universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Diversität und Biogeografie potentiell sulfatreduzierender Mikroorganismen in mitteleuropäischen Moorgebieten

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	**Christina Braunegger**
Matrikel-Nummer:	0403801
Studienrichtung/Studienzweig:	A 441 Diplomstudium Genetik - Mikrobiologie
Betreuer:	Prof. Dr. Michael Wagner

Wien, im August 2009

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG ..... S. 4

A.1. Der Schwefelkreislauf ..... S. 4
A.2. Physiologie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen ..... S. 5
A.3. Phylogenie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen ..... S. 7
A.4. Habitate sulfatreduzierender Mikroorganismen ..... S. 8
A.4.1. Moorgebiete als Habitate ..... S. 9
A.4.1.1. Hochmoore ..... S. 9
A.4.1.2. Niedermoore ..... S. 10
A.4.1.3. Übergangsmoore ..... S. 10
A.4.1.4. Feuchtwiesen ..... S. 10
A.5. Bedeutung der sulfatreduzierenden Mikroorganismen für Mensch und Umwelt ..... S. 11
A.6. Erforschung sulfatreduzierender Mikroorganismen auf molekularer Ebene ..... S. 12
A.7. Mikrobielle Biogeografie ..... S. 13
A.8. Ziele dieser Arbeit ..... S. 14

B. MATERIAL UND METHODEN ..... S. 15

B.1. Allgemeine Materialien und Techniken ..... S. 15
B.1.1. Verbrauchsmaterialien ..... S. 15
B.1.2. Technische Geräte ..... S. 15
B.1.3. Chemikalien ..... S. 16
B.1.4. Kits für molekularbiologische Techniken ..... S. 17
B.1.5. Öffentlich zugängliche Software ..... S. 17
B.1.6. Puffer und Medien ..... S. 17
B.1.7. Proben ..... S. 18
B.1.8. Extraktion genomischer DNS aus Bodenproben ..... S. 19
B.1.9. Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen ..... S. 20
B.1.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte ..... S. 20
B.1.11. Agarose-Gelelektrophorese ..... S. 21
B.1.12. Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen ..... S. 22

B.1.13. DNS-Sequenzierung ..... S. 22
B.1.14. Vergleichende Sequenzanalyse ..... S. 22
B.1.14.1. Schnellanalyse von Sequenzen mittels BLAST ..... S. 22
B.1.14.2. Erstellung phylogenetischer Baumdiagramme mittels ARB ..... S. 23
B.1.14.3. Aktualisierung der ARB-Datenbank ..... S. 23
B.1.14.4. Baumberechnungsmethoden ..... S. 24
B.2. Erstellung von *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken ..... S. 26
B.2.1. PCR zur Amplifikation von *dsrA* und *dsrAB* ..... S. 26
B.2.2. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung der PCR-Produkte ..... S. 27
B.2.3. Klonierung der PCR-Produkte mit dem TOPO® XL PCR Cloning Kit ..... S. 27
B.2.4. Selektion rekombinanter Klone ..... S. 27
B.2.5. Anzucht und Stammhaltung transformierter *E. coli*-Zellen ..... S. 28
B.2.6. Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen (Miniprep) ..... S. 28
B.2.7. Statistische Auswertung ..... S. 29
B.2.7.1. Gruppierung in Operational Taxonomic Units (OTUs) ..... S. 29
B.2.7.2. Berechnung des Erfassungsgrades einer Genbank ..... S. 30
B.3. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) ..... S. 30
B.3.1. PCR zur Amplifikation von *dsrAB* ..... S. 31
B.3.2. Aufreinigung der *dsrAB*-PCR-Produkte ..... S. 31
B.3.3. PCR zum Anbringen der GC-Clamp ..... S. 31
B.3.4. Standard für die Vergleichbarkeit verschiedener DGGE-Gele ..... S. 32
B.3.5. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen ..... S. 33
B.3.6. Elektrophorese ..... S. 34
B.3.7. Statistische Auswertung der DGGE-Gele mittels Primer 5.0 ..... S. 34
B.3.8. Isolierung und Reamplifikation der *dsrB*-Genfragmente aus den DGGE-Gelen ..... S. 35
B.3.9. Aufreinigung und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente ..... S. 36

C. ERGEBNISSE ..... S. 37

C.1. Extraktion genomischer DNS aus Bodenproben ..... S. 37
C.2. *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken ..... S. 37
C.3. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese ..... S. 41
C.3.1. Amplifikation der *dsrB*-Genfragmente ..... S. 41
C.3.2. Elektrophorese ..... S. 44
C.3.3. Statistische Auswertung mit dem Programm Primer 5.0 ..... S. 46

C.3.4. Reamplifikation und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente ..... S. 49
C.3.5. Vergleichende Sequenzanalyse ..... S. 49
C.3.5.1. Schnellanalyse der Sequenzen mittels BLAST ..... S. 49
C.3.5.2. Verwandtschaft der *dsrB*-Sequenzen mit bereits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs ..... S. 50
C.3.5.3. Berechnung phylogenetischer Baumdiagramme mit *dsr*-Sequenzen aus Süßwasser-Feuchtgebieten ..... S. 52
C.3.5.4. Identifizierung moorspezifischer SRM-Cluster ..... S. 58

D. DISKUSSION ..... S. 65

D.1. *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken ..... S. 65
D.1.1. Spezifität der Rückwärtsprimer DSR4Rmix und DSRARmix ..... S. 65
D.1.2. Diversität und Phylogenie der *dsrAB*-Genbank-Sequenzen ..... S. 66
D.2. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese ..... S. 67
D.2.1. Amplifikation der *dsrB*-Genfragmente ..... S. 68
D.2.2. Auswertung der DGGE-Bandenmuster ..... S. 68
D.2.3. Reamplifikation und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente ..... S. 71
D.2.4. Vergleichende Sequenzanalyse ..... S. 72
D.2.4.1. Phylogenetische Analysen mit *dsrB* ..... S. 72
D.2.4.2. Identifizierung moorspezifischer SRM-Cluster ..... S. 74

E. ZUSAMMENFASSUNG ..... S. 76

F. ANHANG ..... S. 78

G. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... S. 86

H. LITERATURVERZEICHNIS ..... S. 89

I. DANKSAGUNG ..... S. 101

J. CURRICULUM VITAE ..... S. 102

A. EINLEITUNG

A.1. Der Schwefelkreislauf

Schwefel ist essentiell für alle Lebewesen, da er als Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin in Proteinen enthalten ist. Er macht etwa 1 % der gesamten pflanzlichen und etwa 1,5 % der tierischen und prokaryotischen Biomasse aus. Das größte Reservoir für Schwefel ist die Erdkruste, in der er vor allem in Form von Kalziumsulfat ($CaSO_4$), Pyrit (FeS_2) und Eisensulfid (FeS) vorkommt. In der Atmosphäre liegt er hauptsächlich als Schwefelwasserstoff (H_2S) oder Schwefeldioxid (SO_2) vor, in Meerwasser als Sulfat (SO_4^{2-}). In Sedimenten und Böden findet man Schwefel großteils in reduzierter Form als Sulfid (HS^- oder S^{2-}) oder als SH-Gruppe in organischen Verbindungen (Keppler 1999).

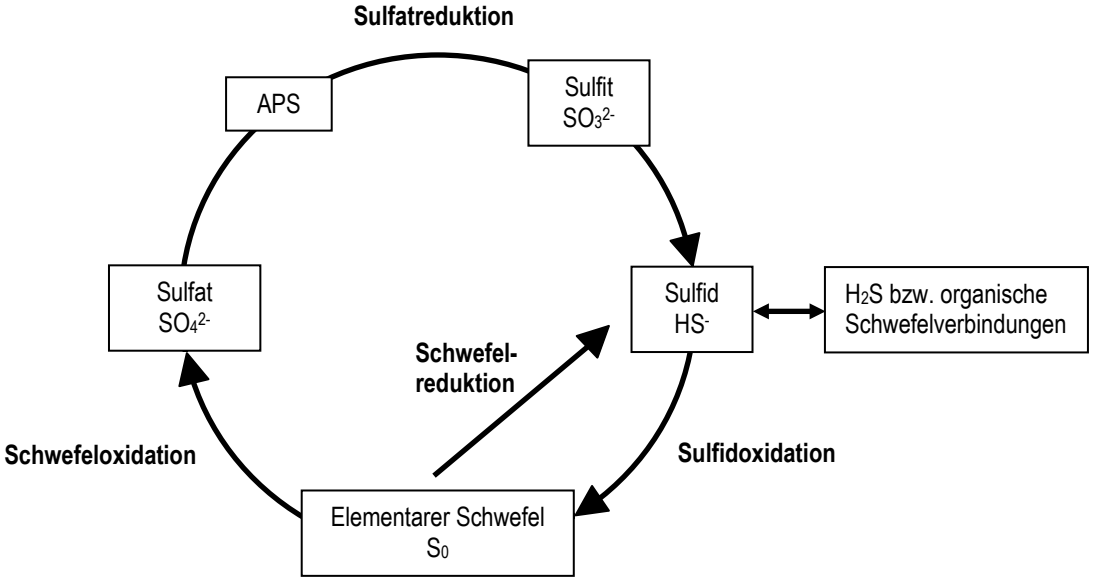


Abb. A.1: Der biochemische Schwefelkreislauf

Sowohl Mikroorganismen als auch Pflanzen können Sulfat zu Sulfid reduzieren um daraus organische Schwefelverbindungen für ihren Biomasseaufbau zu bilden („Assimilatorische Sulfatreduktion"). Sulfatreduzierende Mikroorganismen (SRM) können zudem in der „Dissimilatorischen Sulfatreduktion" diesen Prozess für ihre Energiegewinnung nutzen (s.u.). Organische Rückstände toter Pflanzen und Tiere werden durch Destruenten wie Würmer, Pilze oder Mikroorganismen unter anderem zu H_2S abgebaut, so dass Schwefelverbindungen wieder in den Boden oder die Atmosphäre zurückgelangen. Bei der Sulfid- und Schwefeloxidation, die ausschließlich von Pro-

karyoten durchgeführt werden, entsteht letztlich wieder Sulfat und der Schwefelkreislauf wird geschlossen (Munk 2001).

