90E-01
100	25,99	2	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	26,25	5,14E-01
1000	23,59	3	1,00E+03	1,00E+03	0,00E+00	24,17	5,95E-01



Correlation Coefficient: 0,984 Slope: -3,458 Intercept: 33,709 $Y = -3,458 X + 33,709$
 PCR Efficiency: 94,6 %

Unknowns
Standards



G Anhang

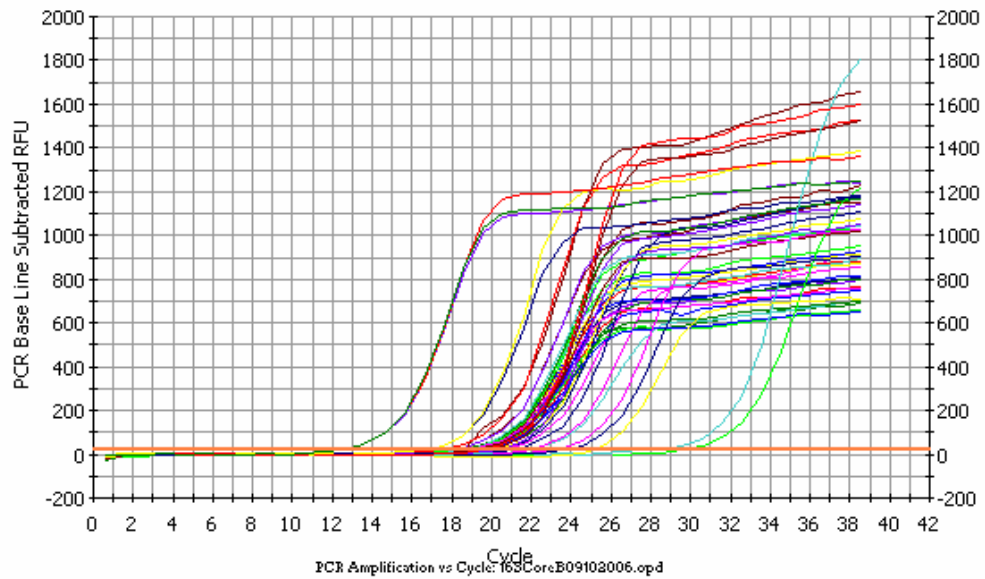
Quantifizierung von 16s-rRNS Genen in 12 Core B

Tiefe	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.
1 cm	18,87	4,676	4,74E+04	4,87E+04	3,10E+03	18,83	1,02E-01
2 cm	22,03	3,835	6,84E+03	8,46E+03	2,30E+03	21,72	4,22E-01
3 cm	19,67	4,464	2,91E+04	3,32E+04	4,36E+03	19,46	2,13E-01
4 cm	20,67	4,197	1,58E+04	1,86E+04	2,60E+03	20,4	2,35E-01
5 cm	18,2	4,853	7,13E+04	7,94E+04	1,67E+04	18,05	3,27E-01
6 cm	19,51	4,505	3,20E+04	4,31E+04	1,01E+04	19,06	4,07E-01
7 cm	19,55	4,494	3,12E+04	3,91E+04	8,37E+03	19,21	3,49E-01
8 cm	19,17	4,595	3,94E+04	4,44E+04	5,00E+03	18,98	1,85E-01
9 cm	19,48	4,514	3,26E+04	3,00E+04	2,33E+03	19,62	1,24E-01
10 cm	19,61	4,479	3,01E+04	3,98E+04	8,70E+03	19,19	3,79E-01
11 cm	19,59	4,484	3,05E+04	3,34E+04	2,56E+03	19,45	1,28E-01
1 cm	18,9	4,668	4,65E+04	4,87E+04	3,10E+03	18,83	1,02E-01
2 cm	21,89	3,871	7,43E+03	8,46E+03	2,30E+03	21,72	4,22E-01
3 cm	19,24	4,577	3,78E+04	3,32E+04	4,36E+03	19,46	2,13E-01
4 cm	20,33	4,286	1,93E+04	1,86E+04	2,60E+03	20,4	2,35E-01
5 cm	18,27	4,834	6,83E+04	7,94E+04	1,67E+04	18,05	3,27E-01
6 cm	18,93	4,66	4,57E+04	4,31E+04	1,01E+04	19,06	4,07E-01
7 cm	19,23	4,581	3,81E+04	3,91E+04	8,37E+03	19,21	3,49E-01
8 cm	18,97	4,649	4,45E+04	4,44E+04	5,00E+03	18,98	1,85E-01
9 cm	19,72	4,451	2,83E+04	3,00E+04	2,33E+03	19,62	1,24E-01
10 cm	18,88	4,672	4,70E+04	3,98E+04	8,70E+03	19,19	3,79E-01
11 cm	19,35	4,547	3,52E+04	3,34E+04	2,56E+03	19,45	1,28E-01
1 cm	18,71	4,718	5,23E+04	4,87E+04	3,10E+03	18,83	1,02E-01
2 cm	21,24	4,045	1,11E+04	8,46E+03	2,30E+03	21,72	4,22E-01
3 cm	19,48	4,514	3,27E+04	3,32E+04	4,36E+03	19,46	2,13E-01
4 cm	20,21	4,318	2,08E+04	1,86E+04	2,60E+03	20,4	2,35E-01
5 cm	17,68	4,994	9,86E+04	7,94E+04	1,67E+04	18,05	3,27E-01
6 cm	18,73	4,713	5,17E+04	4,31E+04	1,01E+04	19,06	4,07E-01
7 cm	18,86	4,68	4,79E+04	3,91E+04	8,37E+03	19,21	3,49E-01
8 cm	18,8	4,694	4,94E+04	4,44E+04	5,00E+03	18,98	1,85E-01
9 cm	19,67	4,464	2,91E+04	3,00E+04	2,33E+03	19,62	1,24E-01
10 cm	19,06	4,625	4,21E+04	3,98E+04	8,70E+03	19,19	3,79E-01
11 cm	19,39	4,538	3,45E+04	3,34E+04	2,56E+03	19,45	1,28E-01

