







universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

“Molekulare Untersuchung und Charakterisierung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften namibischer Böden”

Verfasser

Ingo Claus Starke

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Wien, im Mai 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 437 444

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ökologie

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Michael Wagner



„On any possible, reasonable or fair criterion, bacteria are—and always have been—the dominant forms of life on Earth. Our failure to grasp this most evident of biological facts arises in part from the blindness of our arrogance but also, in large measure, as an effect of scale. We are so accustomed to viewing phenomena of our scale—sizes measured in feet and ages in decades—as typical of nature.“

Stephen Jay Gould (1941-2002)

“Je suis parmi ceux qui pensent que la science a la grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est également un enfant placé avant les phénomènes normaux qui l'impressionnent comme un conte de fées.“

Marie Curie (1867-1934)

Diese Arbeit widme ich meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1. Lebensraum Boden . . . . .	9
1.1.1. Funktionen des Bodens . . . . .	9
1.1.2. Mikrobielle Biodiversität . . . . .	10
1.1.3. Aktueller Forschungsstand . . . . .	11
1.2. <i>Acidobakterien</i> . . . . .	12
1.2.1. Phylogenie der <i>Acidobakterien</i> . . . . .	13
1.2.2. Physiologie der <i>Acidobakterien</i> . . . . .	14
1.3. Projekthintergründe . . . . .	15
1.3.1. Situation in Namibia . . . . .	15
1.3.2. BIOTA Africa . . . . .	15
1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit . . . . .	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Probensammlung . . . . .	17
2.1.1. Proben . . . . .	19
2.2. Allgemein verwendetes Material . . . . .	20
2.3. Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen . . . . .	26
2.3.1. Standard Puffer . . . . .	26
2.3.2. Puffer für die DNS Extraktion . . . . .	27
2.3.3. Puffer, Lösungen und Standards für die Gel-Elektrophorese . . . . .	27
2.3.4. Nährmedien . . . . .	29
2.3.5. Antibiotikalösungen . . . . .	30
2.3.6. Selektionslösungen . . . . .	30
2.3.7. Lösungen für die Plasmid-Isolierung . . . . .	31
2.4. Die Erstellung einer Klonbibliothek . . . . .	31
2.4.1. Methoden zur DNS-Isolierung . . . . .	31
2.4.2. Qualitative und quantitative Untersuchung der Nukleinsäuren . . . . .	32
2.4.3. <i>In vitro</i> - Amplifikation von DNS-Fragmenten via Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	34
2.4.4. Vervielfältigung der gewünschten Zielgenfragmente . . . . .	34
2.4.5. Kontroll-PCR zur Überprüfung von Kontaminationen durch Plasmid-DNS . . . . .	34

2.4.6.	Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten . . . . .	36
2.4.7.	Anfügen von dATP Überhänge an die PCR-Produkte . . . . .	37
2.4.8.	Klonierung der 16S rRNA-Gen-Amplifikate . . . . .	38
2.4.9.	Kultivierung und Stammhaltung rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme . .	40
2.4.10.	Isolierung von Plasmid-DNS aus rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen . .	41
2.4.11.	DNS-Sequenzierung . . . . .	42
2.4.12.	Sequenzierkit, Primer und Auswertungssoftware . . . . .	42
2.5.	Vergleichende Sequenzanalyse . . . . .	43
2.5.1.	Phylogenie-Softwarepaket ARB . . . . .	43
2.5.2.	Überprüfung auf Chimären . . . . .	43
2.5.3.	Phylogenie . . . . .	44
2.5.4.	Neighbour-Joining . . . . .	45
2.5.5.	Maximum-likelihood . . . . .	45
2.5.6.	Maximum-parsimony . . . . .	46
2.5.7.	Bootstrapping . . . . .	46
2.5.8.	Gruppierung der 16S rRNA-Sequenzen für weitere Analysen . . .	47
2.5.9.	Coverage-Berechnung . . . . .	47
2.5.10.	Rarefaction-Methode . . . . .	47
2.5.11.	Vergleich von Gendatenbanken mit UniFrac . . . . .	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1.	Bakterielle 16S rRNA-Sequenzen aus namibischen Böden . . . . .	50
3.1.1.	Isolierung der genomischen DNS . . . . .	50
3.1.2.	Amplifikation und Klonierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene . .	50
3.1.3.	Sequenzierung . . . . .	53
3.2.	Sequenzanalyse . . . . .	53
3.2.1.	Statistische Analysen . . . . .	53
3.2.1.1.	Coverage-Berechnung . . . . .	54
3.2.1.2.	Rarefaction-Analyse . . . . .	54
3.2.1.3.	Vergleichen der Gendatenbanken mittels Unifrac . . . . .	55
3.2.2.	Phylogenetische Analysen . . . . .	56
3.2.2.1.	Die bakteriellen Sequenzen . . . . .	57
3.2.2.2.	Die acidobakteriellen Sequenzen . . . . .	58

---

<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1. 16S rRNA-basierende Phylogenie . . . . .	60
4.1.1. Genbibliotheken . . . . .	60
4.1.2. Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in namibischen Böden . . . . .	60
4.1.2.1. Coverage-Analyse . . . . .	61
4.1.2.2. Rarefaction-Analyse . . . . .	61
4.1.2.3. UniFrac-Analyse . . . . .	62
4.1.2.4. <i>Acidobacterien</i> . . . . .	62
4.1.2.5. <i>Actinobakterien</i> . . . . .	64
4.1.2.6. <i>Bacilli</i> . . . . .	64
4.1.2.7. <i>Chloroflexi</i> . . . . .	65
4.1.2.8. <i>Verrucomicrobia</i> . . . . .	65
4.1.2.9. <i>Proteobacteria</i> . . . . .	65
4.2. Konklusion . . . . .	66
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6. Summary</b>	<b>69</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>Literatur</b>	<b>75</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>93</b>
<b>B. Curriculum vitae</b>	<b>94</b>



## Abbildungsverzeichnis

1.	Allgemeines Schema von bakteriellen Metabolismen im Kohlenstoffkreislauf mit Verbindung zum Stickstoff- und Schwefelkreislauf unter oxidischen und anoxischen Bedingungen. Aus <i>Einführung in die Geochemie</i> , Killips <i>et al.</i> , 1997. . . . .	10
2.	Bakterienphylogenie basierend auf Maximum-Parsimony Analysen von 5500 16S rRNA Sequenzen. Der Balken gibt 10% Sequenzunterschied an. (Ludwig <i>et al.</i> , 1997) . . . . .	12
3.	Schematischer Baum des Phylums der <i>Acidobacteria</i> basierend auf 16S rRNA Gen-Sequenzen berechnet über eine Maximum-Likelihood Analyse. Der Balken steht für 10 % Sequenzunterschied. (Barns <i>et al.</i> , 2007) . . . . .	13
4.	Forschungstationen in Namibia. ( <a href="http://www.biota-africa.org">www.biota-africa.org</a> ) . . . . .	17
5.	Bodenhorizont; Mutompo (Foto: Michael Hannig, MPI Marburg) . . . . .	18
6.	Offene Waldregion Namibias (Foto: Michael Hannig, MPI Marburg) . . . . .	18
7.	1 % Agarose-Gel (nicht denaturierend) von Beispielen einer kombinierten DNS/RNS Extraktion nach Lueders (Lueders <i>et al.</i> , 2004); ( <b>8,9</b> ) Ackerboden; ( <b>10</b> ) Brachland; ( <b>11</b> ) ursprünglicher Boden; ( <b>L</b> ) Kb Leiter. . . . .	50
8.	1 % Agarose-Gel einer Temperatur-Gradienten-PCR als Beispiel. A1-8, <i>Acidobacterien</i> Template; B1-8 <i>Streptomyces</i> Template; C1-8, <i>Verrucomicrobia</i> Template. Gradient: 47 °C (1) - 67,8 °C (12) . . . . .	51
9.	1 % Agarose-Gelbild einer M13 Screening-PCR als Beispiel. Klone mit Bande bei etwa 1480 bp wurden sequenziert. . . . .	52
10.	Rarefaction-Kurve NamUb . . . . .	55
11.	Rarefaction-Kurve NamBr . . . . .	55
12.	Rarefaction-Kurve NamAc . . . . .	55
13.	Phylogenetischer auf 16S-rRNA basierender Maximum-Likelihood-Baum aller erhaltenen OTUs. Der Balken steht für 10 % Sequenzunterschied. . . . .	56
14.	Verteilung der 16S rRNA-Gene in allen drei Klonbibliotheken . . . . .	57
15.	Neighbour-Joining Baum der Acidobakterien. Die Zahlen in den „Clustern“ stehen für die Anzahl an eingerechneten Sequenzen. Der Längenbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10 %. . . . .	58
16.	Diagramm der erhaltenen Acidobakterien-Gruppen in allen Klonbibliotheken . . . . .	59

## Tabellenverzeichnis

1.	Untersuchte Proben (pers. Mitt. Jörg Overmann) . . . . .	19
2.	Öffentlich zugängliche Software . . . . .	20
3.	Verwendete Laborgeräte . . . . .	20
4.	Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
5.	Verwendete Chemikalien . . . . .	23
6.	Verwendete molekularbiologische Kits . . . . .	25
7.	Primer für M13 PCR . . . . .	36
8.	Programm der M13 PCR Reaktion . . . . .	36
9.	Programm der 16S rRNA PCR . . . . .	36
10.	Verwendete Primer . . . . .	37
11.	Verwendete Kompetitoren . . . . .	37
12.	Primer für die Sequenzierung . . . . .	43
13.	Teperatur-Gradienten der Gradienten-PCR . . . . .	51
14.	Klonbibliotheks-Kategorien der Bodenproben. Die PCR-Produkte der DNS-Extraktionen (Nam 1 - Nam 29) wurden entsprechend der Bodenbehandlungsart gepoolt (NamUb, NamBr, NamAc) . . . . .	52
16.	Anzahl der Klonsequenzen der einzelnen OTUs der drei Genbanken. Sequenzunterschiede betragen 3% . . . . .	54
17.	UniFrac Signifikanz; P-Werte der gesamten Klonbibliothek . . . . .	55
18.	UniFrac Signifikanz; P-Werte der acidobakteriellen Sequenzen . . . . .	56
19.	Acidobakterien-Gruppenverteilung auf die unterschiedlichen Böden . . . . .	59
20.	Bakterielle Sequenzen mit $\geq 90\%$ Sequenzähnlichkeit zu kultivierbaren Mikroorganismen . . . . .	93

# 1. Einleitung

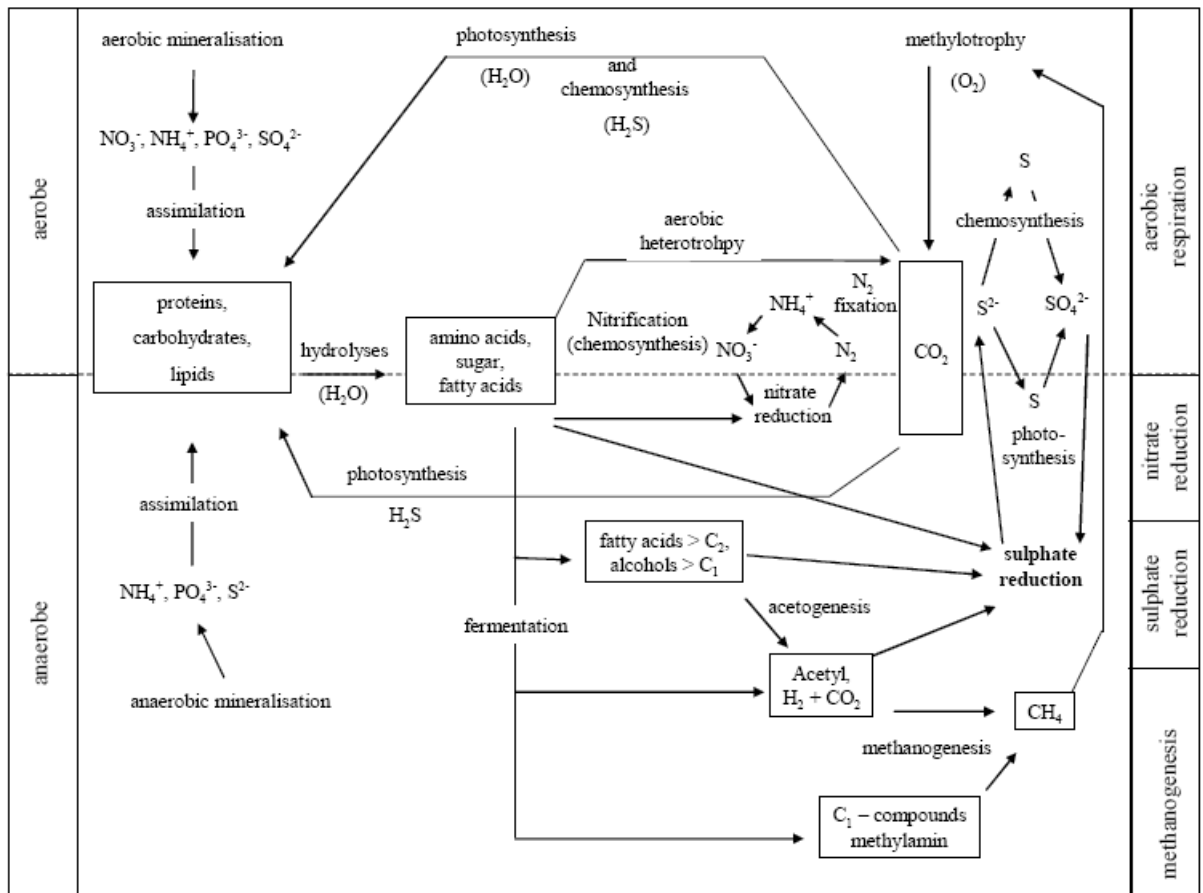
## 1.1. Lebensraum Boden

### 1.1.1. Funktionen des Bodens

Der Boden bildet die Grundlage für Wasser, Nährstoffe und Energie, die für den Aufbau der gesamten Biosphäre nötig ist. Die wichtigsten Elemente die bei den bodenbildenden Prozessen eine Rolle spielen sind Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Schwefel (S) und Phosphor (P) (Hollemann und Wiberg, 1985; von Mering *et al.*, 2007). In den meisten terrestrischen Habitaten beginnt die Kompostierung, also die Zersetzung organischen Materials mit der hydrolytischen Depolymerisation von langkettigen Makromolekülen wie Proteine, Polysaccharide und Fette. Dabei werden mittels extrazellulärer Enzyme organische Polymere in Monomere umgewandelt. Die hierbei entstehenden Aminosäuren, Monosaccharide und Fettsäuren werden dann unter oxidischen oder anoxischen Bedingungen mineralisiert. Bakterielle Gemeinschaften in Böden sind integraler Bestandteil von biogeochemischen Prozessen terrestrischer Ökosysteme. Trotz des enormen Einflusses von bodenbewohnenden Mikroorganismen ist deren Verteilung, Zusammensetzung und Funktion noch weitgehend unbekannt, da nur 0,3% bislang kultiviert werden konnten (Gans *et al.*, 2005). Dabei erfüllen sie die Aufgabe Stoffe über Fermentations- und Mineralisierungsprozesse umzusetzen und wiederum höheren Organismen zur Verfügung zu stellen und sind damit die wichtigsten Akteure aller Stoffkreisläufe im Boden (Abb. 1).

Bakterielle Lebensgemeinschaften in Böden sind in ständiger Wechselwirkung und Korrelation mit Bodengeologie, Klima, Humidität und Nährstoffgehalt. Doch nicht nur abiotische und trophische Faktoren sind wichtige Einflussgrößen. Die Vegetation und deren Diversität sind maßgeblich an der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden beteiligt (Grüter *et al.*, 2006). In der Rhizosphäre selektieren Pflanzen für bestimmte Bakteriengesellschaften über den Eintrag von Nährstoffen und abgestorbenen Wurzelteilen (Kowalchuk *et al.*, 2002; Kurske *et al.*, 2002; Smalla *et al.*, 2005). Über Fettsäure-Methylester-Analysen konnte festgestellt werden, dass die Veränderung der Bodenbestellung im Ackerbau die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens entscheidend beeinträchtigte, da sich der Anteil an organischem Kohlenstoff, Stickstoff, Nitrat und Ammonium veränderte und die Gesamtzellzahl der Mikroorganismen beeinflusste (Pankhurst *et al.*, 2002). Dabei sei zu erwähnen, dass unterschiedliche Einflussfaktoren in der Umwelt nicht unabhängig voneinander auftreten und somit unterschiedliche Pflanzenarten verschiedenste chemische Milieus im Boden schaffen können

(Bezemer *et al.*, 2006). Deshalb sind für die Untersuchung der mikrobiellen Diversität neben sensiblen Monitoring-Techniken auch unabhängige Untersuchungen der unterschiedlichen Umweltparameter unter kontrollierten experimentellen Bedingungen notwendig.



**Abbildung 1:** Allgemeines Schema von bakteriellen Metabolismen im Kohlenstoffkreislauf mit Verbindung zum Stickstoff- und Schwefelkreislauf unter oxidischen und anoxischen Bedingungen. Aus *Einführung in die Geochemie*, Killips *et al.*, 1997.

### 1.1.2. Mikrobielle Biodiversität

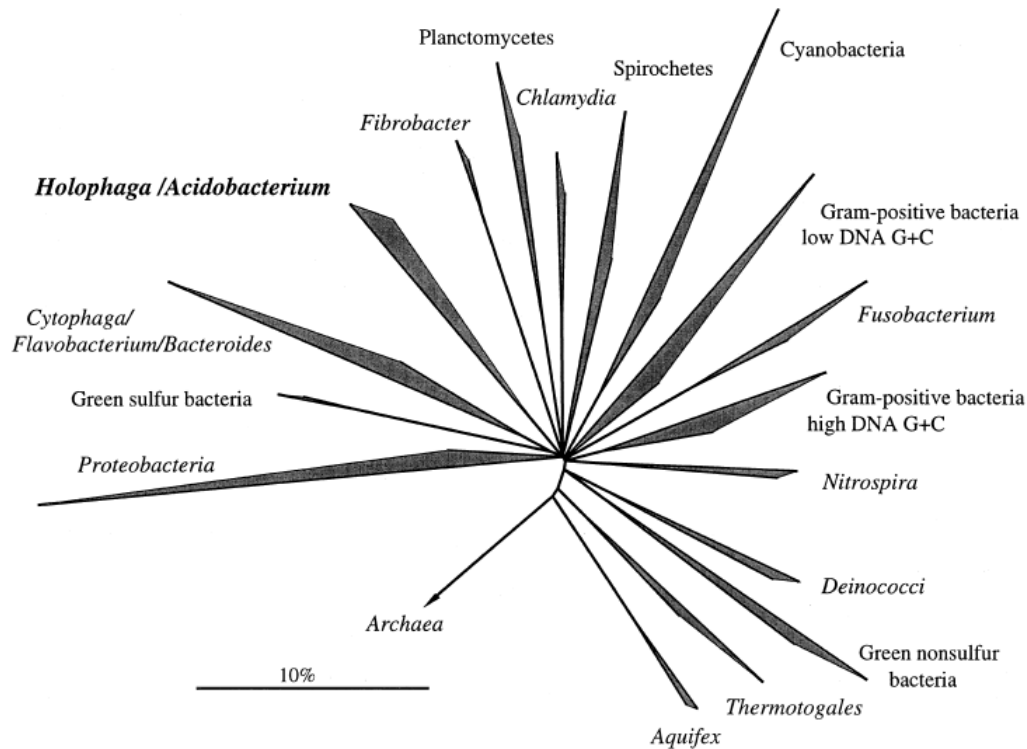
Seit mehr als einem Jahrhundert versuchen Mikrobiologen den Artenreichtum der Mikroorganismen im Boden zu erfassen (Schloss and Handelsman, 2006). Doch die extreme Komplexität und die noch unbekanntenen Strukturen von mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den verschiedenen Bodenhabitaten machen es nahezu unmöglich rasche und detaillierte Antworten zu finden (Torsvik *et al.*, 1990). Für die Erfassung von  $10^9$  bakteriellen Zellen pro Gramm Boden (Whitman *et al.*, 1998) und deren Einteilung in taxonomische Klassifikationen bedarf es nicht nur einer Fülle an Methoden und Herangehensweisen

sondern letztlich auch einer angemessenen Definition des Terminus „Art“. Es existieren viele unterschiedliche Konzepte um eine prokaryotische Art zu charakterisieren. Eine derzeit gängige Definition geschieht unter Zuhilfenahme molekularbiologischer Daten. Dabei fasst man all jene Stämme zur selben Art, deren DNS zu mindestens 70 % hybridisieren und eine 16S rRNA Sequenzübereinstimmung von mehr als 97 % aufweisen (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt und Goebel, 1994). Dennoch bestimmt die Methode zur Erfassung der mikrobiellen Biodiversität letztendlich die Ergebnisse und den Datenumfang einer Erhebung.

### 1.1.3. Aktueller Forschungsstand

Kultivierungsbasierende Methoden lassen vermuten, dass ein Gramm Boden lediglich 100 Arten umfasst (Dunbar *et al.*, 1999). Es ist jedoch bekannt, dass sich weniger als 1 % aller Bodenbakterien kultivieren lässt (Amann *et al.*, 1995). Kultivierungsunabhängige Methoden beinhalten DNS-Hybridisierungstechniken und die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. Dabei handelt es sich um die kleine Untereinheit der ribosomalen RNA (SSU), die sich aufgrund ihrer Eigenschaften gut als phylogenetischer Marker eignet (Woese 1987). Böden können jedoch Millionen von Bakterien unterschiedlicher 16S rRNA Gensequenzen beherbergen (Sandaa *et al.*, 1999). Betrachtet man dabei nur die bakterielle DNS ergeben sich 4000 bis 10.000.000 Genomequivalente pro 10 oder 30 Gramm Boden (Ovreas *et al.*, 1998; Torsvik *et al.*, 1996; Dykhuizen *et al.*, 1990; Gans *et al.*, 2005) abhängig von Zellwachstumsrate und Ressourcenangebot. Gemäß dieses Ausmaßes an intergenomischen Variationen eignen sich DNS-Hybridisierungstechniken kaum zur Abschätzung oder vergleichenden Analyse unterschiedlicher mikrobieller Gemeinschaften. Alternativ dazu bietet die Analyse von 16S rRNA-Gensequenzen aus Böden, die über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden die Möglichkeit phylogenetische Untersuchungen durchzuführen und „operational taxonomic units“ (OTU's) zu definieren (Pace *et al.*, 1985). Diese Vorgehensweise, taxonomische Zusammensetzungen von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden über die 16S rRNA-Gene zu ermitteln findet bereits vielfache Anwendung in der mikrobiellen Ökologie (Hugenholtz *et al.*, 1998; Buckley und Schmidt, 2003). Diese Methode ermöglichte es die enormen Mengen an Sequenzinformationen zu erfassen und bestimmten taxonomischen Gruppen zuzuordnen (Abb. 2). Dabei ergaben Studien, dass bestimmte Bakteriengruppen mit größerer Häufigkeit in mikrobiellen Gemeinschaften in Böden auftreten (Buckley und Schmidt, 2001). Es handelt sich hierbei vorwiegend um *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaproteobakterien*, *Actinobakterien* (Gram-positive Bakterien mit hohem genomischen G + C Gehalt), *Bacteroidetes*,

*Chloroflexi*, *Planctomyceten*, und *Verrucomicrobia* sowie die für die vorliegende Arbeit relevanten *Acidobacteria* (Janssen 2006).