A.2. Physiologie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen

Die funktionelle Gilde der SRM besitzt die unter allen Lebewesen einzigartige Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion, einer Form der anaeroben Atmung. Während der Übertragung von Elektronen von Donor- auf Akzeptormoleküle wird eine protonenmotorische Kraft aufgebaut, die über ATP-Synthasen für die Energiegewinnung verwendet wird (Madigan 2000).

Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) nutzen ein breites Spektrum an Elektronendonoren: molekularen Wasserstoff (H_2), niedermolekulare organische Verbindungen wie Formiat (LeGall 1988), Methanol (Nanninga 1987), Ethanol (Ouattara 1999), Oxalat (Postgate 1963), Lactat, Butyrat (Widdel 1981), Propionat, Pyruvat, Aceton, Malat, Fumarat, Succinat, (Widdel 1988), Aminosäuren wie Alanin, Serin, Glycin und Cystein (Brandt 1999), aromatische Verbindungen wie Benzoat, Phenol, Anilin, Nicotinat oder Indol (Widdel 1980; Bak 1986; Schnell 1989) sowie gesättigte Kohlenwasserstoffe (Aeckersberg 1998). Sulfatreduzierende *Archaea* (SRA) können zudem komplexe organische Substrate wie Stärke oder Pepton als Elektronendonoren verwenden (Stetter 1987).
Die Oxidation dieser Substrate zu Acetat oder CO_2 geht mit der Reduktion von Sulfat über mehrere Intermediate zu Sulfid (HS^-) bzw. Schwefelwasserstoff (H_2S) einher (Abb. A.2).

Die Aufnahme von Sulfat in die Zelle geschieht über einen Co-Transport mit Protonen oder Na^+-Ionen; alle enzymatischen Reaktionen der dissimilatorischen Sulfatreduktion laufen im Cytoplasma oder an der Innenseite der Plasmamembran ab (Cypionka 1989; Kreke 1992).

Sulfat, die am höchsten oxidierte Form des Schwefels (Oxidationszahl +VI), ist chemisch sehr stabil und wenig reaktiv. Deshalb wird es zunächst von dem Enzym ATP-Sulfurylase aktiviert und unter ATP-Verbrauch in Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) umgewandelt (Peck 1959), bevor die eigentliche Reduktion zu Sulfit (+IV) oder seiner protonierten Form, Bisulfit ($SO_2O\text{-}H)^-$, passiert. Dieser Schritt wird von der sogenannten APS-Reduktase katalysiert. Sulfit besitzt ein freies Elektronenpaar am Schwefelatom und ist wesentlich reaktiver als Sulfat. Es benötigt keine weitere Aktivierung durch ATP und wird durch die Dissimilatorische (Bi-)Sulfitreduktase (DSR) direkt zu Sulfid (-II) reduziert (Rabus 2000).

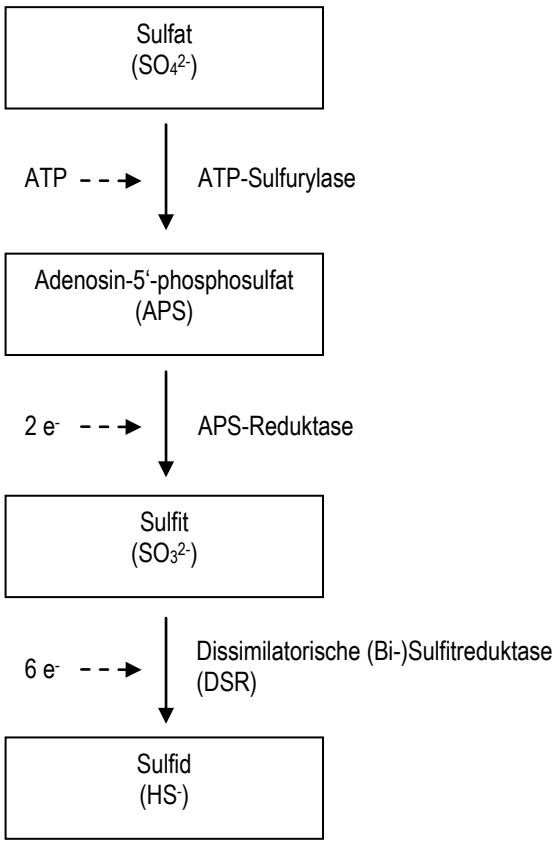


Abb. A.2: Schematische Darstellung der dissimilatorischen Sulfatreduktion

Die Reduktion von APS zu Sulfit beinhaltet den Transfer von zwei Elektronen, die Sulfitreduktion den von sechs Elektronen, so dass bei der dissimilatorischen Sulfatreduktion insgesamt acht Elektronen auf ein Schwefelatom übertragen werden (Rabus 2000).

Die DSR hat meist eine tetramerische $\alpha_2\beta_2$-Struktur. Die α- und β-Untereinheiten werden von *dsrA* und *dsrB* codiert, welche in einem gemeinsamen *dsrAB*-Operon angeordnet sind (Dahl 1993). In *Desulfovibrio spp.* wurde eine dritte Untereinheit (γ) identifiziert (Pierik 1992; Steuber 1995), weshalb auch eine hexamerische $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Struktur postuliert wird. Im aktiven Zentrum der DSR befinden sich zwei metallhaltige Cofaktoren, die an der Übertragung von Elektronen beteiligt sind: ein Sirohäm, das zur Klasse der Porphyrine gehört (Murphy 1973), und ein FeS-Cluster, das aus jeweils vier Eisen- und Schwefelatomen besteht (Crane 1995; Crane 1996).

Das Vorhandensein der *dsr*-Gene befähigt die betreffenden Mikroorganismen zwar zur dissimilatorischen Sulfatreduktion, es bedeutet aber nicht zwingend, dass sie diese auch aktiv betreiben. *dsrAB* findet man außer bei SRM noch bei Mikroorganismen, die Sulfit (z.B. *Carboxydothermus hydrogenoformans* oder *Desulfitobacterium spp.*) oder Organosulfonate (z.B. *Bilophila wadsworthia*) redu-

zieren, und bei manchen syntrophen Verwandten von SRM, die jedoch selbst kein Sulfat, Sulfit oder Organosulfonate reduzieren (Laue 2001; de Bok 2005; Wu 2005; Imachi 2006; Imachi 2007). Im Folgenden soll deshalb der Begriff „sulfatreduzierende Mikroorganismen" als „potentiell sulfatreduzierende Mikroorganismen" bzw. „Mikroorganismen mit *dsrAB*" verstanden werden.

A.3. Phylogenie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen

SRM sind eine phylogenetisch sehr heterogene Gruppe von Mikroorganismen, die ein gemeinsames physiologisches Merkmal hat: Sie besitzen die in der Natur einzigartige Fähigkeit, Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor in ihrem Energiemetabolismus zu nutzen.

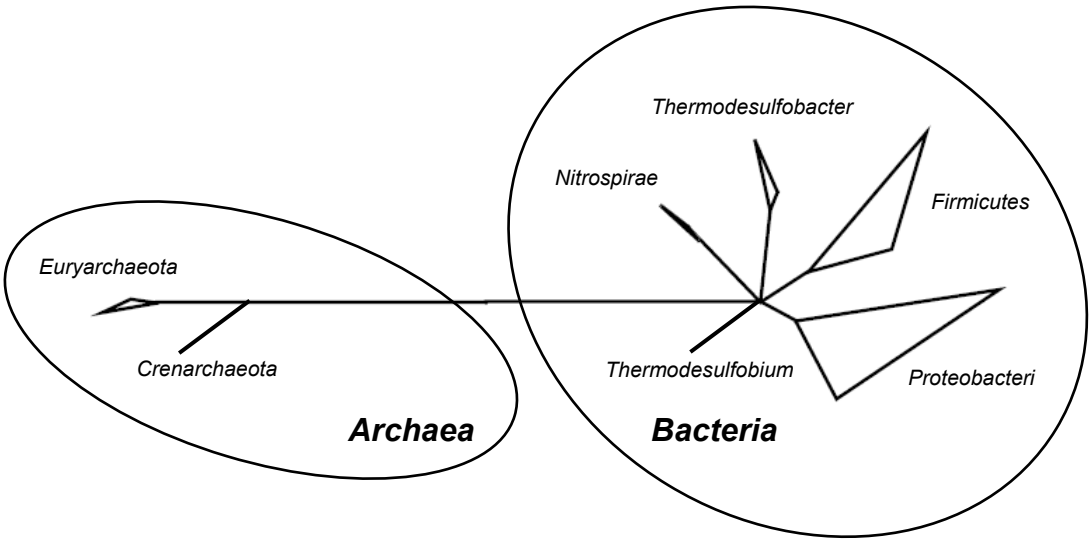


Abb. A.3: Archaeale und bakterielle Phyla, die SRM beinhalten. Schematische Darstellung basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen der 16S rRNS-Gene (Loy 2003).

Basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen der 16S rRNS-Gene wurden bisher vier bakterielle (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae*) und zwei archaeale Phyla (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*) beschrieben, die Vertreter der SRM beinhalten (Abb. A.3). SRB finden sich innerhalb der *Proteobacteria* in den Ordnungen *Desulfobacterales* (z.B. *Desulfobacter spp.*, *Desulfobulbus spp.*), *Syntrophobacterales* (z.B. *Syntrophobacter spp.*, *Desulfacinum spp.*) und *Desulfovibrionales* (z.B. *Desulfovibrio spp.*, *Desulfomicrobium spp.*), wobei allerdings nur die *Desulfovibrionales* eine echte monophyletische Gruppe bilden. Eine exakte Abgrenzung zwischen *Desulfobacterales* und *Syntrophobacterales* kann, zumindest auf 16S rRNS-Basis, nicht vollzogen werden, da sie bei phylogenetischen Verwandtschaftsanalysen keine eigenständigen Cluster bilden, sondern polytomische Baumtopologien produzieren (Loy 2003). Zu den Gattungen *Desulfotomaculum* und *Desulfosporosinus* vom Phylum *Firmi-*

cutes gehören die Endosporen bildenden, gram-positiven „Low GC"-SRB (Stackebrandt 1997). Bei den sulfatreduzierenden Vertretern des Phylums *Nitrospirae* handelt es sich um die thermophilen *Thermodesulfovibrio spp.* (Maki 2001). *Thermodesulfobacterium spp.* sind die einzigen bisher identifizierten SRB im Phylum *Thermodesulfobacteria* und ebenfalls thermophil. *Thermodesulfobium narugense* gehört auch zu den SRM, lässt sich aber keinem der sechs genannten Phyla zuordnen (Mori 2003). Unter den hyperthermophilen *Archaea* findet man die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion bei *Archaeoglobus spp.* (*Euryarchaeota*), *Thermocladium modestius* und *Caldivirga maquilingensis* (*Crenarchaeota*) (Burggraf 1990; Itoh 1998; Itoh 1999; Klein 2001).

A.4. Habitate sulfatreduzierender Mikroorganismen

SRM leben bevorzugt in anoxischen Habitaten und galten lange Zeit als strikt anaerobe Organismen. Diese Hypothese wurde aber durch Studien widerlegt, die verschiedene Strategien zur Vermeidung von oxischem Stress in SRM nachwiesen (Krekeler 1998; Eschemann 1999; Abreu 2000; Bade 2000; Cypionka 2000; Sigalevich 2000; Baumgarten 2001; Lumppio 2001; Silva 2001a; Silva 2001b; Dolla 2006).

Die wichtigsten und gleichzeitig am besten untersuchten Lebensräume der SRM sind anoxische marine Sedimente, die ihnen wegen der hohen Sulfatkonzentration des Meerwassers (rund 28 mM) sehr gute Lebensbedingungen bieten (Devereux 1994; Llobet-Brossa 1998; Dhillon 2003; Savvichev 2003; Wilms 2006). Die Spanne der optimalen Wachstumstemperaturen ist extrem groß: Psychrophile Vertreter wurden z.B. aus arktischen und antarktischen Sedimenten isoliert (Knoblauch 1999a; Knoblauch 1999b; Knoblauch 1999c; Ravenschlag 2001; Purdy 2003), während Hyperthermophile in Tiefsee-Hydrothermalsystemen vorkommen (Jorgensen 1992). Neben extremen Temperaturen werden von manchen SRM auch extreme pH-Werte toleriert, die nachweislich von 2,6 (Koschorreck 2003) bis 10,7 (Foti 2007) reichen. Außerdem können manche SRM wie *Desulfohalobium retbaense* und *Desulfovermiculus halophilus* bei sehr hohen Salzkonzentrationen (bis 240 g NaCl/l) wachsen (Ollivier 1994; Beliakova 2006).

Bei den Süßwasserhabitaten handelt es sich unter anderen um Grundwasser (Chang 2001; Lehman 2001), Sedimente (Habicht 1997; Sass 1997), anoxische Bioreaktoren bzw. Kläranlagen (Lens 1995; Manz 1998; Oude Elferink 1998; De Smul 1999; Schramm 1999; Ito 2002a; Ito 2002b), Reisfelder (Wind 1995; Ouattara 1999; Stubner 2000), Biofilme (Ramsing 1993) oder heiße Quellen (Mori 2003). SRM wurden auch als Symbionten mariner Oligochaeten (Dubilier 2001; Blazejak 2005), Polychaeten (Cottrell 1999) und Makrophyten (Küsel 1999) identifiziert

und kommen zudem in der Rhizosphäre verschiedener Meer- und Süßwasserpflanzen (Rooney-Varga 1997; Hines 1999; Wind 1999; Nielsen 2001; Scheid 2001; Bahr 2005; Vladar 2008) sowie in mikrobiellen Matten (Teske 1998; Minz 1999a; Minz 1999b; Nakagawa 2002; Wieland 2005) vor.

A.4.1. Moorgebiete als Habitate

Ein weiterer, weniger gut erforschter Lebensraum für SRM sind Moorgebiete, z.B. die Everglades in Florida (Castro 2002), Torfmoore im US-Bundesstaat New York (Martinez 2007) oder das Moorgebiet Schlöppnerbrunnen im bayerischen Fichtelgebirge (Alewell 1996; Alewell 1999; Alewell 2001; Horn 2003; Loy 2004; Schmalenberger 2007). In letzterem wurden im Jahr 2004 basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen der *dsrAB*-Gene elf SRM-OTUs identifiziert, die jeweils Organismen mit mindestens 90 % Proteinsequenzidentität beinhalten (Loy 2004) und die auch in der vorliegenden Arbeit in die Analysen einbezogen wurden.

Moore sind ständig oder großteils wassergesättigte und daher schon in geringen Bodentiefen anoxische Lebensräume, in denen die Akkumulierung organischer Materie stets höher ist als deren Abbau (Horn 2003). Mit einem Anteil von 10 bis 30 % an der terrestrischen Methanemission sind sie die größte natürliche Methanproduktionsquelle (Metje 2005). Aufgrund ihres hohen Gehalts an organischen Stoffen sind sie zudem wichtige Kohlenstoffreservoirs von globaler Bedeutung. Mikrobielle Prozesse wie Sulfatreduktion und Methanproduktion sind in erster Linie von Temperatur, Wasser- und Sauerstoffgehalt des Bodens abhängig, wobei sie in wärmeren und trockeneren Klimaten in größerem Ausmaß ablaufen (Bonnett 2006). Moorböden enthalten normalerweise nur geringe Mengen an Sulfat und beherbergen daher hauptsächlich langsam wachsende SRM (Widdel 1992; Wind 1999).

Die in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben stammen aus verschiedenen Typen von Moorgebieten, die sich in ihrem Nährstoffgehalt, ihrer Vegetation und der Art ihrer Wasserversorgung unterscheiden:

A.4.1.1. Hochmoore

Hochmoore sind typischerweise mit Torfmoos (*Sphagnum*), Riedgrasgewächsen (Seggen) und Sträuchern bewachsen und besitzen eine charakteristische Mikrotopografie mit Hügeln und Senken. Sie sind ombrotroph, also ausschließlich von Regenwasser gespeist, und weisen deshalb

niedrige pH-Werte (unter 4,5) und nur geringe Konzentrationen an Nähr- und Mineralstoffen auf (Gorham 1985). Die Entstehung und Entwicklung dieses Moortyps ist hauptsächlich von Temperatur, Wasserüberschuss im Boden und Torfbildung abhängig, wobei die letzteren beiden Faktoren zudem die hügelige Landschaftsform bedingen. In feucht-kalten Klimazonen in Nordamerika, Großbritannien, Skandinavien und Russland sind Hochmoore weit verbreitet, in Mittel- und Südeuropa weisen sie nur eine geringe räumliche Ausdehnung auf. Diese Ökosysteme reagieren sehr sensibel auf atmosphärische Veränderungen, sowohl auf Klimaschwankungen als auch auf die chemische Zusammensetzung der Niederschläge. Ein vermehrter Stickstoffeintrag kann z.B. die Zusammensetzung der Fauna, die Umsetzungsraten organischer Substrate und die Emissionsraten von CO_2 und Methan beeinflussen (Goulden 1998; Oechel 2000; Melillo 2002; Bragazza 2006; Bragazza 2007).

A.4.1.2. Niedermoore

Niedermoore sind minerotroph, d.h. sie werden hauptsächlich von Grundwasser gespeist und sind deshalb meist nährstoffreicher als Hochmoore. Der Nährstoffgehalt verschiedener Niedermoore kann aber sehr unterschiedlich sein und ist in erster Linie abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Wassers, der Vegetation und der Aktivität von Mikroorganismen im Boden. Nährstoffarme Niedermoore sind häufig dicht mit Torfmoos bewachsen, das in nährstoffreichen Gebieten seltener vorkommt. Niedermoore sind im Gegensatz zu Hochmooren weniger sauer, was in Kombination mit dem höheren Nährstoffgehalt zu einer höheren pflanzlichen und mikrobiellen Artenvielfalt führt (Fisk 2003).

A.4.1.3. Übergangsmoore

Als sogenannte Übergangs- oder Zwischenmoore werden Gebiete bezeichnet, die gerade einen Entwicklungsprozess von Nieder- zu Hochmooren durchlaufen und mehr und mehr unabhängig von der Grundwasserversorgung werden. Auch hinsichtlich ihrer Fauna stellen sie eine Mischform der beiden Moortypen dar (Würz 1992; Ellenberg 1996).

A.4.1.4. Feuchtwiesen

Feuchtwiesen sind nicht ständig, aber über einen großen Teil des Jahres wassergesättigt und trocknen höchstens oberflächlich an. Man findet sie häufig an Gewässerrändern und in Regionen, deren Bodenbeschaffenheit das Absickern von Wasser erschwert. Ihr Reichtum an Mineralstof-

fen und der hohe Anteil anorganischer Verbindungen (Sand, Lehm) bedingt eine große Vegetationsvielfalt, wobei die dominierenden Pflanzenarten hochwachsende Gräser und Schilf sind (Ellenberg 1996; USEPA Stand 09.07.2009).