Standardreihe Eingesetzte Kopien

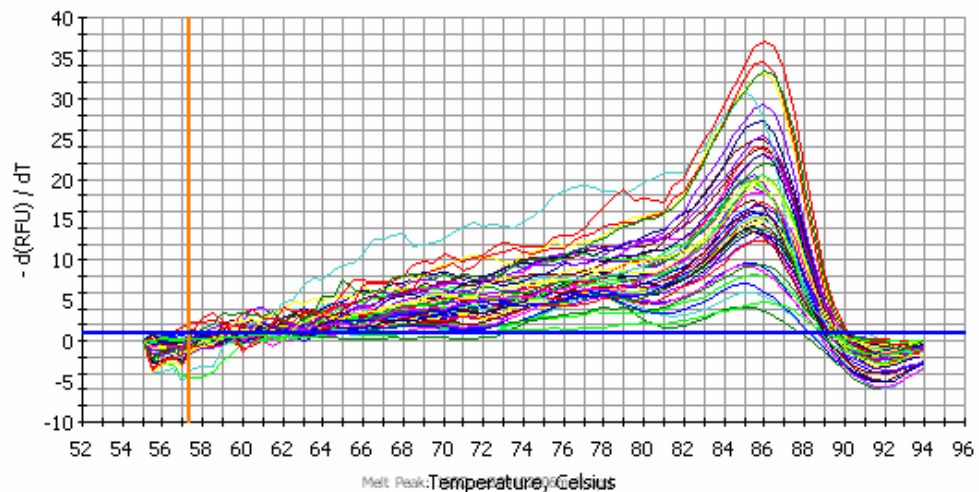
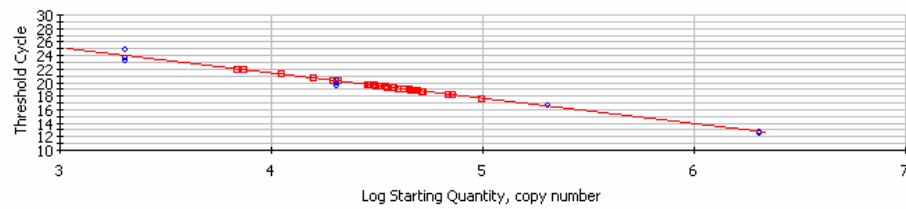
2000	23,39	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	24,09	8,56E-01
20000	20,09	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	20,11	4,14E-01
200000	16,86	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	16,79	9,70E-02
2000000	12,62	6,301	2,00E+06	2,00E+06	0,00E+00	12,7	8,86E-02
2000	23,83	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	24,09	8,56E-01
20000	20,53	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	20,11	4,14E-01
200000	16,72	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	16,79	9,70E-02
2000000	12,7	6,301	2,00E+06	2,00E+06	0,00E+00	12,7	8,86E-02
2000	25,04	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	24,09	8,56E-01

20000	19,71	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	20,11	4,14E-01
200000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2000000	12,8	6,301	2,00E+06	2,00E+06	0,00E+00	12,7	8,86E-02