**Abbildung 2:** Bakterienphyla basierend auf Maximum-Parsimony Analysen von 5500 16S rRNA Sequenzen. Der Balken gibt 10% Sequenzunterschied an. (Ludwig *et al.*, 1997)

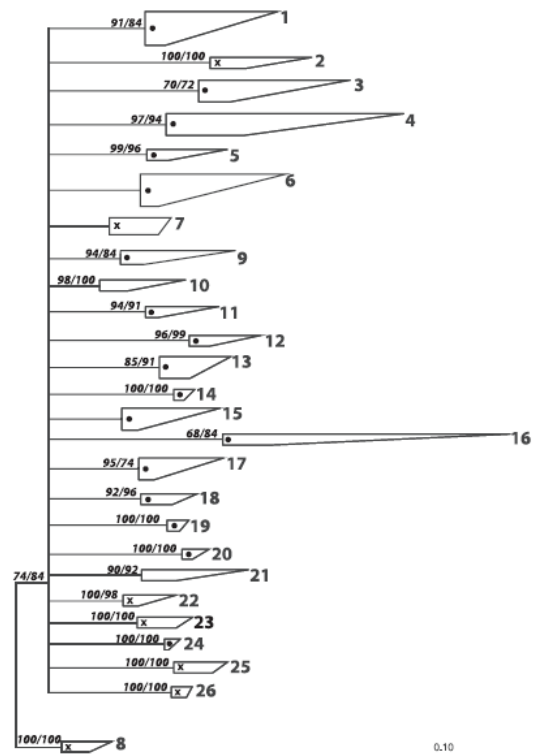
## 1.2. Acidobakterien

Mitte der Neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wird ein bis dato noch unbekanntes Bakterienphylum entdeckt und es scheint eine entscheidende Rolle in terrestrischen Ökosystemen zu spielen. Als erster Vertreter der *Acidobakterien* wurde 1991 *Acidobacterium capsulatum* aus sauren Abwässern von Bergwerken in Japan isoliert (Kishimoto *et al.*, 1991). 1995 wurde dann erstmals das Phylum „*Acidobacteria*“ in der Fachliteratur beschrieben (Hiraishi *et al.*, 1995). Molekulare Untersuchungen bestätigten die hohe Abundanz von *Acidobakterien* in Böden und verschafften Einblick in die phylogenetische Diversität dieses Phylums (Kuske *et al.*, 1997). Weitere Nachforschungen ergaben, dass *Acidobakterien* ubiquitär vorkommen und sie bisweilen zu den am meisten auftretenden Bakterien im Boden zu zählen sind (Janssen 2006). Weiters wurden sie in Sedimenten, Feuchtbiotopen, Torfmooren, Abwassersystemen (Kleinstaub *et al.*, 2008) und im Darmtrakt von Arthropoden (Park *et al.*, 2007) nachgewiesen. Unter Beachtung die-

ser Vielfalt und dieses ökologischen Verteilungsmusters ist diese Gruppe vergleichbar mit den bereits gut untersuchten *Proteobakterien* (Hugenholtz *et al.*, 1998; Barns *et al.*, 1999).

### 1.2.1. Phylogenie der *Acidobakterien*

Trotz ihrer Ubiquität ist über *Acidobakterien* wenig bekannt. Da die Kultivierung dieser Bakterien nur in wenigen Fällen gelang, konnten bislang nur acht Arten beschrieben werden: *Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans*, *Holophaga foetida* (Garrity *et al.*, 2004), *Edaphobacter aggregans*, *Edaphobacter modestus*, *Chloracidobacterium thermophilum*, *Solibacter usitatus* (Ellin6076) und *Terriglobus roseus* (Bryant *et al.* 2007; Eichhorst *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2009). Viele Sequenzen repräsentieren in den öffentlichen Datenbanken (Ribosomal Database Project, RDP II v10.4) dieses Phylum und nahezu alle *Acidobakterien*-spezifischen Sequenzen stammen von unkultivierten Bodenbakterien (Lee *et al.*, 2008). Vielfach wurde versucht die Kultivierungstechniken zu optimieren, um Einblick in die ökologischen Nischen von *Acidobakterien* zu erhalten: Aber trotz pH-Wert Verringerung im Medium, CO<sub>2</sub> Erhöhung im Gasraum, Substratmodifikation oder Optimierung der Inkubationszeiten sind 75% der isolierten *Acidobakterien* der Untergruppe 1 (subdivision 1) zuzuordnen (Jones *et al.*, 2009). Derzeit sind 26 Untergruppen von *Acidobakterien* phylogenetisch definiert (Barns *et al.*, 2007) (Abb. 3). In Böden sind die Untergruppen 1, 4 und 6 dominierend. *Acidobacterium capsulatum* und *Terriglobus roseus* sind der Untergruppe 1 zuzuordnen. Obwohl diese Gruppe die meisten Vertreter der *Acidobakterien* umfasst, ist ausschließlich *A. capsulatum* azidophil (pH 3,0 bis pH 6,0) (Sait *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003; Stevenson *et*



**Abbildung 3:** Schematischer Baum des Phylums der *Acidobacteria* basierend auf 16S rRNA Gen-Sequenzen berechnet über eine Maximum-Likelihood Analyse. Der Balken steht für 10% Sequenzunterschied. (Barns *et al.*, 2007)

*al.*, 2004; Eichhorst *et al.*, 2007). In Anbetracht der hohen Diversität in terrestrischen Ökosystemen ist dennoch eine erhebliche Anzahl von noch unentdeckten neuen Arten in diesem Phylum zu vermuten (Koch *et al.*, 2008).

### 1.2.2. Physiologie der *Acidobakterien*

Doch auch innerhalb der Untergruppen sind die kultivierbaren Arten physiologisch sehr verschieden: *Geothrix fermentans* ist strikt anaerob und *Holophaga foetida* ist obligat anaerob. Sie sind Vertreter der Untergruppe 8, unterscheiden sich aber grundlegend im Energiehaushalt und Stoffwechsel (Coates *et al.*, 1999; Bak *et al.*, 1992). Bei einer Studie von Ward *et al.* (2009) wurde das Genom von *Acidobacterium capsulatum*, "*Candidatus Koribacter versatilis*" Ellin345 (Untergruppe 1) und *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076 (Untergruppe 3) untereinander verglichen. Dabei ergaben sich genomische Ähnlichkeiten zu *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* und *Fungi*. Sie sind fakultativ heterotroph und unter der Nutzung von Kohlenstoffquellen werden Einfachzucker zu komplexeren Substraten wie Hemizellulose, Zellulose und Chitin synthetisiert. Die genomische Annotation ergab, daß Membranproteine der Major-Facilitator-Superfamilie sowie ABC-Transporter für Saccharide decodiert werden, welche eine Anpassung an Nährstoffmangel im Substrat darstellen könnte. Sie scheinen die Fähigkeit zu besitzen Nitrat und Nitrit zu reduzieren, ohne jedoch zur Stickstofffixierung oder Denitrifikation imstande zu sein. Die Genome enthielten Gene die für Siderophor-Rezeptoren, ohne nachgewiesene Siderophor-Synthese codieren. Dies ließe den Schluss zu, daß Eisen nur in Interaktion mit anderen Mikroorganismen aufgenommen wird. Das Vorhandensein von Zellulose-Synthese-Genen und hoch-molekularen Exkretions-Proteinen läßt auf eine Trockenheits-Resistenz, Biofilm-Bildung und auf pedogenetische Eigenschaften schließen. Darüber hinaus fanden sich antimikrobielle Komponenten wie Polyketide und Makrolide und eine Vielzahl neuartiger proteincodierender Gene. Das weltweite Vorkommen von *Acidobakterien* in Böden und die potentielle Kohlenstoffnutzung weisen auf eine signifikante und bisher unterschätzte Beteiligung am terrestrischen Kohlenstoffkreislauf hin. Die genomischen Eigenschaften der acidobakteriellen Zellen deuten auf langlebige, sich langsam teilende Organismen, die unter nährstoffarmen Bedingungen einen langsamen Metabolismus zeigen, und an Fluktuationen der Bodenfeuchtigkeit angepasst sind (Ward *et al.*, 2009).



### 1.3. Projekthintergünde

#### 1.3.1. Situation in Namibia

Die intensive Landwirtschaft in der Kavango-Region in Namibia führt langfristig zu Nährstoffverlust im Boden und damit zu Ertragseinbußen im Feldbau. Mikroorganismen spielen eine Schlüsselrolle in terrestrischen Ökosystemen, zum Beispiel im Abbau von abgestorbenen Pflanzenteilen und in der Bereitstellung von Nährstoffen. Während einige Bakterien antropogene Einflüsse kompensieren können oder gar davon profitieren, besetzen Andere Nischen, die durch Eutrophierung und Auswaschung der Böden zerstört werden können. Dennoch bedarf es in einem funktionierendem Ökosystem jener Spezialisten, die auch Nährstoffe aufbereiten, die nur in geringen Mengen vorhanden sind. Landwirtschaft, Viehweide und immer wiederkehrende Brände in den Waldregionen im Norden Namibias führen zu trockenen Böden und vermehrtem Auftreten von Winderosion (Eppart *et al.*, 1996). Welchen Einfluss diese Ereignisse auf die mikrobielle Zusammensetzung und deren Aktivität nehmen ist weitgehend unbekannt.

#### 1.3.2. BIOTA Africa

BIOTA Africa ist eine Initiative zwischen europäischen und afrikanischen Wissenschaftern, die sich der Untersuchung und Beobachtung afrikanischer Ökosysteme und deren Biodiversität widmet. Aufgrund des drohenden Rückgangs vieler Lebensräume und das damit einhergehende Artensterben wurde ein Monitoring-Netzwerk entwickelt, welches über den gesamten afrikanischen Kontinent verteilt angelegt wurde. Ziel dieses Unterprojektes ist herauszufinden, in wie fern sich die menschliche Überbeanspruchung der Bodenressourcen auf die Diversität und Zusammensetzung mikrobieller Schlüsselpopulationen auswirken. Daraus soll in weiterer Folge abgelesen werden können, welche Organismen sich als Bioindikator eignen und welche Maßnahmen für die nachhaltige Nutzung in der Landwirtschaft und zum Erhalt fruchtbarer Böden gesetzt werden können.

### 1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit sollen die bakteriellen Gemeinschaften von verschiedenen Böden in Namibia anhand 16S rRNA basierender Techniken analysiert werden. Dabei wurde Hauptaugenmerk auf das Phylum der *Acidobakterien* gelegt. Die Diversität der Bakterien wurde jeweils in den unterschiedlich beeinträchtigten Böden untersucht. Dazu wird landwirtschaftlich genutzter Boden mit brachliegendem bzw. ursprünglichem Boden als

Kontrolle verglichen um einen möglichen menschlichen Einfluss ermitteln zu können. Es soll versucht werden Schlüsselgruppen von *Acidobakterien* zu bestimmen und gewissen Bodentypen und Bodenbedingungen wie Fruchtbarkeit zuordnen zu können. Die Identifizierung dieser Bioindikatoren soll Vorhersagen über den menschliche Einfluss des Ackerbaus in der Kavango-Region ermöglichen, die aufgrund der Präsenz oder Aktivität spezieller Mikroorganismen in Anbetracht des Bodenzustandes wie zum Beispiel dessen Fruchtbarkeit getroffen werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probensammlung

Das untersuchte Areal befindet sich in der Kavango Region im Norden Namibias (Abb. 4). Das Gebiet besteht aus trockener Waldvegetation und ist von antropogener Landnutzung und immer wieder kehrenden Waldbränden beeinträchtigt. Die Proben wurden im März des Jahres 2007 an zwei unterschiedlichen Standorten (Gemeindegebiet Mutompo; Forschungsstation Mile 46) in Zusammenarbeit mit anderen BIOTA und BIOLOG Partnern des *Microbial Project Network* gesammelt. Die Probennahme wurde in einem 100 ha großem Einzugsbereich vorgenommen. Dieser befindet sich auf einer durchschnittlichen Meereshöhe von 1100 m. Die durchschnittliche Lufttemperatur beträgt 22 °C und die durchschnittliche Niederschlagsmenge liegt zwischen 95,4 mm im Jänner und 0 mm im Juli. Die Bodentemperatur variiert zwischen 18,0 °C im Juli und 29,6 °C im Jänner. Die vorherrschende Bodenart sind lehmig-tonige Sande aus dem Tertiär, die von äolischen Sanden überlagert werden. Die Tonminerale im Boden bestehen aus 59 % Smektit, 34 % Illit und 7 % Kaolinit, das Sediment besteht zu 93 % bis 97 % aus SiO<sub>2</sub> (Winterstein 2003). In Summe wurden 29 Bodenproben aus einer Tiefe von 10 cm von unterschiedlich landwirtschaftlich genutzten Flächen entnommen. (Tab. 1)



**Abbildung 4:** Forschungsstationen in Namibia. ([www.biota-africa.org](http://www.biota-africa.org))



**Abbildung 5:** Bodenhorizont; Muto-mpo (Foto: Michael Hannig, MPI Marburg)



**Abbildung 6:** Offene Waldregion Namibias (Foto: Michael Hannig, MPI Marburg)

## 2.1.1. Proben

**Tabelle 1:** Untersuchte Proben (pers. Mitt. Jörg Overmann)

Probe	Datum	Probenahmestelle		Bodenart <sup>a</sup>	Landnutzung <sup>b</sup>
		Breitengrad	Längengrad		
Nam 1	19.03.2007	18°17'14,7"	19°17'28,3"	LD	Bj
Nam 2	19.03.2007	18°17'14,4"	19°17'20,7"	LD	Bj
Nam 3	19.03.2007	18°17'10,4"	19°17'26,9"	LD	Bj
Nam 4	19.03.2007	18°16'0,5"	19°15'57,2"	L	Aa
Nam 5	19.03.2007	18°16'1,0"	19°15'55,4"	L	Aa
Nam 6	19.03.2007	18°16'4,6"	19°15'55,5"	S	U
Nam 7	20.03.2007	18°19'11,2"	19°18'44,7"	LD	Aa
Nam 8	20.03.2007	18°19'10,0"	19°18'39,3"	LD	Aa
Nam 9	20.03.2007	18°19'8,6"	19°18'35,0"	LD	Aa
Nam 10	20.03.2007	18°19'11,3"	19°18'45,7"	LD	Ba
Nam 11	21.03.2007	18°18'27,3"	19°15'45,8"	L	U
Nam 12	21.03.2007	18°18'25,4"	19°15'37,5"	L	U
Nam 13	21.03.2007	18°18'33,5"	19°15'45,5"	S	U
Nam 14	21.03.2007	18°18'28,4"	19°16'5,0"	L	Aj
Nam 15	21.03.2007	18°18'8,0"	19°15'52,3"	S	U
Nam 16	21.03.2007	18°17'14,0"	19°15'32,3"	LD	U
Nam 17	22.03.2007	18°19'10,7"	19°19'15,5"	L	Ba
Nam 18	22.03.2007	18°19'15,4"	19°19'7,7"	L	Aj
Nam 19	22.03.2007	18°19'7,1"	19°19'11,8"	L	Ua
Nam 20	22.03.2007	18°19'0,6"	19°18'28,3"	L	Ba
Nam 21	22.03.2007	18°19'0,5"	19°18'30,0"	L	Aj
Nam 22	22.03.2007	18°19'38,0"	19°18'28,7"	LD	Bj
Nam 23	22.03.2007	18°19'40,9"	19°18'30,6"	L	Bj
Nam 24	23.03.2007	18°17'5,4"	19°15'35,6"	L	U
Nam 25	23.03.2007	18°17'9,6"	19°15'37,8"	LD	U
Nam 26	24.03.2007	18°19'0,4"	19°18'20,5"	LD	Am
Nam 27	24.03.2007	18°18'59,6"	19°18'19,8"	S	Am
Nam 28	24.03.2007	18°18'51,9"	19°18'16,2"	L	Bj
Nam 29	24.03.2007	18°18'38,3"	19°17'49,6"	L	Aa

<sup>a</sup>LD (lehmig, dunkel); L (lehmig, rot oder braun); S (Sand)

<sup>b</sup>B (Brachland); U (unberührt); A (Ackerland);

j (jung, zwischen 3 und 10 Jahre); m (mittel, zwischen 10 und 20 Jahre); a (alt, > 20 Jahre)

## 2.2. Allgemein verwendetes Material

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind, falls nicht anders angegeben via einer Reinstwasseranlage (Ultra Clean™, Barsbüttel, Deutschland) doppelt destilliertem und gefiltertem Wasser ( $H_2O_{bidest}$ ) hergestellt worden. Die Chemikalien (Tab. 5) wurden in p.a. Qualität bezogen und verwendet. Des Weiteren wurden alle Puffer und Lösungen vor Gebrauch bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von  $1,013 \times 10^5$  Pa für 20 min. mit einem Dampfdruck-Autoklaven (Varioclav 135 H+P, München, Deutschland) sterilisiert. Temperatursensitive Lösungen und Substanzen wurden filtriert (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, Qualilab®<sup>®</sup>, Merck Labor und Vertriebs GmbH, Bruchsal, Deutschland). Falls nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte mittels einer Tischzentrifuge (Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei Raumtemperatur (RT) bewerkstelligt. Öffentlich zugängliche Software (Tab. 2), Laborgeräte (Tab. 3), Verbrauchsmaterialien (Tab. 4) und Chemikalien (Tab. 5) sind im Folgenden detailliert angegeben:

**Tabelle 2:** Öffentlich zugängliche Software

Programm	Webadresse	Referenz
ARB Phylogeny Software	<a href="http://www.arb-home.de">http://www.arb-home.de</a>	Ludwig <i>et al.</i> , 2004
Basic Local Alignment Search Tool	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	Altschul <i>et al.</i> , 1990
Chromas Pro 1.42	<a href="http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html">http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html</a>	Technelysium Pty Ltd
DOTUR	<a href="http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html">http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html</a>	Schloss and Handelsmann 2005
FinchTV 1.4.0	<a href="http://www.geospiza.com/finchtv/">http://www.geospiza.com/finchtv/</a>	Geospiza, Inc.; Seattle, Wa, USA;
GenBank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>	Benson <i>et al.</i> , 2002
Lyx - The document processor	<a href="http://www.lyx.org/home">http://www.lyx.org/home</a>	LYX
Pintail	<a href="http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft">http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft</a>	Ashelford <i>et al.</i> , 2005
Ribosomal Database Project	<a href="http://www.rdp.cme.msu.edu">http://www.rdp.cme.msu.edu</a>	Cole <i>et al.</i> , 2003
UniFrac	<a href="http://www.bmf2.colorado.edu/unifrac">http://www.bmf2.colorado.edu/unifrac</a>	Lozupone <i>et al.</i> , 2006

**Tabelle 3:** Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Bead beater Fast Prep FP 120	Savant Instruments Inc. Holbrook, New York

Gerät	Hersteller
Zentrifugen: Mikro 22R Rotina 35S	Andreas Hettich GmbH & Co. Kg, Tuttlingen Deutschland
DNS Sequencer Applied Biosystems 3130	Applied Biosystems Lincoln, USA
Gelschlitten: Sub-Cell UV-Transparent Gel Tray (15x15cm)	Biorad, München, Deutschland
Gelelektrophorese Apparaturen: Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem MediaSystem FlexiLine 4040	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Heizblock VWR Digital Heatblock	VWR International, West Chester, PA, USA
Laminarströmungs Sterilbank Safe 2010 Model 1.2	Holten, Juan Nordic, Allerød, Dänemark
Mikrowellenofen MD6460	Microstar
Magnetrührer: RTC basic Variomag® Maxi	IKA Werke®, GmbH, Schwabach, Deutschland Variomag®, Dayton Beach, Fl, USA
PCR Thermocycler: iCycler System Mastercycler Gradient	Biorad, München, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV SterilisationsWerkbank	Peqlab Biotechnology, GmbH, Deutschland
pH-Meter WTW Inolab Level 1	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetten: Pipetman® P1-P1000 Eppendorf Research Pipettes 1 - 1000 µl	Gilson International, Wien, Österreich Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Photometer: NanoDrop® ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Reinstwasseranlage	UltraClear TM, Barsbüttel, Deutschland
Rundschüttler Inova 2300	New Brunswick Co., Inc., Madison NJ, USA
Stromquelle für Gelelektrophorese-Apperatur: PowerPac Basic	Biorad, München, Deutschland
Transilluminator UST-30M-8T (312 nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NJ, USA
Wasserbad: DC 10	Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland
WasserdampfHochdruck Autoklaven: Varioklav 135S Varioklav 25T	H+P, München, Deutschland H+P, München, Deutschland

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG) verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyer Gefäße, DURAN®, verschiedene Größen	Schott Glas, Mainz, Deutschland
Microseal Filme: Microseal „A“ Film Microseal „B“ Film	MJ Research, Waltham, MA, USA Biorad, München Deutschland
Mikrotitterplatten: Mikrotitterplatten Microseal™96, V-Boden ThermoFast® 96, PCR Platten U96 MicroWell™Platten, 0,5 ml	MJ Research, Waltham, MA, USA Preqlab Biotechnologies GmbH, Deutschland Nunc™Serving Live Science, Roskilde, Dänemark



Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pasteurpipetten	Zefa Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Phase Lock Gel Heavy Reaktionsgefäße, 2,0 ml	5 Prime GmbH, Hamburg, Deutschland
Petrischalen, Schale 94/16	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Probengefäße, 50 ml	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter, 0,22µm Porengröße, CMMembran	Qualilab® <sup>®</sup> , Merck Labor und Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland

**Tabelle 5:** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose: Agarose, Electrophoresis Grade NuSieve® 3:1 (low melting)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA Bio Science, Rockland Inc., Rockland, ME, USA
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Borsäure	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs Inc., Beverly, ME, USA
Bromphenolblau	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Eisen(II)sulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
Etylendiamintetraacetat (EDTA)	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Ficoll	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Glucose	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Oxoid Ltd., Hampshire, England
Isopropanol (2-propanol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kalziumkarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin, monosulfat	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
NatriumDodecylSulfat (SDS)	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz

Chemikalie	Hersteller
NatriumdiHydrogenphosphat	J.T. Baker, Deventer, Holland
diNatriumhydrogenphosphat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumhydroxid	J.T. Baker, Deventer, Holland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)Chlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Chloroform/IsoamylAlkohol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Stärke, löslich	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SYBR® Green I	Cambrex Bio Science, Rockland Inc., Rockland, MA, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Oxoid Ltd., Hampshire, England
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
XGal (5brom4chlor3indoxylβD-galactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Zink(II)sulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 6:** Verwendete molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
AllPrep DNS/RNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PowerSoil™DNS Kit	MOBio Lab, Inc., Salana Beach, CA, USA

Kit	Hersteller
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick gel extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning®	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
QuantiT <sup>TM</sup> PicoGreen® dsDNS Assay Kit	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

## 2.3. Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen

### 2.3.1. Standard Puffer

#### 1. TE Puffer<sup>1</sup>

- Tris 10 mM
- EDTA 5 mM

#### 2. PBS

##### a) PBS Stammlösung<sup>2</sup> (Na<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>)

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (200 mM) 35,6 g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200 mM) 27,6 g/l

##### b) 1 × PBS

- NaCl (130 mM) 7,6 g/l
- PBS Stammlösung (10 mM) 50 ml/l
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml
  - pH 7,2 - 7,4

##### c) 3 × PBS

- NaCl (390 mM) 22,8 g/l
- PBS Stammlösung (30 mM) 150 ml/l
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml
  - pH 7,2 - 7,4

<sup>1</sup>pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt

<sup>2</sup>pH wurde auf 7,2 - 7,4 eingestellt

### 2.3.2. Puffer für die DNS Extraktion

1. NaPo<sub>4</sub>Puffer, pH 8,0

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 112,87 mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,12 mM

2. TNS Lösung

- TrisHCl, pH 8,0 500 mM
- NaCl 100 mM
- SDS 10 % (w/v)

3. PEG Lösung

- Polyethylenglycol 30 % (w/v)
- NaCl 1,6 M

4. EB Puffer

- TrisHcl, pH 8,5 10 mM

### 2.3.3. Puffer, Lösungen und Standards für die Gel-Elektrophorese

1. TAE Puffer

a) 50 × TAE<sup>3</sup>

- Tris 2 M
- Natriumacetat 500 mM
- EDTA 50 mM

b) 1 × TAE

- 50 x TAE 20 ml/l
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 l

2. TBE Puffer

a) 10 × TBE

---

<sup>3</sup>pH Wert wurde mit reiner Essigsäure auf 8,0 eingestellt

- Tris (890 mM) 162,0 g/l
- Borsäure (890 mM) 27,0 g/l
- EDTA (20 mM) 9,3 g/l
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml
  - pH 8,3 - 8,7

b) 1 × TBE

- 10 x TBE 100 ml/l
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml/l

3. Ladepuffer

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

4. Etidiumbromid Lösung

- Etidiumbromid Stammlösung
  - 10 mg/ml Etidiumbromid (EtBr) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Etidiumbromid Färbelösung
  - EtBrStammlösung im Verhältnis 1:10.000 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst

5. SYBR® Green I Lösung

- SYBR® Green I Färbelösung
  - SYBR® Green I Stammlösung im Verhältnis 1:10.000 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst

6. DNS Leiter (KbL)

- GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

### 2.3.4. Nährmedien

#### 1. *Escherichia coli* (*E. Coli*) Stämme

- Luria Bertany Medium<sup>4</sup> (LB Medium)
  - Trypton 10,0 g/l
  - Hefeextrakt 5,0 g/l
  - NaCl 5,0 g/l
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml
    - pH 7,0 - 7,5
- SOCMedium
  - Trypton 5 % (w/v)
  - Hefeextrakt 0,5 % (w/v)
  - NaCl 10,0 mM
  - KCl 2,5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> 10,0 mM
  - MgSO<sub>4</sub> 10,0 mM
  - Glucose 20,0 mM

#### 2. *Streptomyces africanus* Reinkultur

- ISP Medium 4
  - Stärke, löslich 10,0 g/l
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g/l
  - MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 1,0 g/l
  - NaCl 1,0 g/l
  - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 2,0 g/l
  - CaCO<sub>3</sub> 2,0 g/l
  - FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 2,0 mg/l
  - MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 2,0 mg/l

---

<sup>4</sup>Für das Festmedium wurden 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugegeben

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  2,0 mg/l
- Agar 20,0 g/l
- $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$  ad 600 ml
- ISP Medium 1
  - Trypton 5,0 g/l
  - Hefeextrakt 3,0 g/l
  - $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$  ad 1000 ml

### 2.3.5. Antibiotikallösungen

Für Festmedien wurde die Endkonzentration der Antibiotika durch Zugabe zum bereits autoklavierten und auf  $\leq 60^\circ\text{C}$  abgekühlten Medium erreicht. Zu Flüssigmedien wurden Antibiotika unmittelbar vor Verwendung zugegeben. Antibiotikahaltige Medien wurden auf  $4^\circ\text{C}$  gelagert und binnen 4 Wochen verwendet. Die Antibiotika Stammlösungen wurden wie im folgendem Abschnitt beschrieben hergestellt, sterilfiltriert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

- Kanamycin Stammlösung

Kanamycin [100 mg/ml] wurde in  $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$  gelöst und mit dem Medium auf eine Endkonzentration von 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gebracht.

### 2.3.6. Selektionslösungen

- X-Gal Stammlösung

Die X-Gal Lösung wurde für den TOPO TA Klonierungsprozess verwendet, um auf einer LB-Agar Platte ein blau/weiß screening von transformierten Zellen zu ermöglichen. Sie wurde wie folgt hergestellt:

X-Gal [40mg/ml] wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst, sterilfiltriert (Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$ ) und bei  $-20^\circ\text{C}$  lichtgeschützt gelagert.

Um Zellen mit dem richtigen Nukleinsäureinsert im Bakterienplasmid sichtbar zu machen, werden 40  $\mu\text{l}$  der X-Gal Lösung auf die mit Antibiotikum versetzte LB-Agar Platte aufgetragen bevor die Zellen ausplattiert werden.



### 2.3.7. Lösungen für die Plasmid-Isolierung

#### 1. P1 Puffer

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

#### 2. NaOH/SDSLösung

- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 8 ml
- NaOH (2 M) 1 ml
- 10 % SDS 1 ml

#### 3. Natriumacetat/AcetatLösung

- KCl (5 M) 6 ml
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 2,85 ml
- Eisessig 1,15 ml

## 2.4. Die Erstellung einer Klonbibliothek

Um eine 16S rRNA-Gendatenbank zu erstellen, wurde von allen namibischen Bodenproben (Nam1 - Nam29) die genomische DNS via Protokoll nach Lueders (Lueders *et al.*, 2004) extrahiert. Die DNS einer *Streptomyces africanus* Reinkultur wurde mit dem PowerSoil DNS Kit extrahiert.

### 2.4.1. Methoden zur DNS-Isolierung

#### 1. DNS Extraktionsprotokoll nach Lueders

- Lösungen:
  - NaPO<sub>4</sub> Puffer
  - TNS Puffer
  - PEG Lösung
  - EB Puffer
  - Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), pH 5,0

· Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

- Vorgehensweise:

Für die DNS-Extraktion nach Lueders wurde etwas Bodenprobe entnommen und in ein „bead beating“ Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl NaPO<sub>4</sub>Puffer gewaschen, für 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um die Probe von RNAlater weitgehend zu befreien. Anschließend wurde in das Reaktionsgefäß 750 µl NaPO<sub>4</sub> und 250 µl TNS Puffer gegeben und die Probe für 45 sec bei 6,5 m/s im „bead beater“ aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 4 min. wurde der Überstand abgenommen, in ein frisches, RNase freies Reaktionsgefäß übertragen und mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und weitere 4 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein 2 ml „Phase lock gel heavy“ Reaktionsgefäß übertragen. Nach der Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde für weitere 4 min. zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und in einem neuen ERG mit 2 Vol PEG für die DNS-Fällung gut durchmischt und für 30 min. bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wird das Pellet mit 4 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und getrocknet. Die ausgefällte DNS wurde mit 50 µl DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in einem RNase freien ERG gelöst und auf -20 °C gelagert.

## 2. DNS Extraktion mit dem PowerSoil DNS Kit

- Vorgehensweise

Die genomische DNS einer *Streptomyces africanus* Reinkultur wurde nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die mechanische Zell-Lyse erfolgte über mehrmaliges „Vortexen“ und die chemischen Lyse via einer SDS-haltigen Lösung. Dem Protokoll des Herstellers folgend wurde die DNS aufgereinigt und von PCR hemmenden Stoffen befreit. Die extrahierte DNS wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 2.4.2. Qualitative und quantitative Untersuchung der Nukleinsäuren

#### 1. Qualitative Analyse der Nukleinsäuren via Agarose-Gelelektrophorese

Um die Extraktionseffizienz quantitativ bestimmen zu können, wurde nach jeder DNS-Isolierung eine horizontale Gelelektrophorese vorgenommen. Diese Technik erlaubt es DNS-Moleküle größenspezifisch in einer Agarosematrix aufzutrennen.

Dabei wandern die durch das Phosphatrückgrad negativ geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld zur positiven Elektrode und bilden dabei ein Muster, welches über Größe, Quantität und Verunreinigungen Auskunft geben kann.

- Lösungen
  - 1-2,5% (w/v) Agarose in 1 x TBE Puffer
  - Ladepuffer
  - DNS Leiter (KbL)
  - EtBr Färbelösung

- Vorgehensweise

Die 1% bzw. 2% Gele wurden mit 1 g bzw. 2 g Agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) mit 100 ml TAE Puffer in einer Schottflasche gemischt und in einem Mikrowellenofen mehrmals bis zum Siedepunkt erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nachdem sich das Gel bis auf ca. 50 °C abgekühlt hat, wurde es in einen Gelschlitten (Sub-Cell GT, UV-Transparent Gel Tray 15x15 cm) mit Gelkämmen gegossen und die Polymerisation abgewartet. Anschließend wurde der Schlitten in die mit 1 × TBE Puffer gefüllte Gel-Elektrophorese Apparatur (Sub-Cell GT, Biorad, München, Deutschland) gestellt. Der Nukleinsäuremix wurde im Verhältnis 6:1 mit dem Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen der Gelmatrix geladen. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 120 V bei 400 mA für 50 - 70 min, abhängig von der Dichte des Gels. Anschließend wurde das Gel dem Schlitten entnommen und für längstens 45 min. in ein Et-Br Färbelösungsbad gelegt. Die Nukleinsäuren wurden dann in einem Transilluminator (Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) mittels UV-Strahlung ( $\lambda = 312$  nm) sichtbar gemacht und mit einem Gel-Dokumentationssystem (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) aufgenommen und digitalisiert.

## 2. Quantitative, photometrische Analyse der Nukleinsäuren

Für die quantitative Konzentrationsanalyse von Nukleinsäuren wurden 1  $\mu$ l der Probe auf die Messlinse des NanoDrop®<sup>®</sup>, ND-1000 Spektralphotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) pipettiert und bei  $\lambda = 260$  nm nach den Angaben des Herstellers vermessen.

### 2.4.3. *In vitro* - Amplifikation von DNS-Fragmenten via Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gewünschten Zielabschnitte der genomischen DNS werden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfacht. Das Prinzip der PCR beruht darauf, dass mit spezifischen Oligonukleotiden, den so genannten Primern (Tab. 7, 10) und einer DNS-Polymerase definierte DNS Abschnitte enzymatisch *in vitro* amplifiziert werden. Dabei werden die Nukleinsäurestränge bei hoher Temperatur zuerst denaturiert, um einzelsträngige DNS zu erhalten. Anschließend wird bei geringerer Temperatur die Anlagerung der Primer und die Aktivierung der Polymerase initiiert. Bei wiederum höherer Temperatur wird dann eine Kopie des gewünschten DNS-Abschnitts erstellt. Nachdem die synthetisierten DNS-Abschnitte nach einem Zyklus ihrerseits wieder als Matritze für weiter Amplifikationen dienen, steigt die Kopienzahl exponentiell an. Das detaillierte Programm und die unterschiedlichen Temperaturzyklen sind in den Tabellen 8 und 9 angegeben. Während der Elongation werden von der Polymerase Adenosin-Nukleotidüberhänge am 3' Ende erstellt, die für die Klonierung und die Ligation des definierten DNS-Abschnittes an den Vektor (Abschn. 2.5.8) notwendig sind.

### 2.4.4. Vervielfältigung der gewünschten Zielgenfragmente

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Für die PCR wurden der Icyler (Biorad, München, Deutschland) oder der Mastercycler gradient PCR cyler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet.

### 2.4.5. Kontroll-PCR zur Überprüfung von Kontaminationen durch Plasmid-DNS

- Lösungen für die PCR Reaktion
  - $\text{MgCl}_2$  (25 mM) (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA)
  - 10x Ex Taq Polymerase Puffer (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA)
  - Nukleotid Mix (2 mM/dNTP) (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA)
  - Vorwärts-Primer (50 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - Rückwärts-Primer (50 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - Bovines Serumalbumin (BSA, 20 mg/ml) (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA, USA)

- Taq DNS Polymerase (5 U/ $\mu$ l) (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Standard Reaktionsmix (50  $\mu$ l) für die PCR
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 4  $\mu$ l
  - PCR-Puffer (10x) 5  $\mu$ l
  - dNTP Mix (2 mM) 4  $\mu$ l
  - Vorwärts Primer (50 pmol/ $\mu$ l) 0,5-1  $\mu$ l
  - Rückwärts Primer (50 pmol/ $\mu$ l) 0,5-1  $\mu$ l
  - BSA (100x) (10 mg/ml) 0,25  $\mu$ l
  - Taq DNS Polymerase (0,0025U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l
  - Template DNS 1-5  $\mu$ l
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 50  $\mu$ l

Für jede PCR wurde ein auf die Anzahl der Reaktionen abgestimmter Mastermix ohne DNS Template vorbereitet. Davon wurden 49  $\mu$ l in PCR Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG) oder eine Mikrotiterplatte pipettiert und kurz vor Beginn der Reaktion 1  $\mu$ l des DNS Templates zupipettiert. Zur Qualitätskontrolle der PCR wurde jeweils ein ERG als Negativkontrolle ohne Template und eines mit Plasmid DNS bekannter Größe als Positivkontrolle eingesetzt.

Für die so genannte „M-13 Screening-PCR“, die dazu dient Plasmid DNS zu amplifizieren, werden spezifische M13 Primer (Tab. 7) verwendet. Das detaillierte Programm für die M13 PCR ist in Tabelle 8 angegeben. Nach jeder abgelaufenen PCR Reaktion wurde Qualität und Quantität der PCR Produkte wie in Abschnitt 2.5.2. beschrieben überprüft.

**Tabelle 7:** Primer für M13 PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	T [°C] <sup>a</sup>	Referenz <sup>b</sup>
M13F <sup>c</sup>	GTA AAA CGA CGG CCA G	60	TOPO cloning kit
M13R <sup>d</sup>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	60	TOPO cloning kit

<sup>a</sup>Anlagetemperatur des Primers

<sup>b</sup>Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

<sup>c</sup>F, Vorwärts Primer

<sup>d</sup>r, Rückwärts Primer

**Tabelle 8:** Programm der M13 PCR Reaktion

Zyklus	T [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	5 min.	1x
Denaturierung	95 °C	40 sek.	35x
Annealing	60 °C	40 sek.	35x
Elongation	72 °C	1 min 30 sek	35x
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x

#### 2.4.6. Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten

Der PCR Mastermix wurde angesetzt wie in Abschnitt 2.5.5. Zusätzlich zu den Primern für die 16S rRNA-Gen-Amplifikation (Tab 10.) wurden bestimmte Oligonucleotide als Kompetitoren (Tab. 11) verwendet, die die Amplifizierung von Ziel-DNS ähnlichen DNS-Abschnitte verhindern sollen. Das PCR Programm ist in Tabelle 9 angegeben. Die Qualität und Quantität der PCR Produkte wurde via Gel-Elektrophorese bestimmt. PCR Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 9:** Programm der 16S rRNA PCR

Zyklus	T [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	5 min.	1x
Denaturierung	95 °C	40 sek.	30x
Annealing	51 °C	40 sek.	30x
Elongation	72 °C	1 min 30 sek	30x
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x

**Tabelle 10:** Verwendete Primer

Primer Name	Sequenz (5'-3')	T [ $^{\circ}$ C] <sup>a</sup>	Spezifität	Referenz
HoAc-1402-R <sup>b</sup>	CTT TCG TGA TGT GAC GGG	49,0	<i>Acidobacteria</i> Coverage: 95 % Hits target group: 693 Hits non-target groups: 718	Juretschko (2002)
616V <sup>c</sup>	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	52,0	<i>Bakteria</i>	Juretschko (1998)

<sup>a</sup>Anlagetemperatur des Primers<sup>b</sup>R, Rückwärts-Primer<sup>c</sup>V, Vorwärts-Primer**Tabelle 11:** Verwendete Kompetitoren

Kompetitor	Sequenz (5'-3')	T [ $^{\circ}$ C] <sup>a</sup>	Spezifität	Referenz
HoAc-1402-C1	CTT TCG TGA CGT GAC GGG	51,9	<i>Actinobacteria</i> Coverage: 98 % Hits target group: 8850	Juretschko (2002)
HoAc-1402-C2	CTT TCA TGA TGT GAC GGG	46,0	<i>Verrucomicrobia</i> Coverage: 80 % Hits target group: 605	Juretschko (2002)

<sup>a</sup>Anlagetemperatur

### 2.4.7. Anfügen von dATP Überhänge an die PCR-Produkte

Durch häufiges Einfrieren und Auftauen der PCR Produkte können die durch die Taq Polymerase angefügten poly-A Überhänge abbrechen und die Ligation des Zielgens in den Vektor verhindern. Deshalb wurde das PCR Produkt vor dem Klonierungsprozess mit dATP und Taq Polymerase bei 72  $^{\circ}$ C in einem PCR Cycler für 30 min. inkubiert. Folgender Reaktionsmix (30  $\mu$ l) wurde verwendet:

- PCR Produkt 20,5  $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub>(25 mM) 3  $\mu$ l
- Puffer (10 x) 3  $\mu$ l
- dATP's (25  $\mu$ M) 3  $\mu$ l
- Taq DNS Polymerase 0,5  $\mu$ l

### 2.4.8. Klonierung der 16S rRNA-Gen-Amplifikate

Die Klonierung wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) nach Angaben des Herstellers bewerkstelligt. Die Ligation der Genamplifikate wurde mit dem vektorassoziierten Enzym Topoisomerase katalysiert. Mit Hilfe dessen wurden die dAMP Überhänge am 3'-Ende der PCR Produkte mit den dTMP Überhänge des linearisierten Vektors verbunden. Die ligierten Vektoren wurden im Anschluss in chemisch kompetente *E. coli* TOP-10 Zellen transformiert. Der 3,9 kb große Vektor enthält zwei antibiotikaresistenz Gene (*ampR* und *kanR*) und das *lacZa* Fragment, welche durch die Insertionsstelle unterbrochen sind. Da die LB-Agarplatten X-Gal enthalten ist ein blau/weiß screening möglich. Denn nur jene Zellen, die Vektoren ohne Insert enthalten können über das *lacZ* Gen kodierte Enzym  $\beta$ -galactosidase X-Gal unter Produktion eines blauen Farbstoffes verstoffwechseln. Da die LB-Agarplatten Antibiotika enthielten, bildeten nur jene Zellen weiße Kolonien, die Vektoren mit Insert aufgenommen hatten.

#### 1. Ligation

- Lösungen

- 2 % (w/v) Nusieve (3:1) Agarose (low melting point) in  $1 \times$  TAE Puffer
- Ladepuffer
- DNS Leiter (KbL)
- SYBR® Green I Färbelösung

- Standardreaktionsmix für die Ligation

- PCR Produkt 4  $\mu$ l
- Salzlösung 1  $\mu$ l
- Vektor (pCR®II) 1  $\mu$ l

- Vorgehensweise

Verwendet wurde frisches PCR Produkt. Wenn nicht verfügbar wurde auf  $-20^\circ\text{C}$  gelagertes PCR Produkt aufgetaut und mögliche abgebrochene dAMP Überhänge durch den Inkubationsschritt in Abschnitt 2.5.7 ersetzt. Die unterschiedlichen PCR Produkte wurden gepoolt und entweder direkt für die Ligation verwendet oder auf ein *low melting* Agarosegel aufgetragen und getrennt. In dem Agarosegel aufgetrennte Banden wurden mit UV-Strahlung



visualisiert und jene, mit der richtigen Größe mit einer 50 µl Glaskapillare (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA) ausgestochen und in ein steriles ERG überführt, 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zugegeben und bei 70 °C in einem Heizblock (VWR international, West Chester, PA, USA) geschmolzen. Die aufgereinigten PCR Produkte wurden dann für die Ligation verwendet. Nachdem die Salzlösung und der Vektor getrennt in einem ERG vorgelegt wurden, wurde das PCR Produkt zupipetiert. Vor der Transformation wurde der Mix kurz zentrifugiert und für 20 min. bei RT inkubiert.

## 2. Transformation

- Vorbereitung

Für jede Reaktion wurden 2 Kanamycin LB-Agarplatten bei 38 °C für 30 min getrocknet. Weiters wurde ein Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) auf 42 °C vorgeheizt und SOC Medium auf RT aufgetaut. Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut.