A.5. Bedeutung der sulfatreduzierenden Mikroorganismen für Mensch und Umwelt

Sulfatreduzierer spielen neben anderen Mikroorganismen in Mooren eine wichtige Rolle in der Regulierung des Gehalts, Kreislaufs und der Freisetzung verschiedener Stoffe (Nährstoffe und Treibhausgase wie Methan und CO_2). Sie haben großen Einfluss auf die Wasserqualität dieser Gebiete und außerdem auf den globalen Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf (Hartman 2008).

SRM tragen zur Entgiftung verseuchter Ökosysteme bei, indem sie Erdöl bzw. Bestandteile davon während der Sulfatreduktion oxidieren (Hansen 1994; Rabus 1996; Caldwell 1998; Phelps 1998; Harms 1999; Annweiler 2001; Morasch 2001; Kniemeyer 2003; Miranda-Tello 2003; Noh 2003) und Schwermetalle wie Cadmium, Cobalt, Kupfer, Nickel oder Zink abbauen (White 1998; White 2000; Boothman 2006; Geets 2006). Gut dokumentiert ist auch die Umwandlung von Uran (+VI) in seine unlösliche Form (+IV) durch *Desulfovibrio spp.* (Lovley 1992; Lovley 1993). Durch Methylierungs- und Demethylierungsreaktionen können SRM Metallverbindungen unschädlich machen (Muller 1999; Safinowski 2004), allerdings wird die Toxizität von Quecksilber durch Methylierung erhöht (King 2000).
In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass SRM auch organische Schadstoffe (z.B. das krebserregende Benzen) und Xenobiotika degradieren (Lovley 1995a; Lovley 1995b; Phelps 1998; Krumholz 1999; Rooney-Varga 1999; Anderson 2000; Löffler 2000; Meckenstock 2000; Glombitza 2001; Chang 2002; Sung 2003; Ulrich 2003; Oka 2008).

Ein weiterer Effekt, der durch diese Gruppe von Mikroorganismen hervorgerufen wird, ist die Korrosion metallischer Oberflächen (Magot 1992; Magot 1997; Javaherdashti 1999; Videla 2000), die z.B. an Öl- und Gaspipelines erhebliche Schäden anrichten kann (Rao 2000). Einige SRM, darunter *Desulfovibrio spp.*, stehen auch im Verdacht potentiell humanpathogen zu sein und an Erkrankungen wie Parodontitis (Langendijk 1999; Langendijk 2000; Langendijk 2001; Loubinoux 2002a), eitrigen Leberabszessen (Tee 1996; Schoenborn 2001), Magen-Darm-Entzündungen (Loubinoux 2002b) und Bakteriämie (McDougall 1997; Loubinoux 2000) beteiligt zu sein.

Unter anaeroben Bedingungen konkurrieren sulfatreduzierende mit methanogenen Mikroorganismen um H_2 und Acetat, die sie als Elektronendonoren verwenden (Widdel 1992). SRM haben eine höhere Affinität gegenüber diesen Substraten und zusätzlich ein viel breiteres Spektrum an potentiellen Elektronendonoren, so dass sie den Methanogenen in Habitaten mit ausreichenden Sulfatkonzentrationen generell überlegen sind (Abram 1978; Isa 1986; Stams 2003; Stams 2005; Muyzer 2008). Zu diesen Habitaten zählen u.a. die Moore; dort erfüllen SRM die wichtige ökologische Funktion der Inhibierung der Methanproduktion, welche ein nicht zu vernachlässigender Faktor des Treibhauseffektes ist (Gauci 2004).

A.6. Erforschung sulfatreduzierender Mikroorganismen auf molekularer Ebene

Zur Untersuchung der Diversität, Abundanz und Aktivität von SRM wurden bisher verschiedene molekularbiologische Techniken eingesetzt, wie etwa Klonierungen von *dsrAB* in pCRII-TOPO-Vektorplasmide (Castro 2002), Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) (Ito 2002a), Real Time PCR (Stubner 2004), Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) (Muyzer 1993), Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) (Perez-Jimenez 2005) oder auch Microarrays (Loy 2002).
Diese Studien basieren hauptsächlich auf den 16S rRNS-Genen, seit einigen Jahren werden allerdings auch vermehrt Gene für SRM-spezifische Enzyme als Forschungsgrundlage verwendet: zum einen *apsA*, das eine Untereinheit der APS-Reduktase codiert (Friedrich 2002), zum anderen das oben erwähnte *dsrAB*. Vergleichende Sequenzanalysen sowohl mit 16S rRNS-Genen als auch mit *dsrAB* ergaben großteils übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der phylogenetischen Einteilung der SRM, wobei Mitglieder der Gattungen *Thermodesulfobacterium* und *Desulfotomaculum* die größten Unterschiede zwischen 16S rRNS- und *dsrAB*-gestützten Berechnungen aufwiesen, was ihre phylogenetische Position innerhalb der SRM betraf (Klein 2001).

Funktionelle Gene als molekulare Marker haben gegenüber den 16S rRNS-Genen den Vorteil, dass sie nicht nur Schlüsse über die Phylogenie, sondern auch über die Physiologie der untersuchten Mikroorganismen zulassen. Besonders im Fall der SRM sind phylogenetische Analysen auf 16S rRNS-Ebene (und zum Teil auch auf *dsrAB*-Ebene) nicht immer einfach, da einerseits Vertreter dieser Gilde in verschiedenen Phyla vorkommen und andererseits mit dieser Methode auch Nicht-SRM erfasst werden (Wagner 2005; Imachi 2006).

Ein funktionelles Markergen wie *dsrAB* muss zwei wesentliche Kriterien erfüllen, nämlich eine konstante physiologische Funktion und eine möglichst große Konserviertheit innerhalb der betreffenden Organismengruppe (Ludwig 1998).

A.7. Mikrobielle Biogeografie

Die Biogeografie beschäftigt sich mit der Verbreitung von Biodiversität über Zeit und Raum und versucht zu erklären, welche Organismen welche Lebensräume besiedeln und warum. Tiere und Pflanzen sind seit Jahrhunderten Gegenstand dieses Forschungsgebietes, die mikrobielle Biogeografie hingegen hat sich erst in den letzten Jahren zu einem relevanten Zweig der Wissenschaft etabliert. Das liegt einerseits an der Entwicklung kultivierungsunabhängiger und immer sensitiverer Nachweismethoden auf DNS-Ebene, andererseits an der vermehrten interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Ökologie und Molekularbiologie (Horner-Devine 2004a).

Die ursprüngliche Annahme, dass frei lebende Mikroorganismen ubiquitär verbreitet sind und keine biogeografischen Muster ausbilden (Baas-Becking 1934; Finlay 1999a; Finlay 1999b), ist noch nicht gänzlich widerlegt, obwohl zunehmend gegenteilige Beobachtungen publiziert werden (Fulthorpe 1998; Cho 2000; Papke 2003; Whitaker 2003). Für die Entstehung und Erhaltung von Biodiversität kennt man drei Hauptfaktoren: Verbreitung, Artenbildung und Extinktion (Horner-Devine 2004a), wobei die passive Verbreitung von Mikroorganismen über die Luft (Lighthart 1997; Gage 1999), im Wasser (McNair 1997; Leff 1998) oder an Wirtspflanzen oder –tieren über Distanzen von tausenden km reichen kann (Martiny 2006). Prinzipiell haben Mikroorganismen also die Möglichkeit, sich in alle bekannten Lebensräume auf diesem Planeten auszubreiten, es liegt aber an ihren jeweiligen physiologischen Eigenschaften, ob sie in diesen neuen Habitaten überleben und sich weiterentwickeln können (Green 2008).

A.8. Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zwei Rückwärtsprimer (DSR4Rmix und DSRARmix) auf ihre Spezifität hinsichtlich der mit ihnen amplifizierbaren Genabschnitte und der Diversität der mit ihnen erfassten SRM zu untersuchen. Sie wurden dazu in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der *dsr*-Gene aus genomischer DNS eingesetzt und die erhaltenen Produkte zur Erstellung zweier Genbanken verwendet. Die resultierenden Klonsequenzen wurden mit einer umfangreichen Sequenzdatenbank abgeglichen um Aufschluss über ihre Identität zu erhalten. Zusätzlich wurden sie einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen, um eine eventuelle phylogenetische Verwandtschaft mit bereits bekannten Vertretern der sulfateduzierenden Mikroorganismen festzustellen.

Des Weiteren sollte die Biogeografie von SRM in verschiedenen mitteleuropäischen Moorgebieten basierend auf der Sequenz ihrer *dsrB*-Gene untersucht werden. Diese Gene wurden mittels PCR aus der genomischen DNS amplifiziert und über eine Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese analysiert. Durch die statistische Auswertung der Bandenmuster sollten Informationen darüber gewonnen werden, welchen Einfluss abiotische Faktoren und geografische Distanzen auf die Zusammensetzung der SRM-Lebensgemeinschaften in den verschiedenen Untersuchungsgebieten haben.

Aus DGGE-Gelen isolierte und reamplifizierte *dsrB*-Genabschnitte wurden sequenziert und phylogenetischen Verwandtschaftsanalysen unterzogen, um ihre evolutionäre Stellung innerhalb der SRM in einem Baumdiagramm zu zeigen. Zusätzlich wurden potentiell moorspezifische Cluster identifiziert, die ausschließlich aus Moorböden isolierte *dsr*-Sequenzen beinhalten, und mittels detaillierter Berechnungen auf ihre Stabilität hin überprüft.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1. Allgemeine Materialien und Techniken

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit zweifach entsalztem und filtriertem Wasser ($H_2O_{bidest.}$) aus einer Reinstwasseranlage (Biocel Milli-Q®, Millipore Corporation, Billerica, USA) hergestellt und in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Varioclav 135S, H+P, München, Deutschland) für 20 min bei 121°C und 1 atm sterilisiert. Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet.