Correlation Coefficient: 0,995 Slope: -3,757 Intercept: 36,436 $Y = -3,757 X + 36,436$
 PCR Efficiency: 84,6 %

□ Unknowns
 ○ Standards



G Anhang

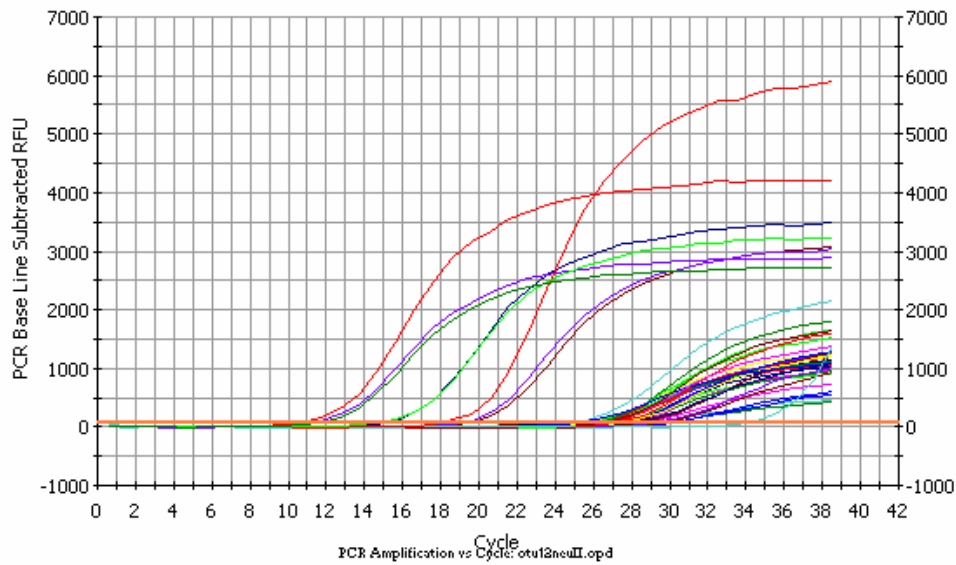
Quantifizierung von OTU 12 in Core C

Tiefe	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.
1 cm	29,87	1,204	1,60E+01	2,29E+01	1,30E+01	29,43	8,97E-01
2 cm	28,95	1,437	2,74E+01	4,02E+01	1,23E+01	28,35	5,56E-01
3 cm	30,13	1,138	1,37E+01	1,83E+01	4,82E+00	29,68	4,54E-01
4 cm	27,71	1,754	5,67E+01	6,24E+01	6,19E+00	27,55	1,69E-01
5 cm	27,82	1,724	5,30E+01	6,40E+01	1,37E+01	27,52	3,56E-01
6 cm	27,11	1,905	8,04E+01	1,00E+02	2,79E+01	26,77	4,83E-01
7 cm	26,62	2,03	1,07E+02	1,19E+02	2,35E+01	26,46	3,25E-01
8 cm	25,29	2,367	2,33E+02	2,23E+02	5,81E+01	25,4	4,71E-01
9 cm	26,12	2,156	1,43E+02	1,72E+02	6,29E+01	25,87	5,86E-01
10 cm	27,01	1,93	8,51E+01	1,03E+02	1,57E+01	26,7	2,73E-01
11 cm	27,09	1,909	8,11E+01	8,69E+01	1,99E+01	27,01	3,82E-01
1 cm	30,02	1,167	1,47E+01	2,29E+01	1,30E+01	29,43	8,97E-01
2 cm	28,26	1,614	4,12E+01	4,02E+01	1,23E+01	28,35	5,56E-01
3 cm	29,69	1,25	1,78E+01	1,83E+01	4,82E+00	29,68	4,54E-01
4 cm	27,37	1,839	6,90E+01	6,24E+01	6,19E+00	27,55	1,69E-01
5 cm	27,62	1,777	5,98E+01	6,40E+01	1,37E+01	27,52	3,56E-01
6 cm	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7 cm	26,68	2,013	1,03E+02	1,19E+02	2,35E+01	26,46	3,25E-01
8 cm	25,92	2,207	1,61E+02	2,23E+02	5,81E+01	25,4	4,71E-01
9 cm	26,3	2,111	1,29E+02	1,72E+02	6,29E+01	25,87	5,86E-01
10 cm	26,59	2,037	1,09E+02	1,03E+02	1,57E+01	26,7	2,73E-01
11 cm	27,34	1,848	7,05E+01	8,69E+01	1,99E+01	27,01	3,82E-01
1 cm	28,4	1,579	3,79E+01	2,29E+01	1,30E+01	29,43	8,97E-01
2 cm	27,86	1,716	5,20E+01	4,02E+01	1,23E+01	28,35	5,56E-01
3 cm	29,22	1,368	2,34E+01	1,83E+01	4,82E+00	29,68	4,54E-01
4 cm	27,57	1,789	6,15E+01	6,24E+01	6,19E+00	27,55	1,69E-01
5 cm	27,13	1,9	7,94E+01	6,40E+01	1,37E+01	27,52	3,56E-01
6 cm	26,42	2,079	1,20E+02	1,00E+02	2,79E+01	26,77	4,83E-01
7 cm	26,09	2,163	1,46E+02	1,19E+02	2,35E+01	26,46	3,25E-01
8 cm	25	2,441	2,76E+02	2,23E+02	5,81E+01	25,4	4,71E-01
9 cm	25,21	2,388	2,45E+02	1,72E+02	6,29E+01	25,87	5,86E-01
10 cm	26,5	2,06	1,15E+02	1,03E+02	1,57E+01	26,7	2,73E-01
11 cm	26,59	2,038	1,09E+02	8,69E+01	1,99E+01	27,01	3,82E-01