- Vorgehensweise

Der gesamte Ligationsmix (6 µl) wurde den chemisch kompetenten Zellen zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 sec in das 42 °C warme Wasserbad getaucht und gleich danach für 2 min auf Eis gegeben. Durch den Hitzeschock nehmen die chemisch kompetente *E. coli* Zellen die Vektoren auf. Schließlich wurden 250 µl SOC Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C auf einem Rundschüttler (200 rpm) inkubiert. Auf beide kanamycinhaltigen LB-Agarplatten wurden 40 µl X-Gal aufgetragen und jeweils 100 µl bzw. 150 µl Klonierungsgemisch zugegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Jene Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, waren kanamycinresistent und konnten daher auf den LB-Agarplatten wachsen. Das nun folgende blue/white screening ermöglichte die Identifizierung von Zellen mit einem Plasmidinsert. Die weißen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und auf eine weitere kanamycinhaltigen LB-Agarplatte aufgetragen. Gleichzeitig wurden die Klone mittels einer M-13 Screening-PCR (Abschnitt 2.5.5) nach den richtigen Plasmidinserts überprüft.

### 2.4.9. Kultivierung und Stammhaltung rekombinanter *E.coli*-Stämme

#### 1. Zellkultivierung

- Lösungen

- LB Medium
- Kanamycin Stammlösung (100 mg/ml)
- 50 % Glycerol

- Vorgehensweise

Die rekombinanten Zellen wurden sowohl auf Platten mit festem LB-Agar als auch in Reagenzgläsern mit LB-Flüssigmedium kultiviert. Um sicher zu gehen, dass ausschließlich plasmidhaltige Klone wachsen wurde in jedes LB-Medium Kanamycin zugegeben. Um ideale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die angeimpften Medien bei 37 °C inkubiert.

Für die Glycerolstocks und die Plasmid isolation wurden die Zellen in Flüssigmedium angezogen. Dazu wurde 5 ml Flüssigmedium und 7 µl Kanamycin Stammlösung (100 mg/ml) in ein Reagenzglas pipettiert und die Zellen einer einzelnen Kolonien unter sterilen Bedingungen via Zahnstocher geerntet und in das Medium transferiert. Diese Reagenzgläser wurden auf 37 °C über Nacht auf einem Rundschüttler (Innova 2300; New Brunswick Scientific Co., Inc., Madison, NJ, USA) bei 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden Tags darauf geerntet, indem 2×2 ml des Flüssigmediums abzentrifugiert (14.000 rpm, 1 min) und in ein steriles ERG übertragen wurden.

- Aufbewahrung

Für kurzfristige Lagerung wurden die Klone auf LB-Agarplatten transferiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Für die Langzeitaufbewahrung wurden Glycerolstocks erstellt. Dafür wurden 100 µl der Übernachtskultur in eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc<sup>TM</sup> Serving life science, Roskilde, Dänemark) transferiert und 50 µl einer 50 % Glycerollösung zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie (Nunc<sup>TM</sup> Serving life science, Roskilde, Dänemark) verschlossen und bei -80 °C gelagert.

#### 2. Überprüfung der Insertgröße via M-13 Screening PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese

Das M-13 Primerpaar (Tab. 7) bindet an den Flanken der Insertstelle im TOPO-TA Klonierungsvektor. Somit ist es möglich die Länge des Inserts via PCR und anschließender Agarose Gelelektrophorese zu bestimmen.

- Vorgehensweise

Verwendet wurde der gleiche PCR Reaktionsmix wie in Abschnitt 2.5.5. ohne BSA. Die Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher der LB-Agarplatte entnommen und in eine gekühlte 96-well Mikrotitterplatte (MJ Research, Waltham, MA, USA) in der bereits 25 µl PCR-Mastermix vorgelegt wurden transformiert. Die Mikrotitterplatte wurde mit einer hitzebeständigen PCR-Folie (MJ Research, Waltham, MA, USA) abgedeckt und die PCR Reaktion gestartet (Tab. 8). Die PCR Produkte wurden über ein 1% Agarosegel via Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel mit EtBr gefärbt und die amplifizierten Nukleinsäureinserts mit einem Transilluminator visualisiert. Die Klone mit dem richtigen Insert wurden für weitere Analysen verwendet.

#### 2.4.10. Isolierung von Plasmid-DNS aus rekombinanten *E. coli*-Zellen

Die Plasmid Isolierung erfolgte über das Plasmid - Miniprep Protokoll. Dazu wurden zuerst die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen, dann die Proteine mittels eines organischen Detergens gefällt und schließlich die Plasmid-DNS mit Isopropanol präzipitiert.

- Lösungen

- P1 Puffer
- NaOH/SDS Lösung
- Kaliumacetat/Acetat Lösung
- Isopropanol
- 70 % Ethanol

- Vorgehensweise

2×2 ml einer Übernachtskultur wurden in ein 2 ml ERG überführt und für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml P1 Puffer resuspendiert und für 5 min inkubiert um die RNA zu verdauen. Die Zellen wurden mit 200 µl einer NaOH/SDS Lösung lysiert und nach Schütteln der ERG auf Eis für 5 min inkubiert. Dann wurden 150 µl Kaliumacetat/Acetatlösung zugegeben, das ERG mehrmals gewendet und für weiter 5 min

auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (13000 rpm, 1 min) der Proteine wurde der Überstand abgenommen, in ein neues ERG überführt und die Plasmid-DNS mit 1 Vol Isopropanol für 10 min gefällt. Im Anschluss wurde noch einmal zentrifugiert (13000 rpm, 1 min) und das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 1 min) wurde der Überstand vorsichtig abgehoben und das DNS-Pellet bei RT luftgetrocknet. Die Plasmid-DNS wurde in 50 µl DNS-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und auf -20 °C gelagert. Die extrahierte Plasmid-DNS wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer vermessen.

#### 2.4.11. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der enzymatischen Didesoxy - Ketten - Abbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) kombiniert mit einer Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNS-Polymerase. Dabei wird für eine lineare Amplifikation nur ein Primer pro Reaktion (Tab. 12) und neben 2'-Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dNTPs) ebenso 2',3'-Didesoxy-Nukleotid-Triphosphate (ddNTPs) verwendet. Dies führt bei der Polymerisation der Zielsequenzen dazu, dass bei Einbau der ddNTPs in den synthetisierten Nukleinsäurestrang die Polymerase die Synthese abbricht, da keine 3'-OH-Gruppe zur Kettenverlängerung mehr zur Verfügung steht. Für jeden Sequenzierprimer wird ein Ansatz mit allen vier ddNTP's, die mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert sind angefertigt und der Sequenzierreaktion unterzogen. Die dabei entstandenen, unterschiedlich langen Zielgenfragmente enden mit einem bestimmten fluoreszenzmarkiertem ddNTP. Je länger der synthetisierte DNS-Strang ist, desto später wurde die Amplifikation der Zielnukleinsäure abgebrochen. Die Kettenfragmente werden nun mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Mit einem Laser werden nun die Farbstoffe der unterschiedlichen ddNTPs der Kettenfragmente angeregt und können mit einem Detektor in ein Chromatogramm übersetzt werden. Das Chromatogramm gibt nun die genaue Abfolge der Nukleinsäurebasen der Zielsequenz wieder.

Da mit einem einzigen Primer nur etwa 800 Basen der 16S rRNA nahezu fehlerfrei sequenziert werden können, wird die Reaktion mit einem zweiten Primer wiederholt.

#### 2.4.12. Sequenzierkit, Primer und Auswertungssoftware

Für die Sequenzierung der DNS wurde der DNS Sequencer Applied Biosystems 3130 nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurde ein Vorwärtsprimer (TopoSeq-F) und ein Rückwärtsprimer (TopoSeq-R) (Tab. 12) eingesetzt. Bei der Sequenzierung

erhält man für jeden Primer Teilsequenzen, die im Anschluss *in silico* zusammengefügt werden müssen. Die Sequenzen wurden mit dem Programm ChromasPro (Technelysium Pty. Ltd.) zusammengefügt und korrektur gelesen und mit der Pylogeniesoftware ARB (Ludwig *et al.*, 2004) für weitere Analysen verwendet.

**Tabelle 12:** Primer für die Sequenzierung

Primername	Sequenz (5' - 3')	Annealing Temperatur (°C)
TopoSeq-F	AGC TTG GTA CCG AGC T	60
TopoSeq-R	GTA AAA CGA CGG CCA GT	60

## 2.5. Vergleichende Sequenzanalyse

### 2.5.1. Phylogenie-Softwarepaket ARB

ARB ist ein Softwarepaket, das verschiedene Programme und Algorithmen zur Analyse und Berechnung von einzelnen Sequenzen sowie Sequenzdatenbanken beinhaltet. Die Software ermöglicht es Sequenzdaten zu importieren und zu exportieren, Sequenzalignments zu erstellen, Primär- und Sekundärstrukturen zu bearbeiten. Weiters ist es möglich mit diversen Filterberechnungen und unter Zuhilfenahme verschiedenster Algorithmen phylogenetische Berechnungen anzustellen sowie Primer und Sonden für bestimmte Sequenzabschnitte zu designen.

Für die Sequenzanalyse wurden die Sequenzen Korrektur gelesen, in das Format „fasta“ umformatiert und in ARB importiert. Die Sequenzdatenbank von ARB wurde mit der 95\_SILVA Datenbank ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)) aktualisiert und die importierten Sequenzen mit der „fast alignment“ Funktion des Editor-Werkzeuges (ARB\_EDIT 4.1) automatisch einander ausgerichtet („aligniert“). Die „fast alignment“ Funktion verwendet bereits vorhandene, ähnliche Sequenzen und vergleicht diese mit den neu importierten und legt homologe Bereiche der Sequenzen übereinander. Dennoch mussten viele Bereiche, insbesondere variable Abschnitte wie Loops der 16S rRNA Sequenz manuell auf einander abgestimmt werden.

### 2.5.2. Überprüfung auf Chimären

Chimären sind Sequenzen, die aus zwei Teilsequenzen unterschiedlicher Spezies zusammengefügt wurden. Dies kann beim „Sequenzassembling“, also beim Zusammenfügen der zwei Teilsequenzen im Anschluss an die Sequenzierung zustande kommen. Für die Überprüfung auf Chimären wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

### 1. Überprüfung auf Chimären mit ARB

Von allen 16S rRNA-Gensequenzen wurden jeweils die Abschnitte von den Basenpositionen 26 - 747 und 747 - 1471 (gemäß der *E. coli* 16S rRNA-Alignment-Positionen) unabhängig von einander für eine phylogenetische Analyse herangezogen. Dafür wurde das „neighbour joining“ Werkzeug in ARB verwendet. Die beiden erhaltenen phylogenetischen Bäume wurden verglichen und gemäß ihrer Abstammung unterschiedlich positionierte Sequenzen wurden als mögliche Chimären identifiziert.

### 2. Überprüfung auf Chimären mit dem Online-Programm Pintail

All jene Sequenzen, die mit ARB als mögliche Chimären identifiziert wurden, wurden mit dem Online-Programm Pintail (<http://www.bioinformatics-toolkit.org>) überprüft. Dabei wurde die unbekannte Vollsequenz mit der nächsten verwandten Sequenz aus der Online-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen und auf Übereinstimmung überprüft. Chimären gaben sich dadurch zu erkennen, dass sich eine Teilsequenz signifikant von der Referenzsequenz unterschied.

Jene Sequenzen, die durch beide Methoden als Chimären identifiziert wurden, wurden von weiteren Analysen ausgenommen.

### 2.5.3. Phylogenie

Für die phylogenetischen Analysen der 16S rRNA-Sequenzen der Mikroorganismen wurde das Softwarepaket ARB (Ludwig *et al.*, 2004) verwendet. Alle Baumberechnungsverfahren wurden mit einem 50 % Konservierungsfiter auf *Bacteria* durchgeführt, um hoch variable Sequenzpositionen zu vernachlässigen. Dadurch wurden nur jene Regionen in die Berechnung mit einbezogen, die in mindestens 50 % aller *Bacteria* konserviert sind. Für alle Sequenzen wurden homologe jedoch nicht verwandte Referenzsequenzen als sogenannte „Outgroup“ mit einberechnet und nach jeder Berechnung manuell als phylogenetische Wurzel (root) gesetzt. Als „Outgroup“ für Bakterienstammbäume wurden Archaeen als Referenzorganismen verwendet, für Stammbäume von *Acidobakterien* wurden nah verwandte Bakterienphyla als „Outgroup“ herangezogen. Um zuverlässige phylogenetische Informationen zu erhalten, wurde ausschließlich Sequenzen über eine Länge von 1300 nt verwendet. Ab einer Übereinstimmung von 99 % wurden die Sequenzen in eine OTU (operational taxonomic unit) zusammengefasst. Für jede OTU wurde nur eine

Sequenz für die Baumberechnungsverfahren herangezogen und mit einer nah verwandten Sequenz aus der NCBI Datenbank und dem nächst verwandten bereits kultivierten Mikroorganismus, bevorzugt Typ-Stämme vergleichend mit eingerechnet (Garrity *et al.*, 2007). Alle übrigen Sequenzen wurden mit dem Parsimony Interactive Werkzeug von ARB in bereits berechnete Stammbäume eingerechnet.

Im Folgenden sollen die in ARB verwendeten implementierten Kalkulationsmethoden kurz vorgestellt werden (Felsenstein 1988; Felsenstein 1995; Ludwig *et al.*, 1998; Nei *et al.*, 1998; Stamatakis *et al.*, 2002; Swofford *et al.*, 2001).

#### 2.5.4. Neighbour-Joining

Der Neighbour-Joining Algorithmus ist ein Distanzmatrix basierendes Berechnungsverfahren. Dabei werden Ähnlichkeitsmatritzen über ein „minimum evolution Kriterium“ erstellt das heißt es wird jene Baumtopologie, bei der die Abstände der zugrunde liegenden Wertematrix am besten mit den jeweiligen Astlängen übereinstimmen als optimal bewertet. Sequenzen mit der niedrigsten Divergenz werden zu einer Gruppe zusammengefasst und die Matrix wird erneut mit jeder neu eingefügten Sequenz so berechnet als sei sie Teil der Gruppe. Dieser Algorithmus wird mit jeder neu eingerechneten Sequenz so oft wiederholt bis alle Sequenzen Teil des Baumes sind. Die erhaltenen Distanzwerte werden dann in phylogenetische Distanzen umgerechnet.

Diese Methode hat den Vorteil dass man große Datenmengen sehr rasch verarbeiten und analysieren kann. Bei der schrittweisen Baumberechnung findet der Neighbour-Joining Algorithmus jedoch nicht zwingend die optimale Baumtopologie mit der geringsten Verzweigungslänge, da er während der Berechnung bereits Rechenwege verwirft ohne vorher alle möglichen Bäume mit einbezogen zu haben. Zumal für den phylogenetischen Baum lediglich indirekte Distanzwerte und nicht tatsächliche Sequenzwerte herangezogen werden.

Zwei Methoden, die sich direkt auf die Sequenzinformationen beziehen sind Maximum-likelihood und Maximum-parsimony.

#### 2.5.5. Maximum-likelihood

Der merkmalsbasierenden Methode Maximum-likelihood liegt ein Evolutionsmodell und eine daraus resultierende Wahrscheinlichkeitsfunktion zugrunde. Dabei wird angenommen, dass Mutationen in einer Sequenz hinsichtlich ihrer Position unabhängig voneinander auftreten. Es wird die Wahrscheinlichkeit jedes einzelnen evolutionären Schrittes

berechnet der benötigt wird um mehrere Sequenzen auf eine gemeinsame Vorläufersequenz zurückführen zu können. Das heißt es wird unter allen möglichen Bäumen des untersuchten Sequenzdatensatzes jener ausgewählt, der mit der größten Wahrscheinlichkeit zur Entstehung der terminalen Sequenzen, unter der Annahme einer definierten Sequenzevolution führt. Dabei wird heuristisch vorgegangen, wobei ausgehend von einem zufälligen Baum, alle Äste so lange neu angeordnet werden, bis der optimale Baum gefunden wurde. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis alle möglichen Baumtopologien des untersuchten Sequenzdatensatzes konstruiert werden können.

Der größte Vorteil dieser Methode ist, dass die vollständigen Sequenzdaten unter Berücksichtigung eines Evolutionsmodells in die Berechnung einfließen. Dafür werden jedoch große Mengen an Rechenleistung und damit verbunden ein erheblicher Zeitaufwand benötigt.

#### 2.5.6. Maximum-parsimony

Der Maximum-parsimony (engl. *parsimony* „Sparsamkeit“) Algorithmus setzt die Annahme voraus, dass evolutionsgeschichtlich die Wahrscheinlichkeit Merkmale zu erhalten höher sei als deren Veränderung. Somit wird bei diesem Baumberechnungsverfahren jenem Baum die höchste Wahrscheinlichkeit beigemessen, der die geringsten evolutiven Schritte und die geringsten Astlängen aufweist. Um den „sparsamsten“ phylogenetischen Baum zu erhalten werden verschiedene Baumtopologien für jede vertikale Kolumne von alignierten Sequenzen berechnet. Die erhaltenen Topologien werden im Anschluss gemäß der Anzahl an evolutionären Veränderungen, die sie beinhalten evaluiert und jene für die Wahrscheinlichste erachtet, die die geringste Zahl an Mutationen und die geringste Gesamtbaumlänge aufweist.

Diese Methode ist nützlich, wenn sich die Merkmale selten Veränderungen unterziehen. Für hoch variable Merkmale ist jener Algorithmus jedoch nur bedingt einsetzbar.

#### 2.5.7. Bootstrapping

Bootstrapping ist ein Baumbewertungsverfahren, welches die Evaluierung der einzelnen Astlängen und die Aussagekraft eines Baumes ermöglicht. Dabei werden die Daten bis zu tausendmal zufällig umgestaltet und dadurch der statistische Fehler jeder Baumberechnung ermittelt. Für jeden Baum werden dann Konfidenzwerte ausgegeben, die angeben in wie viel Prozent der Stichprobenbäume eine bestimmte Verzweigung auftritt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Bootstrapping-Berechnungen mit einem 50 % Konservierungsfiler und 100 Wiederholungen durchgeführt. Alle Verzweigungen mit Werten



$\geq 90\%$  wurden als signifikant bestätigt ausgegeben.

### 2.5.8. Gruppierung der 16S rRNA-Sequenzen für weitere Analysen

Die erhaltenen bakteriellen Sequenzen wurden für weitere statistische Analysen zu OTUs (operational taxonomic unit) zusammengefasst. Dafür wurde das Neighbour-Joining Verfahren in ARB verwendet, womit eine Ähnlichkeitsmatrix aller erhaltenen Sequenzen berechnet und erstellt wurde. Die erhaltene Matrix wurde dann in DOTUR (Schloss und Handelsman 2005) importiert und die unterschiedlichen OTUs auf 99 %, 95 % und 90 % Sequenzähnlichkeit definiert (Stackebrandt und Ebers 2006).

### 2.5.9. Coverage-Berechnung

Die Coverage-Berechnung beschreibt in welchem Ausmaß die erhaltenen Gensequenzen den gesamten hypothetischen Genpool einer bestimmten Umweltprobe repräsentiert. Dazu wird folgende Formel (1) verwendet (Good 1953; Singleton 2001):

$$C_{coverage} = [1 - (n1/N)] * 100\% \quad (1)$$

$n1$  = Anzahl der OTUs, welche nur eine Sequenz enthalten

$N$  = Anzahl aller Sequenzen in der Gendatenbank

### 2.5.10. Rarefaction-Methode

Die Rarefaction-Methode (Shinozaki, 1963) dient dazu abzuschätzen, ob die Anzahl der erhaltenen Sequenzen ausreicht, um die Diversität der Klonbibliothek festzustellen. Sie wurde entwickelt um die Fülle der Taxa unterschiedlicher Proben miteinander zu vergleichen. Dabei wird davon ausgegangen, dass alle Individuen beliebig in einem Raum verteilt sind. Berechnet wird die zu erwartende Artenzahl einer vordefinierten Anzahl eines Erfassungsbereiches mithilfe der Analytic Rarefaction Software (Holland, Analytic Rarefaction Software). Folgende Formel (2) wird hierfür verwendet:

$$S(q) = \sum_{i=1}^s \left[ 1 - \left\{ \frac{Q - a_i}{q} \right\} / \left\{ \frac{Q}{q} \right\} \right] \quad (2)$$

$S(q)$  = zu erwartende Artenzahl für  $q = 1, 2, 3, \dots, Q$

$q$  = Gesamtzahl Erfassungseinheit

$a_i$  = Anzahl an Erfassungseinheiten, in denen die Art  $i$  vorkommt (festgestellte Artenfrequenz)

$s$  = festgestellte Gesamtartenzahl

Diese Berechnungen erlauben es eine Rarefaction-Kurve zu konstruieren. Sie dient als Darstellung der Anzahl von Individuen als Funktion der Individuen der gesammelten Proben. Erreicht die Kurve ihr Plateau sind trotz weiterem Sammelaufwand keine neuen Arten mehr zu erwarten (Achtziger *et al.*, 1992). Dennoch ist es mit dieser Methode nicht möglich auf die Gesamtzahl der Arten, die in einer Probe erwartet werden zu schließen.

### 2.5.11. Vergleich von Gendatenbanken mit UniFrac

Der UniFrac Algorithmus (Lozupone *et al.*, 2005) dient dazu, OTU unabhängig Gendatenbanken unterschiedlicher Umweltumgebungen oder Habitate miteinander zu vergleichen. Dazu wird ein bereits erstellter phylogenetischer Baum, indem jeder Sequenz ein Habitat zugewiesen wurde in das Online-Werkzeug von UniFrac

(<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>) im „NEWICK“-Format eingerechnet. Die UniFrac Metrik vergleicht Häufigkeit und Astlänge aller Sequenzen und erstellt einen gewichteten Baum. Folgende Formel (3) wird dafür verwendet:

$$u = \sum_i^n b_i * \left\{ \frac{A_i}{A_T} + \frac{B_i}{B_T} \right\} \quad (3)$$

$n$  = Anzahl der Äste

$b$  = Länge eines Astes ( $i$ )

$A, B$  = Summe der Sequenzen eines Habitats ( $A, B$ )

Dieser wird mit 1000 zufällig erstellten Bäumen verglichen, um die Signifikanz von auftretenden Sequenzen in einem Habitat zu ermitteln. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, Gendatenbanken, die einem gewissen Habitat oder einer bestimmten Umweltprobe zugeordnet werden können ohne der Bestimmung von OTU's miteinander vergleichen zu können. Mikrobielle Gemeinschaften können damit signifikant einem Habitat zugewiesen werden.