B.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle B.1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Duran® Laborglasflaschen, verschiedene Größen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG), verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microseal "A" Film	MJ Research, Waltham, USA
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten twin.tec PCR plate 96	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Minisart® Sterilfilter, verschiedene Porengrößen	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Frankreich
Parafilm® "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland
Petrischalen 94/16	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 10 ml	Sterilin Ltd., Caerphilly, Großbritannien
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Polypropylen-Probengefäße 14 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Reagenzgläser	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Schraubdeckel-Plastikgefäße, verschiedene Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

B.1.2. Technische Geräte

Tabelle B.2: Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Bead Beater	BIO 101, Carlsbad, USA
DCode™ DGGE-Apparatur	Biorad, München, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem MediaSystem FlexiLine 4040	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gelschlitten Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gradientenpumpe Econo Model EP-1	Biorad, München, Deutschland
Heizblock VWR Digital	VWR International, West Chester, USA
Mikrowelle MD6460	Microstar
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

pH-Meter WTW inoLab Level 1	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PowerPac Basic Stromquelle	Biorad, München, Deutschland
Rundschüttler Innova 2300	New Brunswick Scientific, Madison, USA
Sterilbank Safe 2010 Modell 1.2	Holten, Jouan Nordic, Dänemark
Transilluminator UST-30M-8E (312 nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Magnetrührer: RCT Basic Variomag® Maxi	 IKA® Werke GmbH, Schwabach, Deutschland Variomag®, Dayton Beach, USA
Thermocycler: iCycler Mastercycler gradient	 Biorad, München, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waagen: Analytic Plus BL6100	 Ohaus Corp., New York, USA Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Frankreich
Zentrifugen: Galaxy Mini Centrifuge Mikro 20 Mikro 22 R Rotina 35 R	 VWR International, West Chester, USA Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

B.1.3. Chemikalien

Tabelle B.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 40% (37,5:1)	Biorad, München, Deutschland
Agar	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Borsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Diethyl-Pyrocarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Formamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (KBL)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff (Urea)	USB Corp., Cleveland, USA
Hefeextrakt	Oxoid LTD, Hampshire, Großbritannien
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Kanamycin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

Modified TAE Buffer Concentrate (50x)	Millipore Corporation, Bedford, USA
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (NaOH)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
S.O.C.-Medium	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
SYBR® Green I	Cambrex Bio Science Inc., Rockland, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Oxoid LTD, Hampshire, Großbritannien
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

B.1.4. Kits für molekularbiologische Techniken

Tabelle B.4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
DNA Gel Extraction Kit	Millipore Corporation, Bedford, USA
Power Soil™ DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

B.1.5. Öffentlich zugängliche Software

Tabelle B.5: Verwendete Software

Name	Quelle	Referenz
ARB	www.arb-home.de	(Ludwig 2004)
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	(Altschul 1990)
ChromasPro	www.technelysium.com.au/ChromasPro.html	Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australien
DOTUR	schloss.micro.umass.edu/software/dotur.html	(Schloss 2005)
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html	(Benson 2002)
Primer 5.0	www.primer-e.com	PRIMER-E Ltd., Plymouth, Großbritannien
probeCheck	www.microbial-ecology.net/probecheck	(Loy 2008)

B.1.6. Puffer und Medien

50x TAE-Puffer

Tris	2 M
Natriumacetat	500 mM
EDTA	50 mM

pH 8 mit Eisessig einstellen

1x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer	20 ml
$H_2O_{bidest.}$	ad 1.000 ml

10x TBE-Puffer

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

pH 8,3 - 8,7 mit HCl einstellen

1x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	100 ml
$H_2O_{bidest.}$	ad 1.000 ml

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
$H_2O_{bidest.}$	ad 1 l

Um festes LB-Medium herzustellen, wurden 15 g Agar pro Liter Flüssigmedium beigefügt. Falls die Zugabe von Kanamycin nötig war (Endkonzentration 50 mg/l im Flüssigmedium und 100 mg/l im Festmedium), so erfolgte diese erst nach dem Autoklavieren.

B.1.7. Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Bodenproben stammen aus verschiedenen Moorgebieten in Österreich, Bayern und Südtirol. In jedem Gebiet wurde von drei Entnahmestellen und jeweils zwei Entnahmetiefen (ausgenommen Schlöppnerbrunnen; hier gab es vier Entnahmetiefen) Erdmaterial entnommen und bei -80°C gelagert. In die Grabungsstellen nachsickerndes Wasser wurde sterilfiltriert und für die Bestimmung des pH-Wertes und der Sulfatkonzentration verwendet.

Tabelle B.6: Untersuchte Moorgebiete

Moorgebiet	geografische Lage	Moortyp	pH-Wert [a)]	Sulfat-Konz.[a) d)]	Entnahmetiefen	Zeitpunkt der Probennahme
Krähmoos	46° 47' 60" N 11° 54' 18" O (Südtirol)	Hochmoor	4,0	0,98 mg/l bzw. 10,2 µM	30-40 & 40-70 cm	22.08.2008
Rasner Möser	46° 48' 27" N 12° 04' 25" O (Südtirol)	Niedermoor (Übergangsmoor)	4,3	0,87 mg/l bzw. 9,1 µM	20-40 & 40-60 cm	23.08.2008
Roßbrand I	47° 24' 27" N 13° 28' 27" O (Salzburg)	Niedermoor	4,1	1,76 mg/l bzw. 18,3 µM	0-20 & 20-40 cm	07.09.2008
Roßbrand II	47° 24' 39" N 13° 28' 56" O (Salzburg)	Niedermoor	4,9	5,52 mg/l bzw. 57,5 µM	0-20 & 20-40 cm	07.09.2008
Große Heide	48° 34' 06" N 14° 45' 26" O (Waldviertel)	Hochmoor	5,3	3,95 mg/l bzw. 41,1 µM	0-20 & 20-40 cm	05.10.2008
Schrems	48° 48' 17" N 15° 06' 04" O (Waldviertel)	Hochmoor	4,7	2,93 mg/l bzw. 30,5 µM	0-20 & 20-40 cm	05.10.2008
Schallhof	47° 53' 23" N 15° 56' 43" O (südliches NÖ)	Niedermoor	7,3	0,20 mg/l bzw. 2,1 µM	0-20 & 20-40 cm	19.10.2008
Berndorf	47° 56' 41" N 16° 06' 46" O (südliches NÖ)	Feuchtwiese	7,6	11,22 mg/l bzw. 116,8 µM	0-20 & 20-40 cm	19.10.2008
Schlöppnerbrunnen	50° 09' 21" N 11° 52' 22" O (Bayern)	Niedermoor	4,2 [b)]	2,5 µmol/g [b) c)]	0-5, 5-10, 10-15 & 15-20 cm	21.09.2004

[a)] Mittelwert der verschiedenen Probenahmestellen

[b)] (Loy 2004)

[c)] aus Bodenproben bestimmt

[d)] bestimmt mittels Dionex HPLC am Department für Chemische Ökologie und Ökosystemforschung (Universität Wien)

B.1.8. Extraktion genomischer DNS aus Bodenproben

Für die Extraktion genomischer DNS aus den Bodenproben wurde das MO BIO PowerSoil™ DNA Isolation Kit verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgt dabei mechanisch (in einem Bead Beater) und chemisch. Gleichzeitig werden Huminsäuren entfernt, die die nachfolgende Amplifikation der DNS inhibieren können. Es wurden jeweils rund 0,2 g der gefrorenen Bodenproben eingesetzt und gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt. Die extrahierte DNS wurde in jeweils 100 µl $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen und bei -20°C gelagert.

B.1.9. Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen

1,5 µl DNS-Lösung wurden auf den optischen Sensor eines Spektralphotometers aufgetragen, das die Extinktion bei 260 nm Wellenlänge misst und daraus die Konzentration der DNS berechnet. Als Kalibrierungsstandard wurde $H_2O_{bidest.}$ verwendet.
Aliquote der DNS-Extrakte wurden mit $H_2O_{bidest.}$ auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

B.1.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte (Saiki 1988). Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die in einem Thermocycler in 20 bis 40 Zyklen wiederholt werden. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNS-Doppelstränge, danach binden Oligonukleotid-Primer sequenzspezifisch an die 5'-Enden des Zielgens („Annealing") und eine thermostabile DNS-Polymerase synthetisiert die Komplementärstränge ausgehend vom 3'-Ende der Primer.

Tabelle B.7: Verwendete PCR-Reagentien

Reagentien	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA) (20 mg/ml)	New England BioLabs, Berverly, USA
dNTP-Mix (2 mM/dNTP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10x *Taq* Polymerase-Puffer	
$MgCl_2$ (25 mM)	
Taq DNA-Polymerase (5 u/µl)	

Die genauen Reaktionsansätze und -bedingungen sind in den jeweiligen Abschnitten angegeben. Alle benötigten Reagentien wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) vermengt und in einem Thermocycler der PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung auf -4°C gekühlt.

Tabelle B.8: Referenz-Plasmidlösungen [a)]

Name	Insertiertes Gen	Quelle [b)]	Länge des Inserts (bp)	Konzentration	GenBank-Accession Nr.
*dsr*SbI-88	*dsrAB*	n. k. MO, Schlöppnerbrunnen (OTU 9)	~ 1.800	30 ng/µl	AY167475
*dsr*SbII-25	*dsrAB*	n. k. MO, Schlöppnerbrunnen (OTU 3)	~ 1.800	30 ng/µl	AY167481
J1_32T	*dsrAB*	n. k. MO, arktisches Sediment	~ 1.800	30 ng/µl	nicht publiziert

[a)] Vektor TOPO® XL (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
[b)] n. k. MO = nicht kultivierter Mikroorganismus

In Tabelle B.8 angeführte Plasmide wurden als Positivkontrollen für die Amplifikation von *dsr*-Genabschnitten eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden PCR-Ansätze ohne Zugabe von DNS-Lösung verwendet.