Standardreihe

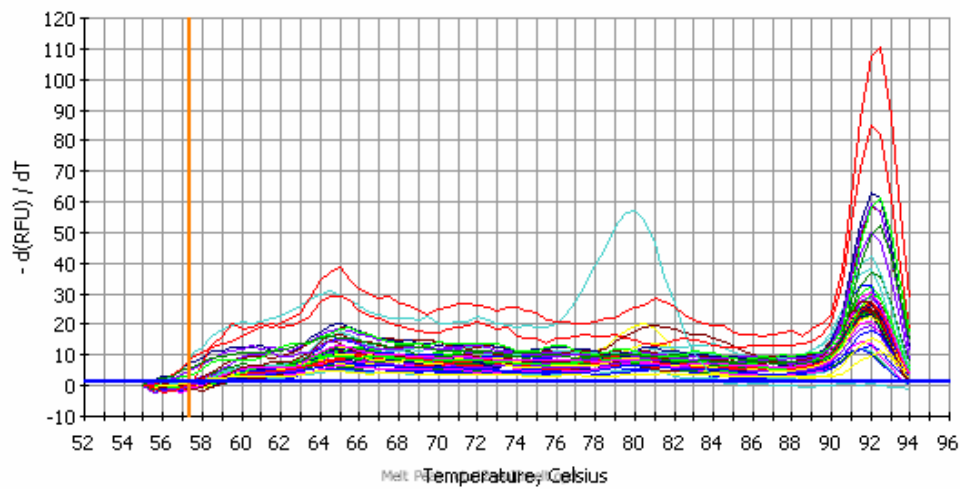
Eingesetzte Kopien

10000	19,53	4	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00	18,85	7,89E-01
100000	15	5	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00	14,93	9,97E-02
1000000	10,98	6	1,00E+06	1,00E+06	0,00E+00	10,97	4,04E-01
10000	19,02	4	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00	18,85	7,89E-01
100000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1000000	10,56	6	1,00E+06	1,00E+06	0,00E+00	10,97	4,04E-01
10000	17,99	4	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00	18,85	7,89E-01
100000	14,86	5	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00	14,93	9,97E-02
1000000	11,36	6	1,00E+06	1,00E+06	0,00E+00	10,97	4,04E-01



Correlation Coefficient: 0,992 Slope: -3,941 Intercept: 34,618 $Y = -3,941 X + 34,618$
 PCR Efficiency: 79,4 %

Unknowns
Standards



Quantifizierung von 16s-rRNS Genen in 12 Core C (1. Lauf)

Tiefe	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.
1 cm	22,72	4,194	1,56E+04	2,22E+04	9,27E+03	22,14	8,18E-01
2 cm	22,68	4,202	1,59E+04	1,97E+04	5,36E+03	22,32	5,22E-01
3 cm	22,98	4,135	1,37E+04	1,72E+04	4,97E+03	22,58	5,57E-01
4 cm	22,06	4,346	2,22E+04	2,74E+04	7,43E+03	21,69	5,21E-01
5 cm	22,54	4,236	1,72E+04	2,08E+04	5,12E+03	22,2	4,71E-01
6 cm	22,21	4,31	2,04E+04	1,66E+04	5,41E+03	22,66	6,29E-01