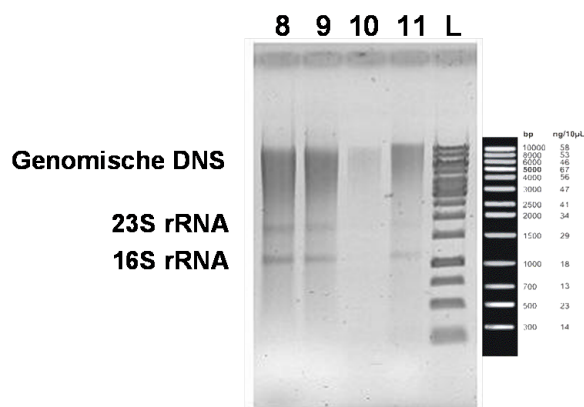
## 3. Ergebnisse

### 3.1. Bakterielle 16S rRNA-Sequenzen aus namibischen Böden

Eines der Ziele dieser Arbeit war Einblick in die bakterielle Diversität in namibischen Böden zu bekommen. Die Bodenproben wurden im Jahr 2007 an zwei Beobachtungsstandorten des BIOTA-Projektes (Mile 46; Mutompo) in der Kavango-Region im Norden Namibias gesammelt.

#### 3.1.1. Isolierung der genomischen DNS

Die genomischen DNS wurde mit der Methode nach Lueders extrahiert (Lueders *et al.*, 2004). Dieses Protokoll ermöglicht eine kombinierte Isolierung von DNS und RNS. Insgesamt wurden 29 Bodenproben (Nam1 - Nam29) untersucht. Abb. 7 zeigt vier Beispiele von Extraktionen verschiedener Bodenproben (Nam8 - Nam11). Gut erkennbar sind die 16S rRNA und 23S rRNA Untereinheiten.

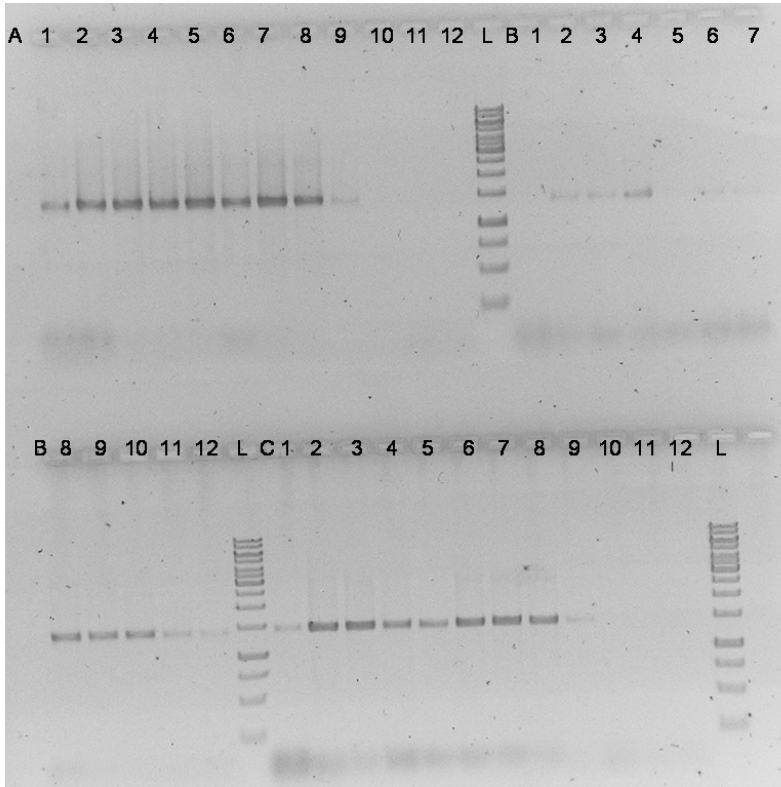


**Abbildung 7:** 1% Agarose-Gel (nicht denaturierend) von Beispielen einer kombinierten DNS/RNS Extraktion nach Lueders (Lueders *et al.*, 2004); (**8,9**) Ackerboden; (**10**) Brachland; (**11**) ursprünglicher Boden; (**L**) Kb Leiter.

#### 3.1.2. Amplifikation und Klonierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene

Für die Amplifizierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurden für die PCR *Acidobakterien*-spezifische Primer verwendet (Abschnitt 2.4.3) Für die Ermittlung der primerspezifischen Annealing-Temperatur wurde eine Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt. Über den Temperaturgradienten (Tab. 13) wurde die Stringenz und Spezifität der Primer und Kompetitoren an die Zielorganismen-DNA angepasst. Die nach der Auftrennung über ein Elektrophorese-Gel erhaltenen Banden definieren bestimmte Längen

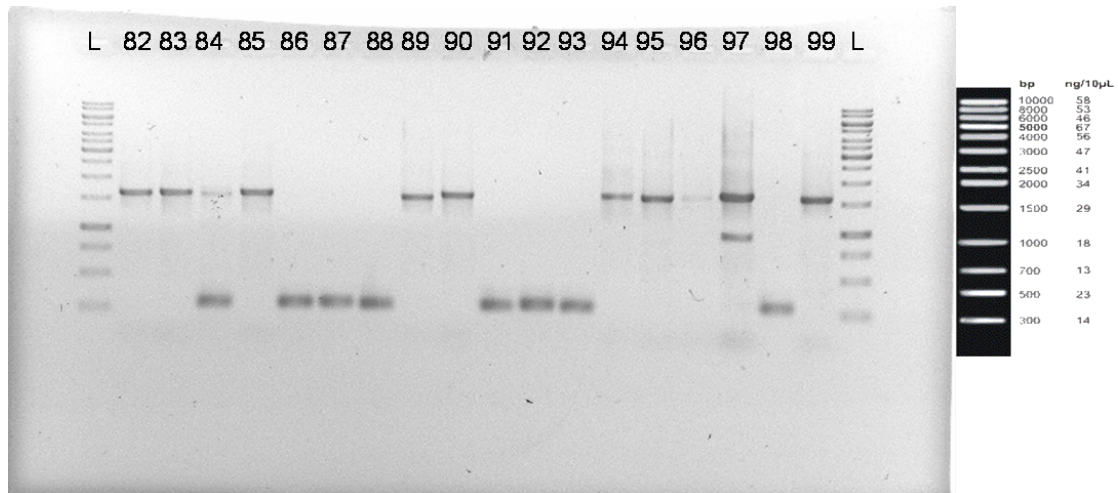
der erhaltenen DNS. Die PCR-Produkte wurden auf 10 ng/ $\mu$ l verdünnt und der Bodenbehandlungsart entsprechend gepoolt (Tab. 14) und für die Klonierung verwendet. Auf die Klonierung erfolgte die Überprüfung der Klone auf die 16S rRNA-Inserts. Da die Größe der M13 Screening-PCR-Produkte der 16S rRNA etwas weniger als 1500 bp entspricht, konnten jene Amplifikate für die Sequenzierung verwendet werden, die die passende Länge der Vektoren mit „Insert“ aufwiesen (Abb. 9).



**Abbildung 8:** 1% Agarose-Gel einer Temperatur-Gradienten-PCR als Beispiel. A1-8, *Acidobacterien* Template; B1-8 *Streptomyces* Template; C1-8, *Verrucomicrobia* Template. Gradient: 47 °C (1) - 67,8 °C (12)

**Tabelle 13:** Teperatur-Gradienten der Gradienten-PCR

Template	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur in °C	47,0	47,3	48,4	50,2	52,5	55,1	57,8	60,5	63,0	65,1	66,7	67,8



**Abbildung 9:** 1 % Agarose-Gelbild einer M13 Screening-PCR als Beispiel. Klone mit Bande bei etwa 1480 bp wurden sequenziert.

**Tabelle 14:** Klonbibliotheks-Kategorien der Bodenproben. Die PCR-Produkte der DNS-Extraktionen (Nam 1 - Nam 29) wurden entsprechend der Bodenbehandlungsart gepoolt (NamUb, NamBr, NamAc)

NamUb <sup>a</sup>	NamBr <sup>b</sup>	NamAc <sup>c</sup>
Nam 3	Nam 1	Nam 4
Nam 6	Nam 2	Nam 5
Nam 11	Nam 10	Nam 7
Nam 12	Nam 17	Nam 8
Nam 13	Nam 19	Nam 9
Nam 15	Nam 20	Nam 14
Nam 16	Nam 22	Nam 18
Nam 24	Nam 23	Nam 21
Nam 25	Nam 28	Nam 26
		Nam 27
		Nam 29

<sup>a</sup>unberührter Boden

<sup>b</sup>Brachlandboden

<sup>c</sup>Ackerlandboden

In Kategorie NamUb wurden von 133 Klonen 112 Klone mit einem 16S rRNA-Insert sequenziert. Von Kategorie NamBr wurden 97 Klone von 104 Klonen mit einem 16S rRNA-Insert verwendet. In Kategorie NamAc wurden 308 Klone gescreent und 92 Klone für die Sequenzierung verwendet. In Summe wurden 545 Klone einer „screening PCR“ unterzogen, wovon 301 Klone mit dem richtigen Plasmid-Insert für die Sequenzierung verwendet wurden.

### 3.1.3. Sequenzierung

Die Qualität der Sequenzen hängt stark mit der Ausbeute der Plasmidisolierung zusammen. Mit dem Programm ChromasPro (Technelysium Pty. Ltd.) wurde ein Chromatogramm erstellt, die Sequenzen wurden korrekturgelesen und zu Vollsequenzen ( $\geq 1200$  bp) zusammengefügt. Sequenzen, deren Chromatogramm keine eindeutigen Basenzuordnungen zuließen wurden verworfen.

Von Klonbibliothek NamUb wurden von 112 sequenzierten Klonen 89 Vollsequenzen erstellt. Aus der zweiten Klonbibliothek NamBr wurden von 104 Klonen 80 Vollsequenzen generiert. Die dritte Klonbibliothek NamAc setzt sich aus 79 Vollsequenzen von 92 Klonen zusammen.

## 3.2. Sequenzanalyse

Die Vollsequenzen wurden mit dem Software-Paket Arb und dem Programm Pintail auf Chimären überprüft (Abschnitt 2.5.2). NamUb enthielt 5 Chimären. In Bibliothek NamBr fanden sich 2 Chimären und in der dritten Klonsammlung NamAc konnten 7 Chimären gefunden werden. Sie wurden aussortiert und verworfen. Für die Sequenzanalyse wurden insgesamt 234 Sequenzen mit einer Länge von  $\geq 1400$  Basen verwendet.

### 3.2.1. Statistische Analysen

Zum Vergleich wurden pro Klonbibliothek die bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit von jeweils  $\geq 99\%$ ,  $\geq 97\%$  und  $\geq 95\%$  mit dem Programm DOTUR (Schloss und Handelsman, 2005) zu unterschiedlichen OTUs zusammengefasst. Eine OTU definiert dabei eine Gruppe von Organismen, die eine bestimmte Sequenzähnlichkeit besitzen. Bei  $\geq 97\%$  Sequenzähnlichkeit ergaben sich für die Klonbibliothek NamUb 55 OTUs, wovon 34 OTUs nur eine Sequenz enthält. Die Analyse der zweiten Klonbibliothek ergab bei  $\geq 97\%$  Sequenzidentität 63 OTUs wovon 54 OTUs nur eine

Sequenz enthält. Die dritte Klonbibliothek NamAc enthält 57 OTUs wovon 49 OTUs nur einer Sequenz entsprechen (Tab. 15 ).

**Tabelle 16:** Anzahl der Klonsequenzen der einzelnen OTUs der drei Genbanken. Sequenzunterschiede betragen 3 %

	OTU1	OTU2	OTU2	OTU4	OTU5-OTU21	OTU22-OTU55
NamUb	4	4	3	3	2	1

	OTU1	OTU2	OTU3	OTU4-UTO9	OTU9-OTU63
NamBr	4	3	3	2	1

	OTU1	OTU2	OTU3-OTU7	OTU8-OTU56
NamAc	5	3	2	1

**3.2.1.1. Coverage-Berechnung** Die Coverage-Berechnung (Good 1953) wurde für alle drei Klondatenbanken durchgeführt. Sie beschreibt, in welchem Ausmaß die Gensequenzen einer Genbank die gesamte Population der untersuchten Probe repräsentiert. Für NamUb ergab sie 59,52 %, für NamBr errechneten sich 30,8 % und für NamAc ergaben sich 36,4 % Erfassungsgrad.

**3.2.1.2. Rarefaction-Analyse** Darüber hinaus wurde eine Rarefaction-Analyse durchgeführt. Sie dient dazu, um abzuschätzen, ob ausreichend 16S rRNA-Gen-Klone untersucht worden sind, um die Diversität im untersuchten Habitat bestimmen zu können. Die Daten wurden mittels DOTUR erstellt und in ein Kurvendiagramm übertragen (Abb. 9-11). Erreichen die Kurven eine Entsprechung einer Gerade der Steigung Null, können keine weitere OTUs für das entsprechende Habitat mehr erwartet werden (Achtziger *et al.*, 1992). In allen drei Gendatenbanken (NamUb, NamBr, NamAc) zeigt die Rarefaction-Analyse eine zunächst lineare, dann aber abflachende Kurve und die Asymptote erreicht nicht Null (Abb. 9-11).



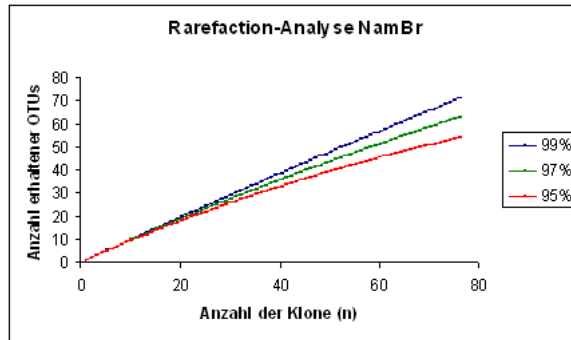
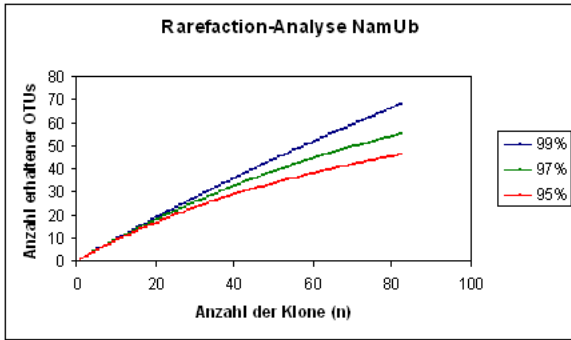


Abbildung 10: Rarefaction-Kurve NamUb **Abbildung 11:** Rarefaction-Kurve NamBr

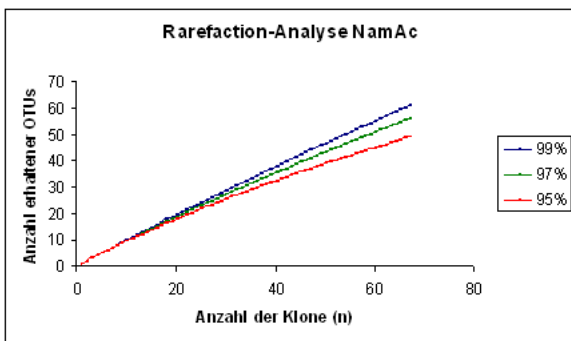


Abbildung 12: Rarefaction-Kurve NamAc

**3.2.1.3. Vergleichen der Gendatenbanken mittels Unifrac** Um die Gendatenbanken auf deren signifikante Unterschiede zu testen, wurde das Webtool UniFrac (Lopuzone *et al.*, 2005) verwendet. Dabei werden die habitatspezifischen Sequenzbäume verglichen und über den ermittelten P-Wert deren Unterschiede über die UniFrac-Signifikanz errechnet. Erreichen die p-Werte  $\leq 0,01$  unterscheiden sich die Habitate signifikant voneinander in deren Zusammensetzung. In Tab. 16 und 17 sind jeweils die P-Werte für die unterschiedlichen Habitate angegeben.

**Tabelle 17:** UniFrac Signifikanz; P-Werte der gesamten Klonbibliothek

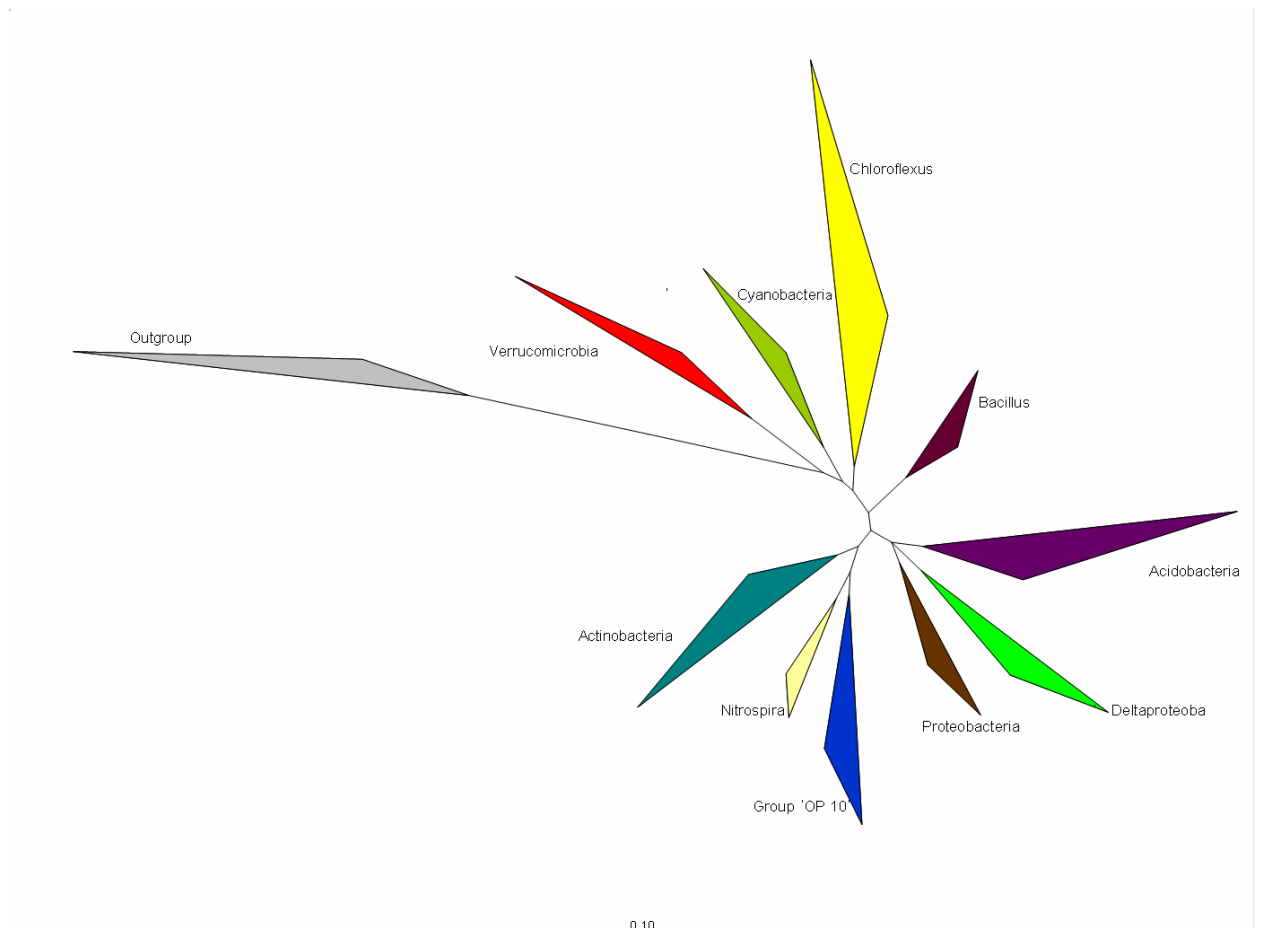
Korrigierte Werte	NamUb	NamBr	NamAc	Rohwerte	NamUb	NamBr	NamAc
NamUb	0	0,003	0,003	NamUb	0	0,001	0
NamBr	0,003	0	0,057	NamBr	0,001	0	0,016
NamAc	0,003	0,057	0	NamAc	0	0,019	0

**Tabelle 18:** UniFrac Signifikanz; P-Werte der acidobakteriellen Sequenzen

Korrigierte Werte	NamUb	NamBr	NamAc	Rohwerte	NamUb	NamBr	NamAc
NamUb	0	0,09	0,03	NamUb	0	0,03	0
NamBr	0,09	0	0,63	NamBr	0,03	0	0,21
NamAc	0,03	0,63	0	NamAc	0	0,21	0

### 3.2.2. Phylogenetische Analysen

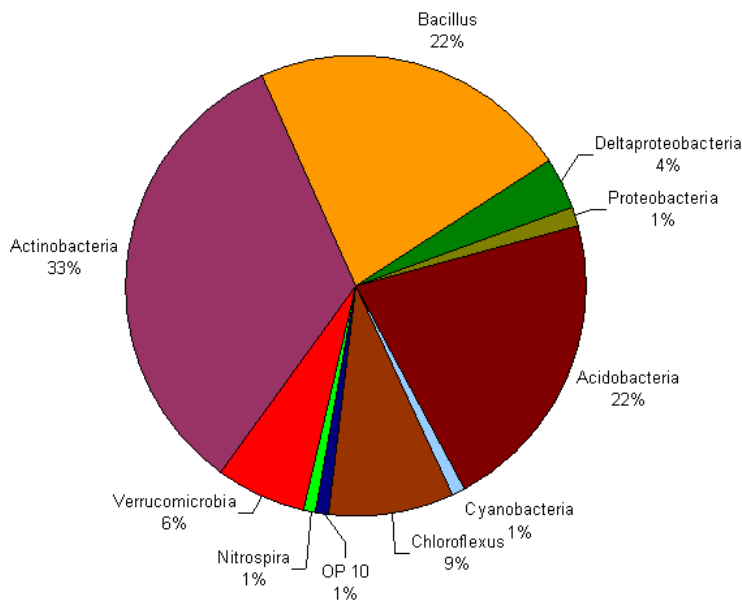
Für die phylogenetischen Analysen wurden die erhaltenen bakteriellen 16S-rRNA Sequenzen mit einer Länge von  $\geq 1200$  Basen verwendet. Jede erhaltene OTU wurde mit Sequenzen von nahe Verwandten und kultivierten Mikroorganismen der NCBI Datenbank über das Blastn Search Tool verglichen und in die Baumberechnungsverfahren als Referenzorganismen mit einberechnet.