Tabelle B.9: Primer für die Amplifikation von *dsrA* und *dsrAB*

Primer-Mix	Name	Sequenz (5'-3')	GC-Gehalt (%)	Varianten	Referenz [a]	Erfasste Sequenzen [b]
DSRARmix	DSRARa	ATR CAR TGC ATR CA	28-50	8	n. p.	1.450
	DSRARb	ATG CAA TGC ATG TA	36	1	n. p.	1
	DSRARc	ATG CAG TTC ATG CA	43	1	n. p.	13
	DSRARd	AGG CAA TGC ATG CA	50	1	n. p.	5
	DSRARe	AGA CAA TGC ATG CA	43	1	n. p.	2
	DSRARf	AGA CAG TGC ATG CA	50	1	n. p.	28
				13		**1.499** (84,3 %)
DSR4Rmix	DSR4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA	53	1	(Wagner 1998)	
	DSR4Ra	GTG TAA CAG TTT CCA CA	41	1	(Loy 2004)	
	DSR4Rb	GTG TAA CAG TTA CCG CA	47	1	(Loy 2004)	
	DSR4Rc	GTG TAG CAG TTK CCG CA	53-59	2	(Loy 2004)	
	DSR4Rd	GTG TAG CAG TTA CCA CA	47	1	(Zverlov 2005)	
	DSR4Re	GTG TAA CAG TTA CCA CA	41	1	(Zverlov 2005)	
	DSR4Rf	GTA TAG CAR TTG CCG CA	47-53	2	n. p.	
	DSR4Rg	GTG AAG CAG TTG CCG CA	59	1	n. p.	
				10		
DSR1Fmix	DSR1F	ACS CAC TGG AAG CAC G	63	2	(Wagner 1998)	
	DSR1Fa	ACC CAY TGG AAA CAC G	50-56	2	(Loy 2004)	
	DSR1Fb	GGC CAC TGG AAG CAC G	69	1	(Loy 2004)	
	DSR1Fc	ACC CAT TGG AAA CAT G	44	1	(Zverlov 2005)	
	DSR1Fd	ACT CAC TGG AAG CAC G	56	1	(Zverlov 2005)	
	DSR1Fe	GTT CAC TGG AAA CAC G	50	1	n. p.	
	DSR1Ff	AGC CAC TGG AAA CAC G	56	1	n. p.	
	DSR1Fg	GGC CAC TGG AAA CAT G	56	1	n. p.	
	DSR1Fh	GGC TAT TGG AAG CAC G	56	1	n. p.	
				11		

[a] n. p. = nicht publiziert
[b] Ermittelt via ARB (*dsrAB*-Datenbank mit 1.778 enthaltenen Sequenzen, die im Bereich der Primerbindungsstelle sequenziert sind)

B.1.11. Agarose-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung von PCR-Produkten wurden entsprechende Aliquote mit sechsfach konzentriertem Auftragspuffer vermischt und auf ein Gel aus 1-2 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer aufgetragen. Um eine Auftrennung der DNS-Fragmente nach ihrer Länge zu erreichen wurde eine elektrische Spannung angelegt; Voltzahl und Zeitangaben sind in den jeweiligen Abschnitten angeführt. Zusätzlich zu den Proben wurde mindestens ein Aliquot (5 µl) des Längenstandards KBL aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 45 min in eine Färbelösung aus 300 ml 1x TBE-Puffer und 30 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml in $H_2O_{bidest.}$) oder SYBR® Green I-Stammlösung (10.000x Konzentrat in DMSO) gelegt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

B.1.12. Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Sofern beabsichtigt wurde die DNS-Amplifikate direkt aus dem Gel zu isolieren, wurde 1x Modified TAE-Puffer anstelle des 1x TBE-Puffers für die Elektrophorese verwendet. Die betreffenden Banden wurden entweder mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten oder mit einer Glaskapillare ausgestochen. Um die PCR-Produkte in Lösung zu erhalten wurden die isolierten Gelstücke entweder mit $H_2O_{bidest.}$ auf 80°C erhitzt oder in einem Reaktionsgefäß mit Filtereinsatz aus dem Millipore DNA Gel Extraction Kit für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert.

B.1.13. DNS-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde die Kettenabbruch-Methode (Sanger 1977) angewendet: Die zu sequenzierende DNS wird in einer PCR amplifiziert, wobei das Reaktionsgemisch außer dNTPs auch di-deoxy-NTPs (ddNTPs) enthält. Ihnen fehlt die freie OH-Gruppe am 3'-Ende, ohne die die Polymerase kein neues Nukleotid mit dem DNS-Strang verbinden kann. Wird ein ddNTP anstelle eines dNTPs an ein DNS-Molekül angehängt, so bricht die Reaktion an dieser Stelle ab. Die vier Arten von ddNTPs (und somit auch die DNS-Moleküle, an die sie angehängt wurden) sind mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert. Durch eine Kapillare im Sequenziergerät (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Lincoln, USA) werden die PCR-Produkte unterschiedlicher Länge und Farbe elektrophoretisch aufgetrennt und die Reihenfolge der detektierten Farbsignale (ausgegeben in einem sogenannten Chromatogramm) entspricht direkt der DNS-Sequenz.
Für die PCR wurde jeweils der Vorwärts-Primer verwendet, mit dem die DNS-Abschnitte zuvor amplifiziert worden waren.

Alle erhaltenen Sequenzen wurden über das Programm ChromasPro mit den entsprechenden Chromatogrammen verglichen und gegebenenfalls manuell korrigiert.

B.1.14. Vergleichende Sequenzanalyse

B.1.14.1. Schnellanalyse von Sequenzen mittels BLAST

Die Sequenzen wurden im FASTA-Format in das BLAST-Programm (Altschul 1990) geladen, das sie mit verschiedenen Datenbanken abgleicht und verwandte Sequenzen in der Reihenfolge

ihrer Relevanz auflistet. Auf diese Weise ist es möglich erste Informationen über die Identität und Phylogenie der sequenzierten DNS zu erhalten.

B.1.14.2. Erstellung phylogenetischer Baumdiagramme mittels ARB

ARB (Ludwig 2004) ist ein Paket aus Programmen und Anwendungen, das die Verwaltung und Bearbeitung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen ermöglicht. Unter anderem können Verwandtschaftsanalysen durchgeführt und phylogenetische Baumdiagramme erstellt werden.

Die Sequenzen wurden in das ARB-Programm importiert, untereinander angeordnet und unter Einbeziehung bereits in der Datenbank vorhandener Sequenzen so ausgerichtet, dass identische Nukleotide untereinander zu stehen kamen. Dieser Vorgang („Alignment“) wurde vom Programm automatisch durchgeführt (Menüpunkt „Fast Aligner“), in den meisten Fällen war jedoch eine manuelle Korrektur nötig. Nachdem endständige Primer- und Plasmidsequenzen entfernt worden waren, wurden die Nukleotid- in Aminosäuresequenzen (im Ein-Buchstaben-Code) übersetzt und nach einer neuerlichen Überprüfung des Alignments in der Datenbank gespeichert.

Vergleichende Sequenzanalysen erfolgten, falls nicht anders angegeben, auf Basis der Aminosäuresequenzen und unter Verwendung des Filters „indel_SRP“, mit dem hochvariable Positionen (bedingt durch Insertionen oder Deletionen) von der Berechnung ausgenommen werden. Eine Gruppe nicht verwandter, aber homologer Sequenzen („Außengruppe“) wurde stets in die Kalkulationen einbezogen und manuell als Wurzel des Baumes definiert. Um die Richtigkeit der Berechnungen zu gewährleisten wurden zuerst nur Sequenzen mit einer Länge von mindestens 1.300 bp verwendet; kürzere Teilsequenzen wurden anschließend über die „Parsimony Interactive“-Funktion in die bereits bestehenden Baumdiagramme eingerechnet.

B.1.14.3. Aktualisierung der ARB-Datenbank

Vor der Durchführung phylogenetischer Berechnungen wurde die ARB-Datenbank aktualisiert, so dass sie alle bisher publizierten *dsrA*-, *dsrB*- und *dsrAB*-Sequenzen aus Bodenproben in Süßwasser-Feuchtgebieten enthielt, wie z.B. aus Moorböden (Chang 2001; Castro 2002; Loy 2004; Martinez 2007; Schmalenberger 2007), Süßwassersedimenten (Joulian 2001; Bahr 2005; Perez-Jimenez 2005; Leloup 2006; Miletto 2007) oder -biofilmen (Elshahed 2003; Vladar 2008). Klonsequenzen aus marinen Habitaten, nicht wassergesättigten Böden oder aus Proben der freien Wassersäule wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. GenBank-Einträge, die in der Daten-

bank noch nicht vorhanden waren, wurden von der Homepage des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) heruntergeladen, in das ARB-Programm importiert und einem Alignment unterzogen.

B.1.14.4. Baumberechnungsmethoden

Für die Berechnung phylogenetischer Baumdiagramme wurden drei verschiedene Verfahren angewendet (Fitch 1967; Saitou 1987; Felsenstein 1988; Felsenstein 1995; Ludwig 1998; Stamatakis 2002):

Maximum Likelihood (ML)

Das Prinzip dieser Methode ist eine heuristische Suche nach dem optimalen Baummodell, bei der von einem zufällig gewählten Baum ausgehend alle Topologien, die mit den vorhandenen Sequenzdaten möglich sind, durchprobiert werden (durch ständige Neuanordnung der Äste). Für jeden Evolutionsschritt, der in einem Modell nötig ist, wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, wobei alle Positionen einer Sequenz separat berücksichtigt werden. Die Baumtopologie mit der insgesamt größten Wahrscheinlichkeit („maximum likelihood“) wird schließlich als die beste angesehen.