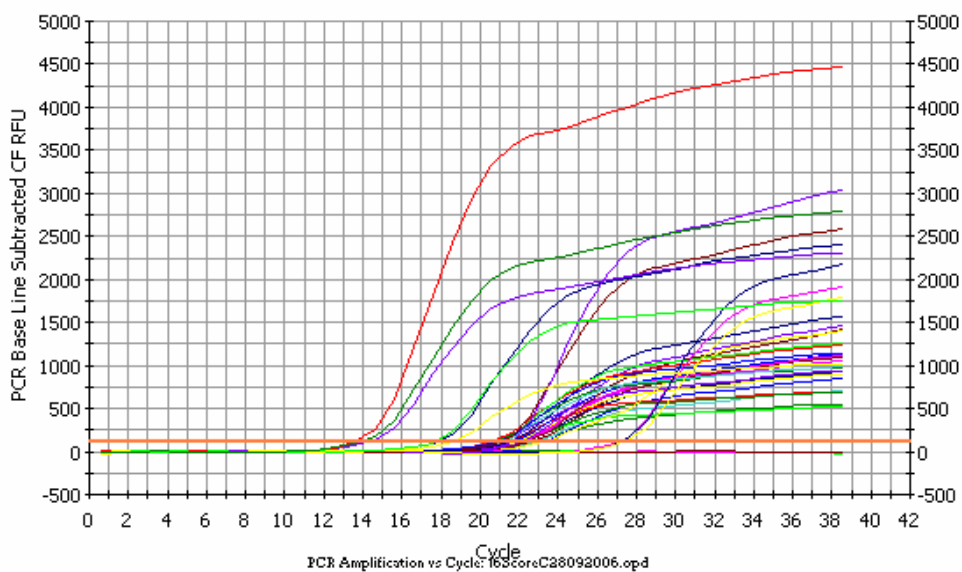
G Anhang

7 cm	20,94	4,601	3,99E+04	4,60E+04	8,63E+03	20,69	3,58E-01
8 cm	21,8	4,405	2,54E+04	3,55E+04	1,42E+04	21,25	7,82E-01
9 cm	21,24	4,534	3,42E+04	4,09E+04	9,46E+03	20,92	4,43E-01
10 cm	22,04	4,35	2,24E+04	3,14E+04	1,27E+04	21,48	7,88E-01
11 cm	22,17	4,321	2,09E+04	3,25E+04	1,63E+04	21,46	9,95E-01
1 cm	21,57	4,458	2,87E+04	2,22E+04	9,27E+03	22,14	8,18E-01
2 cm	21,95	4,371	2,35E+04	1,97E+04	5,36E+03	22,32	5,22E-01
3 cm	22,19	4,316	2,07E+04	1,72E+04	4,97E+03	22,58	5,57E-01
4 cm	21,32	4,514	3,27E+04	2,74E+04	7,43E+03	21,69	5,21E-01
5 cm	21,87	4,389	2,45E+04	2,08E+04	5,12E+03	22,2	4,71E-01
6 cm	23,1	4,106	1,28E+04	1,66E+04	5,41E+03	22,66	6,29E-01
7 cm	20,43	4,717	5,21E+04	4,60E+04	8,63E+03	20,69	3,58E-01
8 cm	20,69	4,658	4,55E+04	3,55E+04	1,42E+04	21,25	7,82E-01
9 cm	20,61	4,677	4,76E+04	4,09E+04	9,46E+03	20,92	4,43E-01
10 cm	20,92	4,605	4,03E+04	3,14E+04	1,27E+04	21,48	7,88E-01
11 cm	20,76	4,643	4,40E+04	3,25E+04	1,63E+04	21,46	9,95E-01

Standardreihe

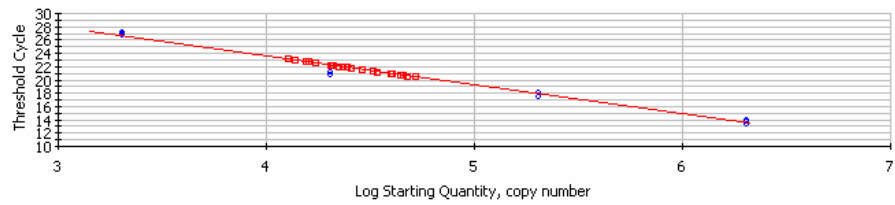
Eingesetzte Kopien

2000	26,98	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	27,11	1,46E-01
20000	20,91	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	21,16	3,55E-01
200000	17,7	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	17,89	3,97E-01
2000000	14,03	6,301	2,00E+06	2,00E+06	N/A	14,03	N/A
2000	27,07	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	27,11	1,46E-01
20000	21,41	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	21,16	3,55E-01
200000	18,34	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	17,89	3,97E-01
2000000	13,41	6,301	2,00E+06	2,00E+06	N/A	13,41	N/A
2000	27,27	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	27,11	1,46E-01
20000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200000	17,63	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	17,89	3,97E-01
2000000	13,83	6,301	2,00E+06	2,00E+06	N/A	13,83	N/A