**Abbildung 13:** Phylogenetischer auf 16S-rRNA basierender Maximum-Likelihood-Baum aller erhaltenen OTUs. Der Balken steht für 10 % Sequenzunterschied.

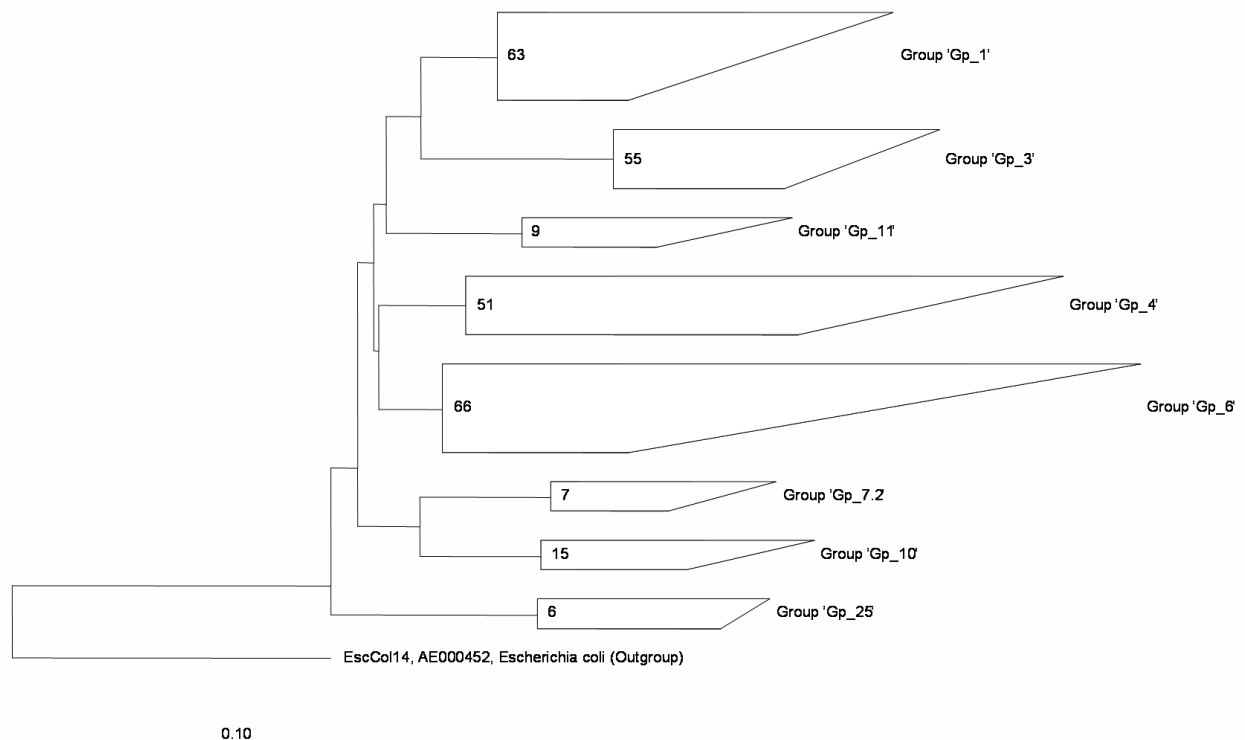
**3.2.2.1. Die bakteriellen Sequenzen** Die Analysen der bakteriellen Sequenzen ergaben ein zum Teil hoch diverses Spektrum vieler unterschiedlicher Phyla (Abb. 13). Die meisten Klone konnten den *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* und *Cyanobacteria* zugeordnet werden. Auch Vertreter des Phylums *OP10* konnten aufgenommen werden. Um einen Überblick über die bakterielle Diversität zu bekommen wurde ein Neighbour-Joining Baum berechnet und mit jeweils Bäumen anderer Berechnungsverfahren wie Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood verglichen.

Der überwiegende Teil der Sequenzen fällt zu den *Actinobacteria* (79). Sie zeigen taxonomisch ein benachbartes Verwandtschaftsverhältnis zu *Acidobacteria* (51) und zu *Verrucomicrobia* (15). Ein erheblicher Anteil der Sequenzen lassen sich dem Phylum *Bacillus* (53) zuordnen. Die *Nitrospina* Sequenzen (2) wurden mit den *Deltaproteobacteria* zur Klasse der *Proteobacteria* gezählt. Die meisten Sequenzen konnten bekannten Referenzorganismen bei der Baumberechnung zugeordnet werden. Dennoch konnte in der gesamten Klondatenbank keine bereits kultivierbare oder in den öffentlichen Datenbanken bekannte Sequenz mit einer Sequenzähnlichkeit von  $\geq 99\%$  gefunden werden. Von 234 Klonen haben 24 Klone eine Sequenzähnlichkeit von  $\geq 95\%$  mit kultivierbaren Mikroorganismen (Tab. 19, Anhang).

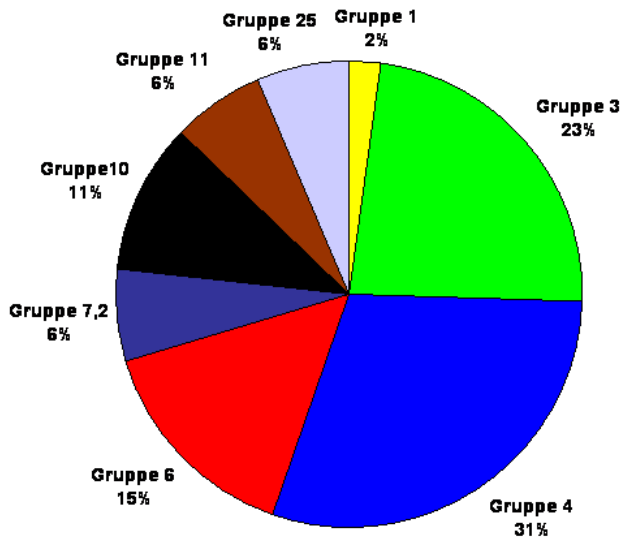


**Abbildung 14:** Verteilung der 16S rRNA-Gene in allen drei Klonbibliotheken

**3.2.2.2. Die acidobakteriellen Sequenzen** In dieser Arbeit wurde versucht einen Fokus auf acidobakterielle 16S-rRNA Sequenzen zu legen. Von 234 Sequenzen wurden 49 acidobakterielle Sequenzen gefunden. Sie stellen somit 22 % aller untersuchten 16S-rRNA Gensequenzen (Abb. 13). Die Einteilung der *Acidobacteria* in Untergruppen erfolgte von Hugenholtz *et al.* (1998), Zimmermann *et al.* (2005) und Barns *et al.* (2007). Die meisten Klone fallen in Gruppe 4 (16) gefolgt von Gruppe 3 (11) und Gruppe 6 (7) (Abb. 15, 16). Nur ein Klon kann Gruppe 1 zugeordnet werden. Zwei erhaltene acidobakterielle Sequenzen (NamBrCl30, NamAcCl99) haben eine Sequenzähnlichkeit von  $\geq 95\%$  mit dem *Acidobacterium Solibacter usitatus* Ellin6076 (CP000473) zugehörnd zu Gruppe 3. Sechs Klone (NamUbCl108, NamUbCl131, NamUbCl31, NamUbCl8, NamBrCl72; NamBrCl88,) zeigten ein Sequenzähnlichkeit von  $\geq 90\%$  zu *Solibacter usitatus* Ellin6076 (CP000437). Die übrigen Klone zeigten eine Sequenzähnlichkeit  $\leq 90\%$  zu bereits kultivierbaren oder beschriebenen Bakterien.



**Abbildung 15:** Neighbour-Joining Baum der Acidobakterien. Die Zahlen in den „Clustern“ stehen für die Anzahl an eingerechneten Sequenzen. Der Längsbalken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10 %.



**Abbildung 16:** Diagramm der erhaltenen Acidobakterien-Gruppen in allen Klonbibliotheken

Ein Vergleich der drei bodenspezifischen Klonbibliotheken zeigt die unterschiedliche Verteilung der Gruppen auf die Probensammelstellen. Bibliothek NamUb (unberührter Boden) beinhaltet 19 Klone auf 5 acidobakterielle Gruppen. NamBr (Brachlandboden) beinhaltet 19 Klone auf 6 Gruppen verteilt. Aus dem Ackerboden (NamAc) ließen sich nur 11 Klone aus 6 *Acidobakterien*-Gruppen nachweisen (Tab. 18).

**Tabelle 19:** Acidobakterien-Gruppenverteilung auf die unterschiedlichen Böden

Acidobakterien-Gruppe	NamUb	NamBr	NamAc	Gesamt
Gruppe 1			1	1
Gruppe 3	4	5	2	11
Gruppe 4	9	5	2	16
Gruppe 6	2	1	4	7
Gruppe 7,2		2	1	3
Gruppe 10	2	3		5
Gruppe 11		3		3
Gruppe 25	2		1	3

## 4. Diskussion

### 4.1. 16S rRNA-basierende Phylogenie

#### 4.1.1. Genbibliotheken

Ein Ziel dieser Arbeit war einen Einblick in die Diversität von *Acidobakterien* namibischer Böden unter verschiedenen anthropogenen Einflüssen zu gewähren. Dazu wurden drei Gendatenbanken basierend auf dem 16S rRNA-Gen von Bodenproben aus 10 cm Tiefe angelegt. Die Proben wurden aus unterschiedlich behandelten Böden in Namibia im Jahr 2007 genommen und genomische DNA extrahiert. Somit wird es möglich, die erhaltenen Sequenzen mit jenen bereits bekannter Mikroorganismen zu vergleichen und den Standort über Diversität und Phylogenie zu charakterisieren.

Das Erstellen einer Gendatenbank ist ein aufwendiges Verfahren und erfordert Genauigkeit im Prozessablauf und ein breit angelegtes Probenspektrum, um ein möglichst wirklichkeitsnahes Spektrum der mikrobiellen Gemeinschaften erfassen zu können. Daher ist zu erwähnen, dass keine Genbibliothek natürlicher Biotope die Gesamtheit der Biodiversität zu erfassen imstande ist. Zumal mit bestimmten Strategien versucht wird, einen Fokus auf definierte Mikroorganismen zu legen, um die große Komplexität und die Vielzahl an Wechselwirkungen fassbarer zu machen. Während der Versuchsabläufe der Erstellung einer Klonbibliothek können Fehler, wie ein PCR-Drift das Ergebnis fälschen und somit eine falsche Sicht auf die Proben vermitteln. Deshalb ist die kritische Auseinandersetzung mit den Methoden unerlässlich, um die Daten so gut als möglich verifizierbar zu machen. (Acinas *et al.*, 2005; Frostegard *et al.*, 1999; Lakay *et al.*, 2007; Polz and Cavanaugh 1998; v. Wintzingerode *et al.*, 1997)

#### 4.1.2. Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in namibischen Böden

Gemäß jüngsten Studien über 16S rRNA-Klonbibliotheken sind *Alphaproteobakterien* und *Acidobakterien* weltweit dominierend in Bodenhabitaten und stellen einen Anteil von bis zu 20 % aller untersuchten Klone. *Acidobakterien* erreichen dabei mitunter einen Anteil von 51 % bzw. 80 % in Böden (Dunbar *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2006). Weiters treten *Actinobakterien* und *Betaproteobakterien* zu jeweils 13 % und 10 % auf, während *Bacteroidetes* und *Firmicutes* (*Bacilli*) zu unter 5 % Abundanz aufweisen (Janssen, 2006). Bei Fierer *et al.* (2005) ergab eine durch Real-time-PCR unterstützte Untersuchung dreier unterschiedlicher mikrobieller Bodengemeinschaften, dass *Acidobakterien*

und *Alphaproteobakterien* zu 23 % bzw. bis zu 14 % vorkommen.

Im Vergleich dazu zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit einen differenten Abriss der mikrobiellen Zusammensetzung in namibischen Böden. Durch den in dieser Arbeit verwendeten Rückwärts-Primer (Tab. 10) zeigen sich Unterschiede in den mikrobiellen Gemeinschaften. Den Hauptanteil der vorkommenden Bakterienphyla stellten *Actinobakterien* mit 33 % Anteil, gefolgt von *Bacilli* mit 22 % und *Acidobakterien* mit 22 % Anteil. *Chloroflexi*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* erreichten einen Anteil von unter 10 %. Die übrigen Phyla wie *Cyanobacteria*, *Nitrospina* und das seltene Phylum *OP10* traten unter 1 % in dieser Klondatensammlung auf. Dabei entspricht die grundsätzliche Zusammensetzung der unterschiedlichen Phyla durchaus vorangegangenen Studien über bodenbakterielle Gemeinschaften, die mit allgemeinen 16S Primern untersucht wurden (*Proteobakterien*, *Actinobakterien*; *Acidobakterien*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Bacilli*) (Janssen, 2006). Dennoch unterscheidet sich die erhaltene Sequenzdatenbank durch die Abundanz der verschiedenen Phyla. Der hohe Anteil an *Actinobakterien* ist gemäß bereits untersuchten Böden unüblich. Wink *et al.* (2003), Brandão *et al.* (2001) und Eppard *et al.* (1996) zeigten jedoch, dass es in namibischen Böden Anzeichen dafür gibt, dass *Actinomyceten* und *Streptomyceten* eine dominante Rolle einnehmen.

**4.1.2.1. Coverage-Analyse** Die Coverage-Analyse für eine Sequenzähnlichkeit von  $\geq 97\%$  ergab bei den drei Klondatenbanken jeweils Werte von 59,52 % (NamUb), 30,76 % (NamBr) und 36,36 % (NamAc). Diese niedrigen Werte stehen für einen sehr hohen Anteil von OTUs bei vergleichsweise wenig untersuchten Sequenzen. Dies kann ein Indiz für die hohe Diversität und Vielfalt der Mikroorganismen im Boden sein. Die große Zahl an nicht kultivierbaren Organismen, die in der Klondatenbank vorkommen bestätigen die hohe Anzahl der OTUs. Um die Ergebnisse besser verifizieren zu können wäre eine höhere Anzahl von Sequenzen nötig.

**4.1.2.2. Rarefaction-Analyse** Die Rarefaction-Analyse wurde bei allen drei Klonbibliotheken mit  $\geq 99\%$ ,  $\geq 97\%$ , und  $\geq 95\%$  Sequenzähnlichkeit durchgeführt (Abb. 9-11). Keine der Rarefaction-Kurven flacht dabei stark ab. Das bedeutet, dass die Diversität im Habitat nicht als Ganzes erfasst werden konnte und weitere Analysen der Bodenproben Sicherheit brächten. Fasst man die Sequenzen bei einer Ähnlichkeit von  $\geq 95\%$  bereits zu einer OTU zusammen wird die Rarefaction-Kurve flacher, weil sie weniger OTUs auf die gleiche Anzahl an Sequenzen enthalten.

**4.1.2.3. UniFrac-Analyse** Die UniFrac-Analyse (Lopuzone *et al.*, 2006) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Bodenbearbeitungsformen. Dennoch scheinen NamBr und NamAc eine ähnlichere Zusammensetzung in deren mikrobiellen Gemeinschaften aufzuweisen als NamUb (Tab. 15). Das könnte damit in Verbindung stehen, dass NamUb, der unberührter Boden, noch nie anthropogen beeinflusst wurde. Der Brachboden (NamBr) und der Ackerboden (NamAc) wurden der landwirtschaftlichen Nutzung ausgesetzt und damit einem ähnlichen Nährstoffeintrag ausgesetzt. Dies könnte zu einer charakteristischen Verschiebung der Bakterienarten im Boden geführt haben und damit bestimmten Mikroorganismen einen Vorteil verschafft haben.

Im folgenden sollen die gefundenen Bakterienphyla in den namibischen Bodenproben genauer erläutert werden.

**4.1.2.4. Acidobacterien** Das Phylum der *Acidobacterien* beinhaltet bislang wenig bekannte Vertreter, da nur eine geringe Zahl kultiviert werden konnte. In den namibischen Bodenproben erreichen sie eine Abundanz von 22 %, also deutlich geringer als in anderen Klondatenbanken aus Böden (Janssen, 2006). *Acidobakterien* sind unterteilt in 26 Untergruppen (Barns *et al.*, 2007). Die Gruppen 1,3,4 und 6 sind vorwiegend in Böden zu finden (Barns *et al.*, 2007; Janssen 2006; Quaiser *et al.*, 2003). Die Gruppen 1,2 und 3 sind gemäß einiger Studien häufig in Habitaten mit pH-Wert im sauren Bereich zu finden (Männistö *et al.*, 2007; Sait *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2006).

Die meisten acidobakterielle Sequenzen, die in den namibischen Bodenproben gefunden wurden sind der Gruppe 4 (16), der Gruppe 3 (11) und der Gruppe 6 (7) zuzuordnen, also jene Gruppen, die nach Janssen (2006) bevorzugt in Böden vorkommen. Bislang konnten nur acht Gattungen charakterisiert werden. Die größte Sequenzähnlichkeit zu einem kultivierbaren Vertreter der *Acidobakterien* in den namibischen Bodenproben besteht einzig zu *Solibacter usitatus* und ist ein Vertreter der Gruppe 3. *Acidobacteria-3 sp. Ellin6076* wurde umbenannt in *Solibacter usitatus Ellin6076* und ist ein Bakterium, welches weltweit in Böden gefunden werden kann. Es wurde aus dem Boden von Weideland in Victoria, Australien isoliert (Ward *et al.*, 2009). Über Funktion und Aktivität sind noch wenig bekannt. Quaiser *et al.* (2003) versuchte Einblick in die Physiologie der *Acidobakterien* zu schaffen. Dabei wurden mögliche Indizien für einen horizontalen Gentransfer mit *Rhizobiales* gefunden. Weiters wurde in einem genomischen Fragment iPHB-Depolymerase, ein Schlüsselenzym für die Mobilisierung des Speicherstoffes Polyhydroxybuttersäure (PHB) gefunden. Dies deutet auf eine Kohlenstoffassimilation in Form von Stärke und Glucose für die Synthese von Energiespeicherstoffen.



Vergleicht man die unterschiedlich genutzten namibischen Böden hinsichtlich deren acidobakteriellen Zusammensetzung ergeben sich folgende Ergebnisse: Der unberührte Boden (NamUb) enthält die meisten *Acidobakterien* der Gruppe 4 (9). Im Brachlandboden ist sowohl Gruppe 3 als auch Gruppe 4 gleichermaßen vertreten (5). Im Ackerboden ist Gruppe 6 mit 4 Klonen die abundanteste. Dennoch kommen in allen Bodenformen etwa gleich viele Gruppen sowie Klone vor (Tab.16). Gruppe 1 kommt ausschließlich im Ackerboden vor. Gruppe 11 findet sich nur im Brachlandboden. Um eine signifikante Unterscheidung zwischen den Bodenformen und deren acidobakteriellen Zusammensetzung bestimmen zu können, bedurfte es jedoch eine auf *Acidobakterien* angelegte, spezifischere Klondatenbank.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Fokus auf das Phylum der *Acidobakterien* gelegt werden. Dazu wurde ein Primer (Tab. 10) hergenommen, um die Spezifität auf die passenden Sequenzen zu erhöhen. Zusätzlich wurden Oligonukleotide als Kompetitoren eingesetzt um die Amplifikation von ähnlichen Sequenzen während der PCR ins Besondere von *Streptomyces* und *Verrucomicrobia* zu unterbinden. Dennoch blieb die Ausbeute an acidobakteriellen Sequenzen unter den Erwartungen. Trotz der eingesetzten Kompetitoren wurde eine große Anzahl an Sequenzen erfasst, die nicht zu den *Acidobakterien* zu zählen sind.

Die geringe Spezifität des Primers kam in mehreren Fällen zur Geltung: Vorerst wurde versucht, über eine Temperatur-Gradienten-PCR die Spezifität gegenüber ähnlichen Mismatchsequenzen zu diskriminieren. Doch trotz mehrmaligen Versuchen, den Gradienten zu ändern, konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Deshalb wurde die errechnete Anlagetemperatur der Primersequenz für weitere PCR-Schritte verwendet, trotz des Risikos, unspezifische Amplifikate zu erhalten.

Die durch die Klonierung und Sequenzierung erhaltenen Teilsequenzen wurden via dem online-Werkzeug Blastn (Altschul *et al.*, 1990) mit bereits bekannten 16S rRNA-Sequenzen verglichen. Die Analyse mit dem Software-Paket Arb (Ludwig *et al.*, 2004) ergab den letztlich geringen Anteil acidobakterieller Sequenzen in den namibischen Bodenproben.

Die Interpretation von Daten aus Gendatenbanken sollte dennoch mit Vorsicht betrachtet werden. Nach Dedysh *et al.* (2006) ist die molekularbiologische Methode ein entscheidender Einflussfaktor auf die erhaltenen Ergebnisse. Eine erstellte Klondatenbank zeigte eine hohe Abundanz von *Acidobakterien*. Eine darauf folgende Analyse mittels FISH-Sonden (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) ergab eine deutlich geringere Häufigkeit. Dieses Ergebnis könnte den Schluss zulassen, dass *Acidobakterien* im Stande sind

Dauerstadien zu bilden, die für die FISH-Sonden schwerer zugänglich sind. Unter dieser Annahme könnten Dauerstadien auch die Lyse der Zellen während der DNA-Extraktion beeinträchtigen. Auch ein Primer-Fehler während dem Erstellen der Klondatenbank könnte eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse sein.