Maximum Parsimony (MP) und „Bootstrapping“

Bei der Maximum Parsimony-Methode wird von einer unterschiedlichen Wahrscheinlichkeit von Konservierung und Mutation von Basen bzw. Nukleotiden ausgegangen. Demnach ist es wahrscheinlicher, dass eine Sequenz unverändert bleibt, als dass sie mutiert. Die Sequenzen werden Position für Position verglichen, wobei jedes Mal ein Baumdiagramm erstellt und die Anzahl der Substitutionen berechnet wird. Der optimale Baum ist schließlich der mit den wenigsten erforderlichen Substitutionsschritten und den geringsten Astlängen.

Beim sogenannten „Bootstrapping“ werden viele (in dieser Arbeit jeweils 100) einzelne Berechnungen mit Subproben der Sequenzen durchgeführt und anschließend für jede Verzweigung im Originalbaum ein Wert für ihre Signifikanz angegeben. „Bootstrap“-Werte sind somit ein Maß für die Reproduzierbarkeit einer bestimmten Baumtopologie.

Neighbour Joining (NJ) und Fitch

Im Gegensatz zu den ersten beiden Methoden werden beim NJ nicht die Sequenzen selbst zur Berechnung verwendet, sondern paarweise phylogenetische Distanzwerte. Die Sequenzen mit der geringsten Distanz werden zusammengefasst und im nächsten Schritt als eine einzige Sequenz betrachtet, zu der eine neue Sequenz hinzugefügt wird. Dann erfolgt eine Neuberechnung der Distanzmatrix und die nächste Sequenz wird hinzugefügt. Dieser Algorithmus wird fortgesetzt, bis der Baum komplett ist. NJ beruht auf dem Prinzip der minimalen Evolution, d.h. es wird bei jedem Additionsschritt diejenige Baumtopologie bevorzugt, bei der die Gesamtlänge der Äste am geringsten ist. Trotzdem ist nicht sichergestellt, dass das erhaltene Baumdiagramm tatsächlich das beste Modell (mit den minimalen Astlängen) ist, weil nicht mehrere Bäume erstellt werden (und der beste davon ausgesucht), sondern nur ein einziger. Während dessen Berechnung werden in jedem Schritt viele ebenfalls mögliche Baumtopologien verworfen, die eventuell ein besseres Endergebnis liefern würden. Ein großer Vorteil des NJ-Verfahrens ist jedenfalls die hohe Geschwindigkeit, mit der auch große Datenmengen verarbeitet werden können.
Fitch funktioniert analog zum Neighbour Joining, wobei Fitch für Aminosäuresequenzen verwendet wurde und NJ für Nukleotidsequenzen.

Da diese Berechnungsverfahren mehr oder weniger unterschiedliche Baumtopologien produzieren, wurde stets manuell ein sogenannter „Consensus-Baum“ (Ludwig 1998) erstellt, der die drei Modelle vereint. Als Zeichnungsgrundlage diente der jeweilige Fitch-Baum. Bootstrapping-Werte wurden aus dem MP-Baum übernommen und in Form von weißen (75-90 %) und schwarzen (>90 %) Punkten dargestellt.

B.2. Erstellung von *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken

B.2.1. PCR zur Amplifikation von *dsrA* und *dsrAB*

Zur Erstellung der beiden Genbanken wurde die extrahierte genomische DNS (5 ng/µl) aus den sechs Subproben des Moores Rasner Möser verwendet. Die DNS-Lösungen wurden zu gleichen Teilen gepoolt, mit $H_2O_{bidest.}$ auf eine Konzentration von 2,5 ng/µl verdünnt und in den folgenden PCRs eingesetzt.

Tabelle B.10: PCR zur Amplifikation von *dsrA*

PCR-Reagentien	Menge	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
dNTP-Mix	5 µl				
Taq-Puffer	5 µl				
$MgCl_2$	4 µl				
DSR1Fmix (50 pmol/µl)	0,5 µl				
DSR4ARmix (50 pmol/µl)	0,5 µl	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Taq-Polymerase	0,5 µl	Denaturierung	95°C	3 min	1
BSA	0,5 µl	Denaturierung	95°C	30 sec	30
$H_2O_{bidest.}$	30 µl	Primer-Annealing	48°C	30 sec	
DNS-Lösung	4 µl	Elongation	72°C	40 sec	
insgesamt	50 µl	Finale Elongation	72°C	3 min	1

Tabelle B.11: PCR zur Amplifikation von *dsrAB*

PCR-Reagentien	Menge	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
dNTP-Mix	5 µl				
Taq-Puffer	5 µl				
$MgCl_2$	4 µl				
DSR1Fmix (50 pmol/µl)	0,5 µl				
DSR4Rmix (50 pmol/µl)	0,5 µl	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Taq-Polymerase [a)]	0,5 µl	Denaturierung	95°C	3 min	1
BSA	0,5 µl	Denaturierung	95°C	30 sec	25
$H_2O_{bidest.}$	30 µl	Primer-Annealing	[b)]	30 sec	
DNS-Lösung	4 µl	Elongation	72°C	90 sec	
insgesamt	50 µl	Finale Elongation	72°C	3 min	1

[a)] Zugabe der Polymerase zum Reaktionsgemisch erst bei 95°C

[b)] Absenkung der Temperatur von 58°C auf 48°C in den ersten 10 Zyklen (1°C pro Zyklus), danach 15 Zyklen bei 48°C

Für jedes der beiden Gene wurden drei identische PCRs durchgeführt und die Produkte danach vereinigt. Als Positivkontrolle wurde eine 1:1-Mischung der Plasmide *dsr*SbI-88 und *dsr*SbII-25 (s. Tabelle B.8) in derselben Menge wie die DNS-Lösungen eingesetzt.

B.2.2. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung der PCR-Produkte

Jeweils 20 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl 50 % Glycerol vermengt und mittels Elektrophorese (100 V für 90 min) in einem Gel aus 1,5 % (w/v) Agarose in 1x Modified TAE-Puffer aufgetrennt. Mit Glaskapillaren wurden die Bereiche des Gels, die die gewünschten Banden enthielten, ausgestochen und in ein ERG mit 50 µl $H_2O_{bidest.}$ überführt. Die Mischung wurde für 10 min auf 80°C erhitzt um die Agarose zu verflüssigen.

B.2.3. Klonierung der PCR-Produkte mit dem TOPO® XL PCR Cloning Kit

Ein Ligationsansatz aus 1,5 µl pCR®-XL-TOPO®-Vektor und 8 µl PCR-Produkt wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 µl 6x TOPO® Cloning Stop Solution wurden die gesamten 11 µl vorsichtig mit einem Aliquot chemisch kompetenter One Shot® TOP10 *E. coli*-Zellen vermischt. Dieser Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 30 sec auf 42°C erwärmt und für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl S.O.C.-Medium zugegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37°C in einem Rundschüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf Kanamycin-hältigen (100 µg/ml) LB-Platten ausplattiert (pro Ansatz einmal 100 µl und einmal 150 µl der Kultur) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle B.12: Transformationskompetente Zellen für die Klonierung

Art	Stamm	Art der Transformation	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli	TOP10	chemisch	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

B.2.4. Selektion rekombinanter Klone

Auf dem pCR®-XL-TOPO®-Vektor befinden sich ein Kanamycin-Resistenzgen und das Gen *ccdB* um eine direkte Selektion rekombinanter *E. coli*-Kolonien zu ermöglichen. Das für *E. coli* lethale *ccdB*-Gen enthält die Restriktionsschnittstelle des Vektors und wird disruptiert, wenn es zu einer Insertion von Fremd-DNS kommt. Auf LB-Kanamycin-Medium sterben somit alle Zellen, die kein Plasmid (und folglich auch kein Kanamycin-Resistenzgen) oder ein nicht rekombinantes Plasmid mit einem intakten *ccdB*-Gen aufgenommen haben.

Die richtige Länge der Inserts wurde mittels PCR (s. Tabelle B.13) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde jeweils mit einem Zahnstocher eine Kolonie von einer

LB-Kanamycin-Platte gepickt und in das vorbereitete PCR-Reaktionsgemisch getaucht. Die gepickten Kolonien wurden auf neue LB-Kanamycin-Platten (Masterplatten) übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Jeweils 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl 6x Auftragspuffer vermengt und mittels Elektrophorese (135 V für 45 min) in einem Gel aus 1 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer aufgetrennt.

Tabelle B.13: PCR zur Amplifikation der Plasmid-Inserts

PCR-Reagentien	Menge
dNTP-Mix	2,5 µl
Taq-Puffer	2,5 µl
$MgCl_2$	2 µl
M13F [a)]	0,25 µl
M13R [a)]	0,25 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl
BSA	-
$H_2O_{bidest.}$	17,35 µl
DNS-Lösung	-
insgesamt	25 µl

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	7 min	1
Denaturierung	95°C	40 sec	30
Primer-Annealing	60°C	40 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Finale Elongation	72°C	3 min	1

[a)] im TOPO® XL PCR Cloning Kit enthaltene Primer zur Amplifikation des Inserts (flankiert von je ca. 100 bp der Vektorsequenz)

B.2.5. Anzucht und Stammhaltung transformierter *E. coli*-Zellen

Zellen mit einem Vektor-Insert der richtigen Länge wurden von den Masterplatten gepickt, in jeweils 5 ml Kanamycin-hältiges (50 µg/ml) LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C in einem Rundschüttler inkubiert. Für die langfristige Stammhaltung wurden am folgenden Tag jeweils 700 µl der Flüssigkulturen mit 300 µl 50 % Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

B.2.6. Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen (Miniprep)

P1-Puffer

Tris-HCl (pH 8)	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

NaOH/SDS-Lösung

$H_2O_{bidest.}$	8 ml
NaOH (2 N)	1 ml
10 % SDS	1 ml

Kaliumacetat/Acetat

Kaliumacetat (5 M)	6 ml
$H_2O_{bidest.}$	2,85 ml
Eisessig	1,15 ml

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur für 1 min und mit 13.000 rpm.
In einem ERG wurden nacheinander zweimal 2 ml der jeweiligen Flüssigkultur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl P1-Puffer gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellen zu lysieren wurden 200 µl NaOH/SDS-Lösung zugegeben und die Suspension für 5 min auf Eis gestellt. Zum Fällen der Proteine (gemeinsam mit der genomischen *E. coli*-DNS) erfolgte anschließend die Zugabe von 150 µl Kaliumacetat/Acetat und die Lösung wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden 450 µl des Überstandes in ein neues ERG überführt und mit 450 µl Isopropanol vermengt. Die darauf folgende Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur diente zum Fällen der Plasmid-DNS. Die Suspension wurde zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen.
Die Sequenzierung der Plasmid-DNS erfolgte mit der in Kapitel B.1.13. beschriebenen Methode und dem Primer DSR1Fmix.