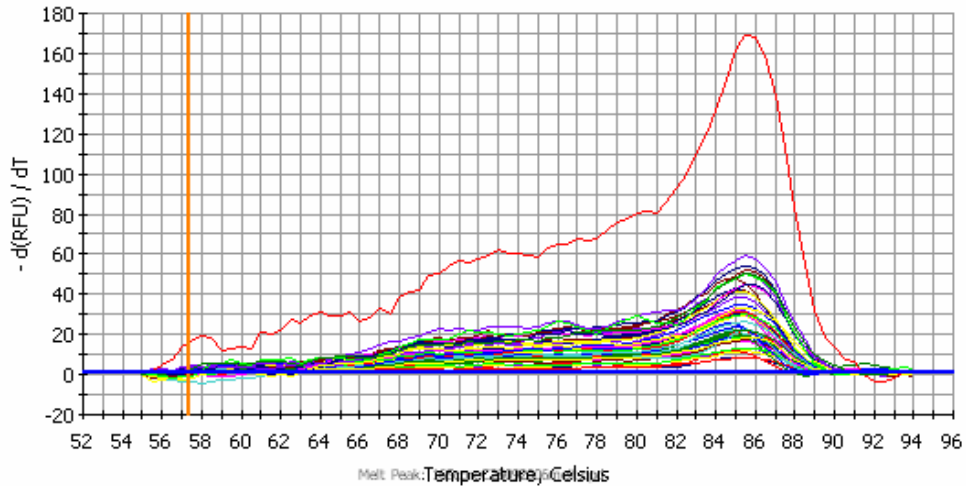


Correlation Coefficient: 0,993 Slope: -4,369 Intercept: 41,044 $Y = -4,369 X + 41,044$
 PCR Efficiency: 69,4 %

□ Unknowns
 ○ Standards



PCR Standard Curve: 16S coreC28092006.opd



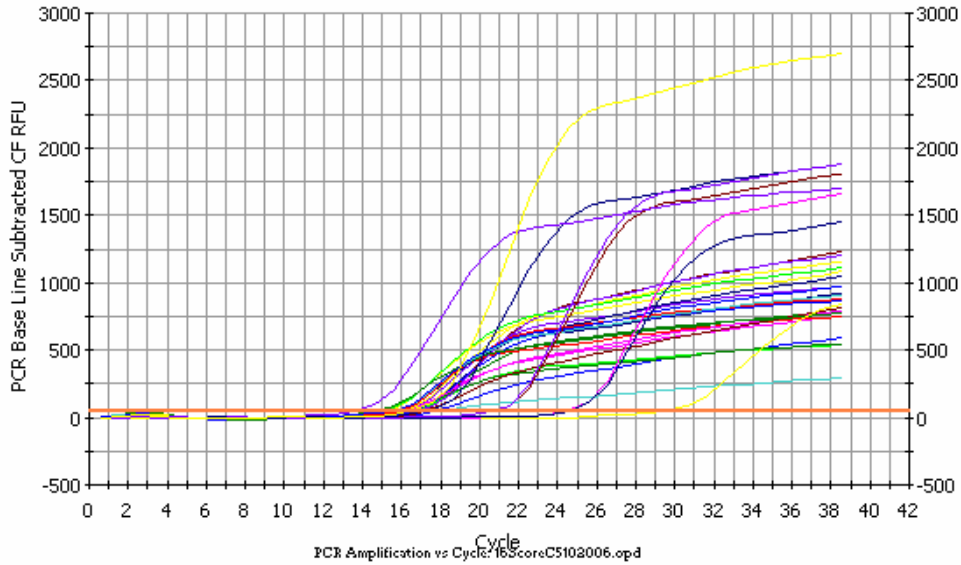
Quantifizierung von 16s-rRNS Genen in 12 Core C (2. Lauf)