**4.1.2.5. Actinobakterien** Die *Actinobakterien* sind mit 33 % die meist vertretene Bakteriengruppe in dieser Klonbibliothek. Gemäß der bereits bekannten und identifizierten Arten repräsentiert dieses Phylum mit 5 Unterklassen und 14 Unterordnungen eine der größten taxonomischen Einheiten unter den Bakterienstämmen (Ventura *et al.*, 2007). Sie sind gram-positiv mit hohem C+G Gehalt in der DNA. Mit über 50 % Anteil sind *Actinomyceten* die dominierende Bakterienordnung. *Rubrobacterales* sind zu 39 % vertreten. Sechs Klone konnten mit einer Sequenzähnlichkeit von  $\geq 90\%$  folgenden bereits kultivierten Arten zugeordnet werden: *Arthrobacter globiformis* (EU221373), ein aerobes, nitratreduzierendes Bodenbakterium. Es besitzt die Fähigkeit Pestizide und Herbizide abzubauen (Eschbach *et al.*, 2003). *Geodermatophilus obscurus* (L40620) ist ein aerobes Bodenbakterium, welches bereits in Namibia beschrieben wurde (Eppard *et al.*, 1996). *Nonomuraea bangladeshensis* (AB274966), ein myzel-bildender Actinomycet, welcher zuerst in Bangladesh gefunden wurde (Ara *et al.*, 2007). *Streptomyces tendae* (D63873) ist ein Bodenbakterium, welches Nikkomycin, ein Antibiotikum gegen Pilze produziert (Seong *et al.*, 2004). *Blastococcus aggregatus* (AJ430193) ist ein aerobes Bodenbakterium, welches in Clustern mit *Geodermatophilus sp.* vorkommt (Urzì *et al.*, 2004). *Pseudonocardia asaccharolytica* (Y08536) ist ein sulfidoxidierendes Bodenbakterium (Reichert *et al.*, 1998). (Tab. 17, Anhang).

**4.1.2.6. Bacilli** Neben *Clostridia* und *Mollicutes* ist *Bacilli* die dritte Ordnung der Klasse der *Firmicutes*. Dieses Phylum beinhaltet gram-positive Bakterien mit geringem G+C Gehalt. Sie sind allgemein verbreitet in Böden, stellen jedoch nur einen geringen Anteil von 8 % in Bodengesellschaften, da deren Zellen und Dauerstadien (Sporen) schwer zu lysieren sind (Janssen, 2006). Deshalb kann angenommen werden, daß auch in den namibischen Bodenproben dieses Phylum abundanter ist, als es die Ergebnisse repräsentieren. In dieser Studie sind 14 Klone mit einer Sequenzidentität von  $\geq 90\%$  folgenden bereits kultivierbaren Arten am ähnlichsten: *Bacillus megaterium* (AJ71381) ist ein großes, stäbchenförmiges, aerobes Bodenbakterium (Vary *et al.*, 2007). *Bacillus oleronius* (AY988598) ist einer der wenigen gram-negativen Vertreter der *Firmicutes* und wurde zum ersten Mal aus einem Termitendarm isoliert (Kuhnigk *et al.*, 1995). *Bacillus*

*niacini* (AB021194) ist ein häufiges Bodenbakterium. Studien nach Felske *et al.*, (2004) ergaben, dass von allen aus Böden extrahierten *Bacillus*-Arten 15 % aus *Bacillus niacini* bestehen. *Ammoniphilus oxalaticus* (Y14589) Das Genus *Ammoniphilus* besteht aus aerobe endosporenbildende, gramvariable stäbchenförmige Bakterien, welche Ammonium abhängig, obligat oxalotroph und haloalkalitolerant sind sowie Oxidase- und Katalasepositiv sind (Zaitsev *et al.*, 1998). *Oxalophagus oxalicus* (Y14581) ist ein strikt anaerobes Bodenbakterium (Collins *et al.*, 1994). *Bacillus mucilaginosus* (EU592043) ist ein grampositives Rhizosphärenbakterium (Deng *et al.*, 2003) *Paenibacillus sp.* (AJ345018) und *Paenibacillus polymyxa* (AJ223989) sind Stickstoff fixierende Bodenbakterien, die in Symbiose mit der Vegetation stehen (Lindberg *et al.*, 1984). *Bacillus massiliensis* (DQ350816) Zellen sind aerobe, Endosporenbildende, gramnegative Stäbchen, mit peritriche Flagellen, die aus der Pflanzenrhizosphäre isoliert wurden. (Ding *et al.*, 2005). (Tab. 17, Anhang).

**4.1.2.7. *Chloroflexi*** *Chloroflexi* ist ein Phylum bestehen aus grünen Nichtschwefelbakterien, die in der Lage sind Photosynthese zu betreiben. Sie sind filamentös in ihrer Morphologie und gram-negativ. Ihr Vorkommen in Böden ist ubiquitär (Klappenbach *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit stellen *Chloroflexibakterien* mit 9 % die viertgrößte Gruppe.

**4.1.2.8. *Verrucomicrobia*** Dieses Phylum stellt mit 6 % in der Klonbibliothek vorhanden. *Verrucomicrobia* sind häufig vorkommende Bakterien in Böden. Buckley and Schmidt (2001) zeigten, dass die Abundanz der *Verrucomicrobia* starke mit dem Feuchtigkeitsgehalt im Boden korreliert. Da sich jedoch wenige Arten kultivieren lassen, ist auch über dieses Phylum wenig bekannt (Janssen, 2006). Drei Klone in den namibischen Bodenprobe hatten eine Sequenzähnlichkeit von  $\geq 90$  % mit einer bereits beschriebenen Art: *Opitus terrae* (CP001032). Dieses obligate anaerobe Bakterium wurde vom Boden eines Reisfeldes isoliert und fermentiert Polysaccharide im natürlichen Habitat (Rappé und Giovannoni, 2003).

**4.1.2.9. *Proteobacteria*** In der Klonbibliothek der vorliegenden Arbeit findet sich ein geringer Anteil an *Proteobacteria* (5 %). Keine Sequenz kann jedoch einer bekannten oder bereits beschriebenen Sequenz zugeordnet werden.

## 4.2. Konklusion

Betrachtet man die gesamte Genbibliothek, zeigt sich in allen Bodenproben eine hohe Diversität bestehend aus vielen verschiedenen phylogenetischen Gruppen. Ein Vergleich der Daten dieser Arbeit mit der Studie von Janssen (2006) und Buckley (2003) über die mikrobielle Diversität in Böden veranschaulicht eine ähnliche Zusammensetzung. Mit Ausnahme der *Proteobacteria* treten in allen untersuchten Bodenhabitaten *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* und *Bacilli* auf. In den namibischen Böden stellen *Actinobacteria* die größte Gruppe. Um dieses Ergebnis verifizieren zu können, sollte eine Vergleichsstudie mit allgemeinen bakteriellen Primern für die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt werden. Deshalb ist auch davon auszugehen, dass lediglich ein kleiner Ausschnitt der tatsächlichen Diversität dargestellt werden konnte. Ein weiteres Indiz für die hohe Diversität ist die geringe Zahl an bereits bekannten Mikroorganismen auf Artniveau.

Nur ein Vertreter konnte mit einer Sequenzähnlichkeit von  $\geq 99\%$  einem *Acidobacterium* zugeordnet werden. Mit dem verwendeten Primer, wurde versucht, ausschließlich *Acidobacteria* zu erfassen. Diese Gruppe stellte jedoch mit 22% nur den drittgrößten Anteil an allen erhaltenen Bakterienphyla. Einerseits erfasste der verwendete Primer eine Vielzahl an Nichtzielorganismen, andererseits konnten nur für die Gruppe der *Acidobacteria* Sequenzen auf Artniveau gefunden werden. Um diese *Acidobacteria* stärker hervorzuheben, ohne den Primer wechseln zu müssen, könnten weitere Kompetitoren, z.B. für *Actinobacteria* eingesetzt werden. Um die Spezifität auf *Acidobacteria* in der 16S rRNA-basierenden Methode zu erhöhen, könnte man mehrere *Acidobakterien*-spezifische Primer parallel verwenden. Um jedoch die gesamte Diversität erfassen zu können, ist es nötig, eine Vielzahl von Klonierungen mit allgemeinen bakteriellen Primern durchzuführen. Dabei könnten auch Techniken wie hoch parallele Mikroarrays z.B. Phylochips als sinnvolles Instrument eingesetzt werden. Um die Ergebnisse zu überprüfen wären FISH-Techniken (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) mit geeigneten Sonden angemessene Mittel.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die unterschiedlich genutzten Böden in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung zu charakterisieren. Dabei wurde ebenfalls ein Fokus auf acidobakterielle Sequenzen gelegt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die landwirtschaftlich genutzten Böden eine geringere Diversität aufweisen, als die unberührten Böden, da sich durch Düngung die Nährstoffkonzentrationen ändern und bestimmte Mikroorganismen im Wachstum begünstigen könnten. Auch Brandrodungen und das darauf folgende Ansetzen von Monokulturen könnte die Diversität in Böden verringern, denn

die fehlende Vielfalt der Pflanzendecke könnte Nischen in der Rhizosphäre verdrängen. Die namibischen Standorte zeigten aber keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der unterschiedlichen Böden. Betrachtet man ausschließlich acidobakterielle Sequenzen finden sich ebenfalls keine spezifische Verteilung. Um eine sichere Aussage über den Einfluss von landwirtschaftlicher Nutzung auf die mikrobielle Gemeinschaft treffen zu können, wären weitere Untersuchungen nötig (Pankhurst *et al.*, 2002). Man könnte auch hier verschiedene Primer anwenden, um auf Kosten der Spezifität die Gesamtheit der Mikroorganismen erfasst.

Keine molekularbiologische Technik ist frei von Fehlern und Nachteilen. Um eine umfangreiche Aussage treffen zu können ist es besonders in hoch diversen Habitaten wie Böden ratsam, verschiedene Techniken anzuwenden. Es bleibt zu hoffen, dass im Zuge der Entwicklung molekularbiologischer Verfahren sich die Untersuchung von Ökosystemen nicht nur vereinfacht sondern sich auch in Anbetracht der systematischen Messabweichungen spezifischere Betrachtungsweisen eröffnen.

## 5. Zusammenfassung

Der anthropogene Einfluss auf Bodenhabitate durch Industrie und Landwirtschaft ist nach wie vor weitgehend unbekannt. Intensive Landnutzung ist häufig der Grund für dauerhafte Schädigungen an Böden. Umso wichtiger ist es mikrobielle Gemeinschaften, die den ständigen Beanspruchungen wie Düngung und Brandrodung ausgesetzt sind zu untersuchen, um deren Bedeutung festzumachen. Zu diesem Zweck wurden Bodenproben aus drei unterschiedlich bearbeiteten Böden für diese Arbeit bereitgestellt. Die Probenahmestellen befinden sich in den offenen Waldregionen um das Kavangodelta im Norden Namibias und stehen im Zuge des BIOTA-Afrika Projektes unter ständiger Beobachtung.

Aufgrund der immer bedeutend werdenden molekularen Diagnostik wurde in dieser Arbeit die Strategie der 16S rRNA-basierenden Analyse auf drei unterschiedliche Bodenhabitate angewendet, um unkultivierte *Acidobacteria* zu charakterisieren, und den Einfluss der verschiedenen Bodenbehandlungsarten auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen. Für die Erstellung der 16S Gen-Bibliothek wurden spezielle Primer eingesetzt. Von 234 gefundenen Sequenzen konnten 79 den *Actinobacterien*, 51 den *Acidobakterien*, 53 den *Bacilli* und 19 den *Chloroflexi* zugeordnet werden. Damit stellen *Actinobakterien* mit 33 % das dominierende Phylum, gefolgt von *Acidobakterien* (22 %) und *Bacilli* (22 %). Die übrigen Phyla (*Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Nitrospira* und *OP10* machen 23 % der Klonbibliothek aus. Unter den *Acidobakterien* dominierte die Untergruppe 4 mit 16 Sequenzen gefolgt von der Untergruppe 3 mit 11 Sequenzen und Untergruppe 6 mit 7 Sequenzen. Zwischen den unterschiedlichen Bodenbehandlungsarten konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Sowohl der unberührte Boden, als auch die landwirtschaftlich genutzten Böden zeigten in der mikrobiellen Zusammensetzung ähnliche Spektren. Keine gefundene Sequenz konnte auf Artniveau einem bereits bekannten oder kultivierten Vertreter zugeordnet werden.

Die in dieser Studie erhaltenen 16S Gensequenz-Daten geben über die hohe Diversität in Bodenhabitaten Aufschluss. Weitere Untersuchungen könnten mit unterschiedlichen Primern oder größeren Klondatenbanken bzw. mit anderen molekularbiologischen Techniken als Referenz vorgenommen werden.

## 6. Summary

Only little is known about the influence of industry and agriculture on soil habitats and its microbial communities so far. Intensive land use is often a reason for irreparable soil damage. Therefore, it is even more important to investigate on the impact of anthropological influence like manuring and fire clearance on microorganisms in soil ecosystems. In this study soil samples were taken from three different treated soils in Namibia. The aims of this project were to identify a key group of soil microorganisms: Acidobacteria, which constitute a major part of soil bacteria. The database of Acidobacteria 16S rRNA sequences is growing permanently. The vast majority of this dataset is comprised of sequences from non-cultured representatives. In 2007, Barns and colleagues extended the classification of Acidobacteria from 11 to 26 subdivisions. The majority of the new subdivisions have only been detected in uranium contaminated soils so far.

The soil sampling sites, which are located in the Kavango region in the north of Namibia, are under maintenance of the BIOTA-Africa project. 29 different soil samples were screened from acre, pristine and fallow soils. Therefore, primers that specifically target the phylum Acidobacteria were used to create a 16S rRNA gene library. 234 sequences were obtained and analyzed. The dominant phyla of the gene library were Actinobacteria (33 %), Bacilli (22 %) Acidobacteria (22 %) Chloroflexi (9 %) and Verrucomicrobia (6 %) followed by Proteobacteria accounting for 5 % of the gene library. The remaining phyla (Nitrospira, Cyanobacteria, OP 10) accounted for less than 3 %. Among the acidobacterial sequences subdivision 4 dominated with 16 sequences followed by subdivision 3 (11 sequences) and subdivision 6 (7 sequences). There were no significant differences in the microbial composition between the different soil treatments. No bacterial clone had a sequence similarity at genus level so that the physiological traits discussed remain speculative.

Based on the 16S rRNA gene sequences obtained in this study, further studies can focus more specifically on individual microbial communities by using more specific primers or other molecular biological approaches to reveal their potential ecophysologies. The identification of such bio-indicators should assist in the development of a forecast system that allows predicting the influence of different soil management modes on soil fertility.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

16S rRNA	kleine Untereinheit der rRNA
°C	Grad Celsius
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
'	Minute
”	Sekunde
%	Prozent
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs	Absolut
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ARB	Softwarepaket ARB (von <i>arbor</i> , lat. „Baum“)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	doppelt destilliert
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise



C	Cytosin, Kohlenstoff
c	centi ( $10^{-2}$ )
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CaSO <sub>4</sub>	Kalziumsulfat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
e <sup>-</sup>	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat. „und andere“)
EtBr	Etidium Bromid
Ethanol	Ethanol
F	Vorwärts (verwendet für Primer)
g	Gramm
G	Guanin
G+C	Mol % Guanin + Cytosin
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

HCl	Chlorwasserstoffsäure
k	Kilo ( $10^3$ )
Kan	Kanamycin
kb	kilobasen
KbL	„Kilobasen-Leiter“, DNS Längenstandard
l	Liter
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase
LB	Luria Bertani
m	milli ( $10^{-3}$ ), Meter
M	molar
MgCL <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ML	Maximum-Likelihood
MP	Maximum-Parsimony
n	nano ( $10^{-9}$ )
N	Normal
Nam	namibische Bodenprobe
nt	Nukleotid(e)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NJ	Neighbour-Joining
OTU	operational taxonomic unit
<i>p.a.</i>	<i>pro analyticum</i> (lat., „für die Analyse“), Reinheitsmaß

Pa	Pascal
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
R	Rückwärts (verwendet für Primer)
RDP	ribosomal database project
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (20 °C)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
<i>sp.</i>	Art
<i>spp.</i>	Arten
ss	„single stranded“, einzelsträngig
T	Thymin
Tab	Tabelle
$T_m$	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Temp.	Temperatur

U	Units (Enzym), Uracil
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteil(e)
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 8. Literaturverzeichnis

### Literatur

- ACHTZIGER, R., U. N., and H. ZWÖLFER, 1992 Rarefaction-methoden und ihre einsetzungsmöglichkeiten bei der zooökologischen zustandsanalyse und bewertung von biotopen. *Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz* **1**: 89–105.
- ACINAS, S. G., R. SARMA-RUPAVTARM, V. KLEPAC-CERAJ, and M. F. POLZ, 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**: 8966–8969.
- ALMEIDA, W. I., R. P. VIEIRA, A. M. CARDOSO, C. B. SILVEIRA, R. G. COSTA, *et al.*, 2009 Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. *Extremophiles* **13**: 263–271.
- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, and D. J. LIPMAN, 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- AMANN, R. I., W. LUDWIG, and K. H. SCHLEIFER, 1995 Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143–169.
- ARA, I., T. KUDO, A. MATSUMOTO, Y. TAKAHASHI, and S. OMURA, 2007 *Nonomuraea bangladeshensis* sp. nov. and *Nonomuraea coxensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1504–1509.
- ASHELFORD, K. E., N. A. CHUZHANOVA, J. C. FRY, A. J. JONES, and A. J. WEIGHTMAN, 2005 At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7724–7736.
- BAK, F., K. F., and F. ROTHFUSS., 1992 Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**: 529–534.
- BARNS, S. M., E. C. CAIN, L. SOMMERVILLE, and C. R. KUSKE, 2007 Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3113–3116.

- BARNS, S. M., S. L. TAKALA, and C. R. KUSKE, 1999 Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1731–1737.
- BEIER, S., K. P. WITZEL, and J. MARXSEN, 2008 Bacterial community composition in Central European running waters examined by temperature gradient gel electrophoresis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 188–199.
- BENSON, D. A., I. KARSCH-MIZRACHI, D. J. LIPMAN, J. OSTELL, B. A. RAPP, *et al.*, 2002 GenBank. *Nucleic Acids Res.* **30**: 17–20.
- BEZEMER, T. M., and W. H. VAN DER PUTTEN, 2007 Ecology: diversity and stability in plant communities. *Nature* **446**: 6–7.
- BLÖTHE, M., D. M. AKOB, J. E. KOSTKA, K. GÖSCHEL, H. L. DRAKE, *et al.*, 2008 pH gradient-induced heterogeneity of Fe(III)-reducing microorganisms in coal mining-associated lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1019–1029.
- BRANDÃO, P. F., L. A. MALDONADO, A. C. WARD, A. T. BULL, and M. GOODFELLOW, 2001 *Gordonia namibiensis* sp. nov., a novel nitrile metabolising actinomycete recovered from an African sand. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 510–515.
- BRONS, J. K., and J. D. VAN ELSAS, 2008 Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2717–2727.
- BRYANT, D. A., A. M. COSTAS, J. A. MARESCA, A. G. CHEW, C. G. KLATT, *et al.*, 2007 *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. *Science* **317**: 523–526.
- BUCKLEY, D. H., and T. M. SCHMIDT, 2001a Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 105–112.
- BUCKLEY, D. H., and T. M. SCHMIDT, 2001b The Structure of Microbial Communities in Soil and the Lasting Impact of Cultivation. *Microb. Ecol.* **42**: 11–21.
- BUCKLEY, D. H., and T. M. SCHMIDT, 2003 Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ. Microbiol.* **5**: 441–452.

- CARDENAS, E., and J. M. TIEDJE, 2008 New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 544–549.
- CHAN, O. C., X. YANG, Y. FU, Z. FENG, L. SHA, *et al.*, 2006 16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 247–259.
- CHEN, C. L., W. T. LIU, M. L. CHONG, M. T. WONG, S. L. ONG, *et al.*, 2004 Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 466–473.
- CHIEN, C., Y. KUO, C. CHEN, C. HUNG, C. YEH, *et al.*, 2008 Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *J Environ Sci (China)* **20**: 359–363.
- COATES, J. D., D. J. ELLIS, C. V. GAW, and D. R. LOVLEY, 1999 *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 4**: 1615–1622.
- COLE, J. R., B. CHAI, T. L. MARSH, R. J. FARRIS, Q. WANG, *et al.*, 2003 The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**: 442–443.
- COLLINS, M. D., P. A. LAWSON, A. WILLEMS, J. J. CORDOBA, J. FERNANDEZ-GARAYZABAL, *et al.*, 1994 The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 812–826.
- DAVIS, K. E., S. J. JOSEPH, and P. H. JANSSEN, 2005 Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 826–834.
- DE CÁRCER, D. A., M. MARTÍN, M. MACKOVA, T. MACEK, U. KARLSON, *et al.*, 2007 The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *ISME J* **1**: 215–223.
- DE DEYN, G. B., C. E. RAAIJMAKERS, H. R. ZOOMER, M. P. BERG, P. C. DE RUITER, *et al.*, 2003 Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity. *Nature* **422**: 711–713.

- DEDYSH, S. N., T. A. PANKRATOV, S. E. BELOVA, I. S. KULICHEVSKAYA, and W. LIESACK, 2006 Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2110–2117.
- DENG, S. B., R. B. BAI, X. M. HU, and Q. LUO, 2003 Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 588–593.
- DING, Y., J. WANG, Y. LIU, and S. CHEN, 2005 Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1271–1281.
- DUNBAR, J., S. M. BARNS, L. O. TICKNOR, and C. R. KUSKE, 2002 Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3035–3045.
- DUNBAR, J., S. TAKALA, S. M. BARNS, J. A. DAVIS, and C. R. KUSKE, 1999 Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1662–1669.
- DYKHUIZEN, D. E., 1990 Evolution. Mountaineering with microbes. *Nature* **346**: 15–16.
- EICHORST, S. A., J. A. BREZNAK, and T. M. SCHMIDT, 2007 Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2708–2717.
- EPPARD, M., W. E. KRUMBEIN, C. KOCH, E. RHIEL, J. T. STALEY, *et al.*, 1996 Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces. *Arch. Microbiol.* **166**: 12–22.
- ESCHBACH, M., H. MÖBITZ, A. ROMPF, and D. JAHN, 2003 Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 227–230.
- FELSENSTEIN, J., 1988 Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 521–565.