Tiefe	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.
1 cm	16,7	5,351	2,24E+05	2,40E+05	2,27E+04	16,59	1,53E-01
2 cm	17,81	5,052	1,13E+05	2,12E+05	1,40E+05	16,99	1,16E+00
3 cm	17,67	5,091	1,23E+05	1,48E+05	3,52E+04	17,39	3,88E-01
4 cm	16,02	5,534	3,42E+05	3,83E+05	5,85E+04	15,84	2,47E-01
5 cm	16,76	5,333	2,15E+05	2,14E+05	2,53E+03	16,78	1,91E-02
6 cm	16,23	5,478	3,01E+05	3,38E+05	5,22E+04	16,05	2,51E-01
7 cm	15,89	5,567	3,69E+05	3,88E+05	2,62E+04	15,82	1,09E-01
8 cm	14,95	5,823	6,65E+05	6,81E+05	2,32E+04	14,91	5,50E-02
9 cm	14,68	5,894	7,84E+05	7,79E+05	5,94E+03	14,69	1,23E-02
10 cm	16,75	5,337	2,17E+05	3,51E+05	1,89E+05	16,1	9,14E-01
11 cm	16,38	5,437	2,74E+05	3,99E+05	1,78E+05	15,85	7,43E-01
1 cm	16,48	5,409	2,56E+05	2,40E+05	2,27E+04	16,59	1,53E-01
2 cm	16,17	5,492	3,11E+05	2,12E+05	1,40E+05	16,99	1,16E+00
3 cm	17,12	5,238	1,73E+05	1,48E+05	3,52E+04	17,39	3,88E-01
4 cm	15,67	5,628	4,25E+05	3,83E+05	5,85E+04	15,84	2,47E-01
5 cm	16,79	5,326	2,12E+05	2,14E+05	2,53E+03	16,78	1,91E-02
6 cm	15,87	5,574	3,75E+05	3,38E+05	5,22E+04	16,05	2,51E-01
7 cm	15,74	5,609	4,06E+05	3,88E+05	2,62E+04	15,82	1,09E-01
8 cm	14,87	5,844	6,97E+05	6,81E+05	2,32E+04	14,91	5,50E-02
9 cm	14,7	5,889	7,75E+05	7,79E+05	5,94E+03	14,69	1,23E-02
10 cm	15,46	5,685	4,84E+05	3,51E+05	1,89E+05	16,1	9,14E-01
11 cm	15,33	5,72	5,25E+05	3,99E+05	1,78E+05	15,85	7,43E-01

Standardreihe

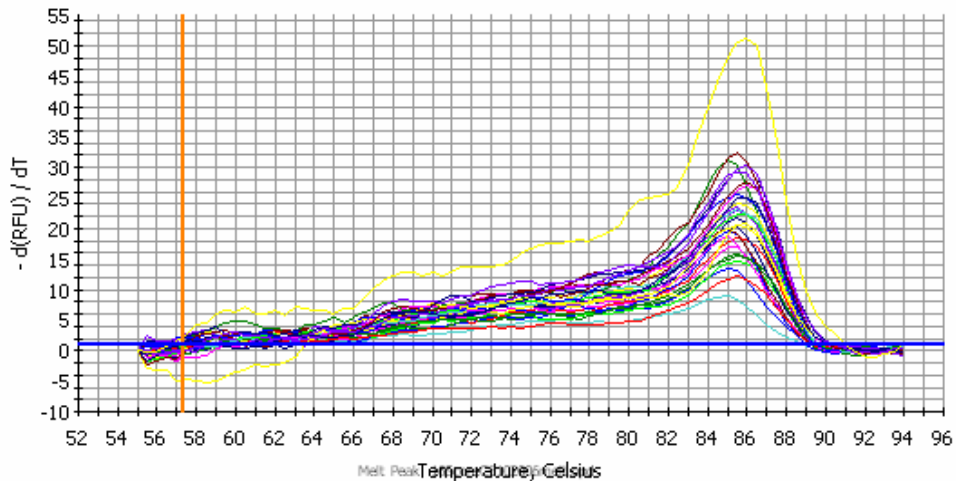
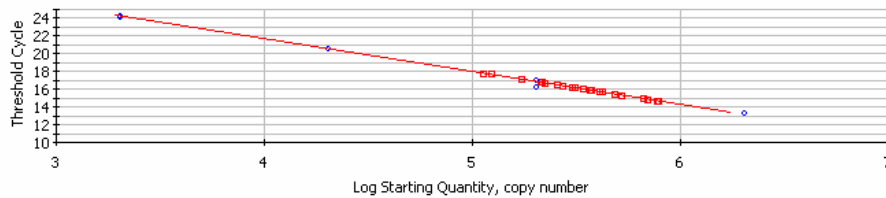
Eingesetzte Kopien

2000	24,29	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	24,34	6,62E-02
20000	20,69	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	20,67	3,15E-02
200000	17,1	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	16,69	5,71E-01
2000000	13,38	6,301	2,00E+06	2,00E+06	N/A	13,38	N/A
2000	24,38	3,301	2,00E+03	2,00E+03	0,00E+00	24,34	6,62E-02
20000	20,64	4,301	2,00E+04	2,00E+04	0,00E+00	20,67	3,15E-02
200000	16,29	5,301	2,00E+05	2,00E+05	0,00E+00	16,69	5,71E-01



Correlation Coefficient: 0,998 Slope: -3,716 Intercept: 36,586 $Y = -3,716 X + 36,586$
 PCR Efficiency: 85,8 %

□ Unknowns
 ○ Standards



H Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Ω	Ohm
A	Adenin, Ampere
abs.	absolut
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ApsA	größere Unterheit der APS-Reduktase
ARB	Softwarepaket für phylogenetische Datenanalyse (von <i>arbor</i> , lat. „der Baum“)
ATP	Adenosin-Triphosphat
b	Basen
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaSO ₄	Kalziumsulfat, Gips
CHISAM	Chloroform/Isoamylalkohol
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'di(X-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindol-Cy3.18-Derivat N-Hydroxysuccimidester
Cy5	5,5'-Disulfo-1,1'di(X-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindol-Cy5.18-Derivat N-Hydroxysuccimidester
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dest.	destilliert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DSR	dissimilatorische (Bi-)Sulfit-Reduktase
<i>dsrAB</i>	Gene der α- und β- Untereinheit der DSR
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß

H Abkürzungsverzeichnis

<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat. „und andere“)
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm, Gravitationskraft (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GC	Mol % Guanin + Cytosin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
K	Kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KbL	„Kilobasen-Leiter“, DNS Längenstandard
LacZ	β-Galaktosidase
LB	Luria Bertani
m	milli (10 ⁻³), Meter
M	molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
NaCl ₂	Natriumchlorid
Pa	Pascal
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamlyalkohol
PCR	„Polymerase Chain Reaktion“, Polymerase Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S ⁰	elementarer Schwefel
S ²⁻	Sulfid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SO ₃ ²⁻	Sulfit
SO ₄ ²⁻	Sulfat

$S_2O_3^{2-}$	Thiosulfat
$S_4O_6^{2-}$	Tetrathionat
SOB	schwefeloxidierende Bakterien
<i>sp.</i>	Art
<i>spp.</i>	Arten
SRP	sulfatreduzierende/r Prokaryot/en
ss	„single stranded“, einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMAC	Tetramethyl-Ammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units (Enzymeinheit), Uracil
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactosid

I Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Michael Wagner für die Möglichkeit danken die Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe erstellen zu dürfen und das unkomplizierte Arbeitsumfeld, das er gedeihen lässt.

Weiterer Dank gilt meinem Betreuer Alexander Loy, der einem die Freiheit gibt selbst zu denken, zu arbeiten und zu planen und der einem in seiner kritischen und genauen Art die Augen für die eigenen Fehler öffnet.

Natürlich denke ich an dieser Stelle an Stephan Duller den wohl besten betreuenden Doktoranten auf der Welt.

Mein liebster Engel Elisabeth Jäger soll nicht nur erwähnt werden, sondern als eine Person hervorgehoben werden, die mehr war als nur eine Unterstützung.

Und allen Leuten des DOME-Teams, die wirklich gute Kollegen und Freunde geworden sind, möchte ich auch danken, da viele mit unglaublicher Geduld meinen abstrusen Geschichten und Theorien gelauscht haben. Natürlich war alles Spaß.

Alberto Robador soll an dieser Stelle ebenfalls erwähnt werden. Erstens für die gute Zeit die wir in Wien hatten, aber auch die Daten, die er freundlicher Weise zur Verfügung gestellt hat.

Meiner Familie möchte ich auch dafür danken, dass sie so sind wie sie sind. Hvala vam, voli vas vaš Ivan.

J Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Ivan Barišić
Geboren am: 24. Mai 1982
Geburtsort: Zagreb, Kroatien
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

1988-1992 Volksschule Wichtelgasse, Wien
1992-1998 Bundesgymnasium Geblergasse, Wien
1998-2000 Bundesgymnasium Zirkusgasse, Wien
2000-2001 Studium der Biologie an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät Wien
2001-2007 Studium der Molekularbiologie an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät Wien
2002- Studium der Politikwissenschaft an der Universität Wien
2005-2007 Diplomarbeit am Department für mikrobielle Ökologie unter der Leitung von Prof. Michael Wagner