- FELSKE, A., W. M. DE VOS, and A. D. AKKERMANS, 2000 Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 118–122.
- FELSKE, A. D., V. TZENEVA, J. HEYRMAN, M. A. LANGEVELD, A. D. AKKERMANS, *et al.*, 2004 Isolation and biodiversity of hitherto undescribed soil bacteria related to *Bacillus niacini*. *Microb. Ecol.* **48**: 111–119.
- FIERER, N., M. A. BRADFORD, and R. B. JACKSON, 2007a Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354–1364.
- FIERER, N., J. L. MORSE, S. T. BERTHRONG, E. S. BERNHARDT, and R. B. JACKSON, 2007b Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology* **88**: 2162–2173.
- FILION, M., R. C. HAMELIN, L. BERNIER, and M. ST-ARNAUD, 2004 Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3541–3551.
- FOX, G. E., J. D. WISOTZKEY, P. JURTSUK, and G. E. FOX, 1992 How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166–170.
- FREITAS, D. B., M. P. REIS, L. M. FREITAS, P. S. ASSIS, E. CHARTONE-SOUZA, *et al.*, 2008 Molecular bacterial diversity and distribution in waste from a steel plant. *Can. J. Microbiol.* **54**: 996–1005.
- FROSTEGÅRD, A., S. COURTOIS, V. RAMISSE, S. CLERC, D. BERNILLON, *et al.*, 1999 Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5409–5420.
- FUKUNAGA, Y., M. KURAHASHI, K. YANAGI, A. YOKOTA, and S. HARAYAMA, 2008 *Acanthopleuribacter pedis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of *Acanthopleuribacteraceae* fam. nov., *Acanthopleuribacterales* ord. nov., *Holophagaceae* fam. nov., *Holophagales* ord. nov. and *Holophagae* classis nov. in the phylum 'Acidobacteria'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2597–2601.
- FURLONG, M. A., D. R. SINGLETON, D. C. COLEMAN, and W. B. WHITMAN, 2002 Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural

- soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1265–1279.
- GANS, J., M. WOLINSKY, and J. DUNBAR, 2005 Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**: 1387–1390.
- GARRIDO, P., E. GONZÁLEZ-TORIL, A. GARCÍA-MOYANO, M. MORENO-PAZ, R. AMILS, *et al.*, 2008 An oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray: its validation and its use to monitor seasonal variations in extreme acidic environments with total environmental RNA. *Environ. Microbiol.* **10**: 836–850.
- GOEBEL, B. M., and E. STACKEBRANDT, 1994 Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1614–1621.
- GOOD, I. J., 1953 The population frequency of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237–264.
- GREMION, F., A. CHATZINOTAS, and H. HARMS, 2003 Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* **5**: 896–907.
- GRÜTER, D., B. SCHMID, and H. BRANDL, 2006 Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxide levels on belowground bacterial diversity. *BMC Microbiol.* **6**: 68.
- HALL, J. R., K. R. MITCHELL, O. JACKSON-WEAVER, A. S. KOOSER, B. R. CRON, *et al.*, 2008 Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4910–4922.
- HAO, C. B., H. X. ZHANG, Z. H. BAI, Q. HU, and B. G. ZHANG, 2007 A novel acidophile community populating waste ore deposits at an acid mine drainage site. *J Environ Sci (China)* **19**: 444–450.
- HAO, C. B., H. X. ZHANG, Z. H. BAI, B. G. ZHANG, and X. X. ZHANG, 2006 [Biodiversity of acidophiles in the sediment at an acid mine drainage site]. *Huan Jing Ke Xue* **27**: 2255–2260.

- HAO, D. A. C., G. B. GE, and L. YANG, 2008 Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**: 204–212.
- HARTMAN, W. H., C. J. RICHARDSON, R. VILGALYS, and G. L. BRULAND, 2008 Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 17842–17847.
- HIRAISHI, A., N. KISHIMOTO, Y. KOSAKO, N. WAKAO, and T. . A. TANO, 1995 Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo-organotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 91–94.
- HOLLEMANN, A. F., and E. WIBERG, 1985 *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter.
- HUGENHOLTZ, P., B. M. GOEBEL, and N. R. PACE, 1998 Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765–4774.
- HUNTER, P. J., G. M. PETCH, L. A. CALVO-BADO, T. R. PETTITT, N. R. PARSONS, *et al.*, 2006 Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping-off disease caused by *Pythium sylvaticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6452–6460.
- JANSSEN, P. H., 2006 Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1719–1728.
- JANSSEN, P. H., P. S. YATES, B. E. GRINTON, P. M. TAYLOR, and M. SAIT, 2002 Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2391–2396.
- JONES, R. T., M. S. ROBESON, C. L. LAUBER, M. HAMADY, R. KNIGHT, *et al.*, 2009 A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J.*
- JOSEPH, S. J., P. HUGENHOLTZ, P. SANGWAN, C. A. OSBORNE, and P. H. JANSSEN, 2003 Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7210–7215.

- JURETSCHKO, S., A. LOY, A. LEHNER, and M. WAGNER, 2002 The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 84–99.
- JURETSCHKO, S., G. TIMMERMANN, M. SCHMID, K. H. SCHLEIFER, A. POMMERENING-RÖSER, *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**: 3042–3051.
- KARDOL, P., T. M. BEZEMER, and W. H. VAN DER PUTTEN, 2006 Temporal variation in plant-soil feedback controls succession. *Ecol. Lett.* **9**: 1080–1088.
- KIELAK, A., A. S. PIJL, J. A. VAN VEEN, and G. A. KOWALCHUK, 2008 Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 372–382.
- KIELAK, A., A. S. PIJL, J. A. VAN VEEN, and G. A. KOWALCHUK, 2009 Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME J* **3**: 378–382.
- KILLOPS, S. D., and V. J. KILLOPS, 1997 *Einführung in die organische Geochemie..* Enke.
- KLEINSTEUBER, S., F. D. MÜLLER, A. CHATZINOTAS, K. WENDT-POTTHOFF, and H. HARMS, 2008 Diversity and in situ quantification of Acidobacteria subdivision 1 in an acidic mining lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 107–117.
- KOCH, I. H., F. GICH, P. F. DUNFIELD, and J. OVERMANN, 2008 *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1114–1122.
- KOWALCHUK, G. A., D. S. BUMA, W. DE BOER, P. G. KLINKHAMER, and J. A. VAN VEEN, 2002 Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 509–520.
- KUHNIGK, T., E. M. BORST, A. BREUNIG, H. KÖNIG, M. D. COLLINS, *et al.*, 1995 *Bacillus oleronius* sp. nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). *Can. J. Microbiol.* **41**: 699–706.

- KUSKE, C. R., S. M. BARNS, and J. D. . A. BUSCH, 1997 Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3614–3621.
- KUSKE, C. R., L. O. TICKNOR, M. E. MILLER, J. M. DUNBAR, J. A. DAVIS, *et al.*, 2002 Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1854–1863.
- LAKAY, F. M., A. BOTHA, and B. A. PRIOR, 2007 Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 265–273.
- LANE, D. J., B. PACE, G. J. OLSEN, D. A. STAHL, M. L. SOGIN, *et al.*, 1985 Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6955–6959.
- LEE, S. H., J. O. KA, and J. C. CHO, 2008 Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 263–269.
- LIESACK, W., F. BAK, J. U. KREFT, and E. STACKEBRANDT, 1994 *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **162**: 85–90.
- LINDBERG, T., and U. GRANHALL, 1984 Isolation and Characterization of Dinitrogen-Fixing Bacteria from the Rhizosphere of Temperate Cereals and Forage Grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 683–689.
- LOZUPONE, C., M. HAMADY, and R. KNIGHT, 2006 UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* **7**: 371.
- LOZUPONE, C., and R. KNIGHT, 2005 UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8228–8235.
- LUDWIG, W., S. H. BAUER, M. BAUER, I. HELD, G. KIRCHHOF, *et al.*, 1997 Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 181–190.

- LUDWIG, W., O. STRUNK, S. KLUGBAUER, N. KLUGBAUER, M. WEIZENEGGER, *et al.*, 1998 Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554–568.
- LUDWIG, W., O. STRUNK, R. WESTRAM, L. RICHTER, H. MEIER, *et al.*, 2004 Arb: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- LUEDERS, T., and M. W. FRIEDRICH, 2003 Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 320–326.
- LUEDERS, T., M. MANEFIELD, and M. W. FRIEDRICH, 2004a Enhanced sensitivity of dna- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**: 73–78.
- LUEDERS, T., B. WAGNER, P. CLAUS, and M. W. FRIEDRICH, 2004b Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylophile community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* **6**: 60–72.
- MARTINY, A. C., H. J. ALBRECHTSEN, E. ARVIN, and S. MOLIN, 2005 Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8611–8617.
- MARTÍN-CUADRADO, A. B., P. LÓPEZ-GARCÍA, J. C. ALBA, D. MOREIRA, L. MONTICELLI, *et al.*, 2007 Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS ONE* **2**: e914.
- MEISINGER, D. B., J. ZIMMERMANN, W. LUDWIG, K. H. SCHLEIFER, G. WANNER, *et al.*, 2007 In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environ. Microbiol.* **9**: 1523–1534.
- MIKELSAAR, R., 1987 A view of early cellular evolution. *J. Mol. Evol.* **25**: 168–183.
- MÄNNISTÖ, M. K., M. TIROLA, and M. M. HÄGGBLÖM, 2007 Bacterial communities in Arctic fjords of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 452–465.

- N. KISHIMOTO, Y. KOSAKO, T. T., 1991 *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr Microbiol.* **22**: 1–7.
- NAGY, M. L., A. PÉREZ, and F. GARCIA-PICHEL, 2005 The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 233–245.
- NEI, M., S. KUMAR, and K. TAKAHASHI, 1998 The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12390–12397.
- OLSEN, G. J., D. J. LANE, S. J. GIOVANNONI, N. R. PACE, and D. A. STAHL, 1986 Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 337–365.
- OVREÅS, L., S. JENSEN, F. L. DAAE, and V. TORSVIK, 1998 Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2739–2742.
- PANKHURST, C. E., C. A. K. B. G. H., and B. D. HARCH., 2002 Impact of a change of tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in nsw, australia. *Bio. Fertil. Soils* **35**: 189–196.
- PANKRATOV, T. A., Y. M. SERKEBAEVA, I. S. KULICHEVSKAYA, W. LIESACK, and S. N. DEDYSH, 2008 Substrate-induced growth and isolation of Acidobacteria from acidic Sphagnum peat. *ISME J* **2**: 551–560.
- PARK, D. S., H. W. OH, W. J. JEONG, H. KIM, H. Y. PARK, *et al.*, 2007 A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *J. Microbiol.* **45**: 394–401.
- PHUNG, N. T., J. LEE, K. H. KANG, I. S. CHANG, G. M. GADD, *et al.*, 2004 Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**: 77–82.
- POLZ, M. F., and C. M. CAVANAUGH, 1998 Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3724–3730.

- QUAISER, A., P. LÓPEZ-GARCÍA, Y. ZIVANOVIC, M. R. HENN, F. RODRIGUEZ-VALERA, *et al.*, 2008 Comparative analysis of genome fragments of Acidobacteria from deep Mediterranean plankton. *Environ. Microbiol.* **10**: 2704–2717.
- QUAISER, A., T. OCHSENREITER, C. LANZ, S. C. SCHUSTER, A. H. TREUSCH, *et al.*, 2003 Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* **50**: 563–575.
- RAPPÉ, M. S., and S. J. GIOVANNONI, 2003 The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 369–394.
- REICHERT, K., A. LIPSKI, S. PRADELLA, E. STACKEBRANDT, and K. ALTENDORF, 1998 *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**: 441–449.
- SAIT, M., K. E. DAVIS, and P. H. JANSSEN, 2006 Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1852–1857.
- SAIT, M., P. HUGENHOLTZ, and P. H. JANSSEN, 2002 Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* **4**: 654–666.
- SANDAA, R., V. TORSVIK, F. L. ENGER, T. DAAE, D. CASTBERG, *et al.*, 1999a Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 237–251.
- SANDAA, R. A., O. ENGER, and V. TORSVIK, 1999b Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3293–3297.
- SANGER, F., S. NICKLEN, and A. R. COULSON, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- SCHLOSS, P. D., and J. HANDELSMAN, 2005 Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1501–1506.
- SCHLOSS, P. D., and J. HANDELSMAN, 2006 Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput. Biol.* **2**: e92.



- SCHOENBORN, L., P. S. YATES, B. E. GRINTON, P. HUGENHOLTZ, and P. H. JANSSEN, 2004 Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4363–4366.
- SEONG, C. N., J. S. JO, S. K. CHOI, S. W. KIM, S. J. KIM, *et al.*, 2004 Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Lett.* **26**: 907–909.
- SHINOZAKI, K., 1963 Note on the species-area-curve. proceedings of the 10th annual meeting of the ecological society of japan. **5**.
- SHOJI, T., S. OCHI, and M. OZAKI, 2008 Characterization of bacterial biofilm communities in tertiary treatment processes for wastewater reclamation and reuse. *Water Sci. Technol.* **58**: 1023–1030.
- SINGLETON, D. R., M. A. FURLONG, S. L. RATHBUN, and W. B. WHITMAN, 2001 Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4374–4376.
- SMALLA, K., U. WACHTENDORF, H. HEUER, W. T. LIU, and L. FORNEY, 1998 Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1220–1225.
- SMALLA, K., G. WIELAND, A. BUCHNER, A. ZOCK, J. PARZY, *et al.*, 2001 Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4742–4751.
- STAMATAKIS, A. P., T. LUDWIG, H. MEIER, and M. J. WOLF, 2002 AxML: a fast program for sequential and parallel phylogenetic tree calculations based on the maximum likelihood method. *Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf* **1**: 21–28.
- STEVENSON, B. S., S. A. EICHORST, J. T. WERTZ, T. M. SCHMIDT, and J. A. BREZNAK, 2004 New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4748–4755.
- STOTT, M. B., M. A. CROWE, B. W. MOUNTAIN, A. V. SMIRNOVA, S. HOU, *et al.*, 2008 Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ. Microbiol.* **10**: 2030–2041.

- SWOFFORD, D. L., P. J. WADDELL, J. P. HUELSENBECK, P. G. FOSTER, P. O. LEWIS, *et al.*, 2001 Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Syst. Biol.* **50**: 525–539.
- TORSVIK, V., F. L. DAAE, R. A. SANDAA, and L. OVREÅS, 1998 Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**: 53–62.
- TORSVIK, V., J. GOKSØYR, and F. L. DAAE, 1990a High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782–787.
- TORSVIK, V., K. SALTE, R. SØRHEIM, and J. GOKSØYR, 1990b Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 776–781.
- URZÌ, C., P. SALAMONE, P. SCHUMANN, M. ROHDE, and E. STACKEBRANDT, 2004 *Blastococcus saxobsidens* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970 and *Blastococcus aggregatus* Ahrens and Moll 1970. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 253–259.
- VARY, P. S., R. BIEDENDIECK, T. FUERCH, F. MEINHARDT, M. ROHDE, *et al.*, 2007 *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 957–967.
- VENTURA, M., C. CANCHAYA, A. TAUCH, G. CHANDRA, G. F. FITZGERALD, *et al.*, 2007 Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 495–548.
- VON MERING, C., P. HUGENHOLTZ, J. RAES, S. G. TRINGE, T. DOERKS, *et al.*, 2007 Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* **315**: 1126–1130.
- VON WINTZINGERODE, F., U. B. GÖBEL, and E. STACKEBRANDT, 1997 Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213–229.
- ØVREÅS, L., and V. TORSVIK, 1998 Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microb. Ecol.* **36**: 303–315.

- WARD, N. L., J. F. CHALLACOMBE, P. H. JANSSEN, B. HENRISSAT, P. M. COUTINHO, *et al.*, 2009 Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into their lifestyles in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* .
- WHITMAN, W. B., D. C. COLEMAN, and W. J. WIEBE, 1998 Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6578–6583.
- WINK, J., R. M. KROPPESTEDT, G. SEIBERT, and E. STACKEBRANDT, 2003 *Actinomyces namibiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 721–724.
- WISOTZKEY, J. D., P. JURTSCHUK, G. E. FOX, G. DEINHARD, K. PORALLA, *et al.*, 1992 Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 263–269.
- WOESE, C. R., 1987 Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221–271.
- WU, M., H. ZHANG, X. LI, Y. ZHANG, Z. SU, *et al.*, 2008 Soil fungistasis and its relations to soil microbial composition and diversity: a case study of a series of soils with different fungistasis. *J Environ Sci (China)* **20**: 871–877.
- YIN, H., L. CAO, G. QIU, D. WANG, L. KELLOGG, *et al.*, 2008a Molecular diversity of 16S rRNA and *gyrB* genes in copper mines. *Arch. Microbiol.* **189**: 101–110.
- YIN, H., L. CAO, M. XIE, Q. CHEN, G. QIU, *et al.*, 2008b Bacterial diversity based on 16S rRNA and *gyrB* genes at Yinshan mine, China. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 302–311.
- ZAITSEV, G. M., I. V. TSITKO, F. A. RAINEY, Y. A. TROTSSENKO, J. S. UOTILA, *et al.*, 1998 New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 1**: 151–163.
- ZHANG, H. B., W. SHI, M. X. YANG, T. SHA, and Z. W. ZHAO, 2007 Bacterial diversity at different depths in lead-zinc mine tailings as revealed by 16S rRNA gene libraries. *J. Microbiol.* **45**: 479–484.
- ZHARKIKH, A., and W. H. LI, 1995 Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. *Mol. Phylogenet. Evol.* **4**: 44–63.

ZUL, D., S. DENZEL, A. KOTZ, and J. OVERMANN, 2007 Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6916–6929.

## 9. Danksagung

Diese Diplomarbeit wurde am Department für Mikrobielle Ökologie an der Universität Wien im Zeitraum vom 12.12.07 - 20.05.09 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Wagner angefertigt. An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen tiefsten Dank aussprechen:

- Prof. Dr. Michael Wagner für die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Department für Mikrobielle Ökologie (DoME) schreiben zu können.
- Dr. Alexander Loy für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine reichliche Unterstützung.
- Dr. Michael Pester, der mir eine außerordentliche Betreuung zukommen ließ.
- Christian „Baron“ Baranyi, dem Labor- und Sequenziermeister, der auch noch viel von Musik versteht.
- Cecilia Wentrup, die mir die Grundzüge des Klonierens und von Arb näher brachte.
- Doris Steger, die mich in vielen Belangen intensiv unterstützt hat.
- Chrissy, Annelie und Sandra für ihre freundschaftliche Unterstützung und dem gesamten „Oberen Labor“.
- Karin, Roland, Thomas und Sylvia für ihren Beistand und dem gesamten „Unteren Labor“
- Allen DoMIes, die mich tatkräftig und mit gutem Rat unterstützt haben und mir ein angenehmes Arbeitsklima bescherten.
- Meiner Mutter Elisabeth Starke und meiner Schwester Janet Starke für die starke Unterstützung in Wien.
- Andi, Steve, Christoph und all meinen Freunden für deren Verständnis in dieser entbehrungsreichen Zeit.
- Alexander Gimbel, dem Chef des „Café Käuzchen“ und seinem Team für die mentale und monetäre Unterstützung durch sein Unternehmen.

Zu guter Letzt möchte ich Lydia, meiner geschätzten Freundin danken, die mich unverzagt durch diese schwierige Zeit mit Beistand und Zuspruch begleitet hat.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, diese Diplomarbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der erlaubten Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Wien, den 20.05.2009

.....

Ingo Starke

## A. Anhang

**Tabelle 20:** Bakterielle Sequenzen mit  $\geq 90\%$  Sequenzähnlichkeit zu kultivierbaren Mikroorganismen

Klasse	Klon	Anzahl der Klone	Nächster verwandter kultivierbarer Mikroorganismus	16S Sequenzähnlichkeit (%)
<i>Acidobacteria</i>	NamBrCl23	12	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076; CP000473	96
	NamAcCL23			96
	NamBrCl30			96
	NamUbCl108			92
	NamUbCl131			92
	NamUbCl31			99
	NamUbCl8			92
	NamBrCl72			96
	NamUbCl88			92
	NamAcCl99			95
	NamBrCl71			96
	NamAcCl99			96
<i>Actinobacteria</i>	NamBrCl167	6	<i>Arthrobacter globiformis</i> ; EU221373 <i>Geodermatophilus obscurus</i> ; L40620 <i>Nonomuraea bangladeshensis</i> ; AB274966 <i>Streptomyces tendae</i> ; D63873 <i>Blastococcus aggregatus</i> ; AJ430193 <i>Pseudonocardia asaccharolytica</i> ; Y08536	97
	NamBrCl134			97
	NamAcCl1602			99
	NamAcCl16			97
	NamAcCl202			97
	NamAcCl241			97
<i>Bacilli</i>	NamUbCl72	14	<i>Bacillus megaterium</i> ; AJ71381 <i>Bacillus megaterium</i> ; AJ71381 <i>Bacillus oleronius</i> ; AY988598 <i>Bacillus niacini</i> ; AB021194 <i>Ammoniphilus oxalaticus</i> ; Y14589 <i>Ammoniphilus oxalaticus</i> ; Y14589 <i>Oxalophagus oxalicus</i> ; Y14581 <i>Oxalophagus oxalicus</i> ; Y14581 <i>Bacillus mucilaginosus</i> ; EU592043 <i>Paenibacillus sp.</i> ; AJ345018 <i>Bacillus massiliensis</i> ; DQ350816 <i>Bacillus massiliensis</i> ; DQ350816 <i>Bacillus massiliensis</i> ; DQ350816 <i>Paenibacillus polymyxa</i> ; AJ223989	98
	NamAcCl1			98
	NamBrCl31			95
	NamBrCl23			96
	NamBrCl34			96
	NamAcCl83			96
	NamBrCl144			96
	NamBrCl198			96
	NamBrCl156			98
	NamBrCl6			97
	NamBrCl190			96
	NamAcCl19			96
	NamAcCl31			96
	NamAcCl234			97
<i>Verrucomicrobia</i>	NamUbCl197	3	<i>Opitutus terrae</i> ; CP001032	95
	NamUbCl197			
	NamUbCl36			

## B. Curriculum vitae

### **Persönliche Daten:**

*Name:* Ingo Claus Starke

*Geboren am:* 25. Mai 1977

*Geburtsort:* Salzburg

*Staatsbürgerschaft:* Österreichisch

### **Schulbildung:**

1998 Reifeprüfung, Salzburg

1992-1998 Bundes-Oberstufenrealgymnasium, Salzburg

1987-1992 Privatgymnasium Liefering, Salzburg

### **Studium:**

2007-2009 Diplomarbeit am Institut für Ökologie und Naturschutz unter der Leitung von o.Univ.Prof.Dr.Michael Wagner

2003-2007 Diplomstudium Biologie, Department f. Mikrobielle Ökologie, Universität Wien

1999-2003 Bakkalaureatsstudium Biologie, Universität Salzburg