B.2.7. Statistische Auswertung

B.2.7.1. Gruppierung in Operational Taxonomic Units (OTUs)

Für statistische und phylogenetische Analysen wurden die aus der Genbank erhaltenen Sequenzen in Operational Taxonomic Units (OTUs) gruppiert. Die Einteilung erfolgte aufgrund ihrer Proteinsequenzidentität, welche mit dem ARB-Programm berechnet wurde. Eine Zugehörigkeit zu derselben OTU wurde durch einen Identitätswert von mindestens 90 % definiert.

B.2.7.2. Berechnung des Erfassungsgrades einer Genbank

Der Erfassungsgrad („Coverage“) gibt an, wie repräsentativ die Stichproben einer Genbank für die Diversität in der ursprünglichen Probe sind, d.h. in welchem Ausmaß die Gesamtvielfalt durch die untersuchten Sequenzen abgedeckt wird. Für die Berechnung wurde folgende Formel (Good 1953) verwendet:

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

N: Anzahl aller Sequenzen
n1: Anzahl der OTUs, die nur eine Sequenz beinhalten

B.3. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) ist eine Methode zur Auftrennung von DNS-Fragmenten, die zwar die gleiche Länge haben, sich aber in ihrer Sequenz und somit in ihrem GC-Gehalt unterscheiden (Muyzer 1993). An einer GC-Basenpaarung sind drei Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt, an einer AT-Basenpaarung nur zwei. Deshalb trennen sich DNS-Doppelstränge mit einem niedrigen GC-Gehalt in einem denaturierenden Gradienten früher als solche mit einem hohen GC-Gehalt.
Bei der DGGE werden PCR-Produkte in einem vertikalen Polyacrylamid-Gel mit einem von oben nach unten zunehmenden denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Sie werden dazu mit einer sogenannten GC-Clamp versehen, einer 40 nt langen Sequenz, die fast ausschließlich G- und C-Nukleotide enthält. Sie bildet eine feste Verbindung zwischen den aufgehenden Doppelsträngen und verleiht ihnen eine Struktur, die wie ein Fallschirm wirkt und die Bewegung durch das Gel stoppt.

In dieser Arbeit wurde ein Gel aus 8 % (w/v) Polyacrylamid (PAA) mit einem denaturierenden Gradienten von 30 bis 80 % (100 % entsprechen 7 M Harnstoff und 40 % (v/v) Formamid) verwendet.

B.3.1. PCR zur Amplifikation von *dsrAB*

Die genomische DNS aus den jeweils sechs Subproben der neun untersuchten Moorgebiete wurde in einer Konzentration von 5 ng/µl in eine PCR gemäß Tabelle B.14 eingesetzt. Mit jeder Probe wurden dabei zwei identische Reaktionen durchgeführt, deren Produkte anschließend vereinigt wurden.

Tabelle B.14: PCR zur Amplifikation von *dsrAB*

PCR-Reagentien	Menge
dNTP-Mix	5 µl
Taq-Puffer	5 µl
$MgCl_2$	4 µl
DSR1Fmix (50 pmol/µl)	0,5 µl
DSR4Rmix (50 pmol/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase [a)]	0,5 µl
BSA	0,5 µl
$H_2O_{bidest.}$	30 µl
DNS-Lösung	4 µl
insgesamt	50 µl

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	25
Primer-Annealing	[b)]	30 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Finale Elongation	72°C	3 min	1

[a)] Zugabe der Polymerase zum Reaktionsgemisch erst bei 95°C

[b)] Absenkung der Temperatur von 58°C auf 48°C in den ersten 10 Zyklen (1°C pro Zyklus), danach 15 Zyklen bei 48°C

B.3.2. Aufreinigung der *dsrAB*-PCR-Produkte

15 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl 6x Auftragspuffer vermischt und auf einem Gel aus 1 % (w/v) Agarose in 1x Modified TAE-Puffer elektrophoretisch (120 V für 60 min) aufgetrennt. Mit einem Skalpell wurden die Bereiche des Gels ausgeschnitten, die die gewünschten Banden enthielten, und in ein Reaktionsgefäß aus dem Millipore DNA Gel Extraction Kit transferiert. Nach einer Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 min lagen die PCR-Produkte in ca. 50 µl 1x Modified TAE-Puffer vor. Dieser Isolationsschritt wurde durchgeführt um aufgereinigte *dsrAB*-Amplifikate ohne unerwünschte Nebenprodukte der PCR zu erhalten.

B.3.3. PCR zum Anbringen der GC-Clamp

Die für die DGGE benötigte GC-Clamp wird über spezielle Vorwärtsprimer (s. Tabelle B.15), die an ihrem 5'-Ende die GC-Sequenz tragen, an die PCR-Produkte angebracht. In Kombination mit dem Rückwartsprimer DSR4Rmix wird ein Teil des *dsrB*-Gens amplifiziert, der zusammen mit der GC-Clamp rund 300 bp lang ist.

Tabelle B.15: Primer für die Amplifikation von *dsrB* und das Anbringen der GC-Clamp (nicht publiziert)

Primer-Mix	Name	Sequenz (5'-3') [a]	Varianten	ΔG [b]	erfasste Sequenzen [c]
DSRp1728FmixA	DSRp1728Fa	CAY ACC CAG GGY TGG	4	-16,72 ± 1,02	1.100
	DSRp1728Fb	CAY ACC CAG GGR TGG	4	-16,49 ± 1,03	
DSRp1728FmixB	DSRp1728Fe	CAC ACD CAG GGY TGG	6	-16,97 ± 1,03	187
	DSRp1728Ff	CAC ACD CAG GGR TGG	6	-16,71 ± 1,15	
DSRp1728FmixC	DSRp1728FcI	CAC ACB CAA GGD TGG	9	-15,95 ± 1,11	98
	DSRp1728FcII	CAY ACB CAA GGC TGG	6	-16,20 ± 1,24	
DSRp1728FmixD	DSRp1728Fd	CAT ACD CAG GGH TGG	9	-15,31 ± 1,02	72
DSRp1728FmixE	DSRp1728Fg	CAT ACC CAG GGN TAY	8	-14,59 ± 0,66	87
	DSRp1728Fh	CAT ACW CAG GGH TAT	6	-12,78 ± 0,51	17
					1.561 (95,1 %)

[a] Die Primer tragen am 5'-Ende die Sequenz 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'.

[b] Mittelwert aus allen Varianten

[c] Ermittelt via ARB (*dsrAB*-Datenbank mit 1.641 enthaltenen Sequenzen, die im Bereich der Primerbindungsstelle sequenziert sind)

Mit jeder Probe wurden vier PCRs (jeweils eine für DSRp1728FmixA, -B, -C und -D) durchgeführt, deren Produkte anschließend vereinigt wurden.

Tabelle B.16: PCR für die Amplifikation von *dsrB* und das Anbringen der GC-Clamp

PCR-Reagentien	Menge
dNTP-Mix	10 µl
Taq-Puffer	10 µl
$MgCl_2$	8 µl
DSRp1728FmixA/B/C/D (50 pmol/µl)	1 µl
DSR4Rmix (50 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase	1 µl
BSA	0,5 µl
$H_2O_{bidest.}$	66,5 µl
DNS-Lösung	2 µl
insgesamt	100 µl

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	20
Primer-Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Finale Elongation	72°C	3 min	1

Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Proben aus den beiden verschiedenen Entnahmetiefen eines Standortes gepoolt, so dass von jedem untersuchten Moorgebiet drei Subproben (Entnahmestelle A, B und C) vorlagen. Je 15 µl dieser DNS-Lösungen wurden mit 5 µl 6x Auftragspuffer vermengt und mittels Elektrophorese (130 V für 40 min) über ein 1 % (w/v)-Agarosegel qualitativ überprüft.
Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

B.3.4. Standard für die Vergleichbarkeit verschiedener DGGE-Gele

Mit den drei Referenz-Plasmidlösungen *dsr*SbI-88, *dsr*SbII-25 und J1_32T (s. Tabelle B.8) wurden PCRs gemäß Tabelle B.16 (jeweils mit DSRp1728FmixA, -C und -D) durchgeführt und alle *dsrB*-Produkte vereinigt. Diese Mischung wurde auf jedem DGGE-Gel in die äußersten Proben-

taschen aufgetragen um einen Standard für die vertikale Position der Banden zu haben und dadurch den Vergleich verschiedener Gele zu erleichtern.

B.3.5. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

8 % (w/v) PAA mit 0 % Denaturans

50x TAE-Puffer	5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	50 ml
$H_2O_{bidest.}$	ad 250 ml

8 % (w/v) PAA mit 80 % Denaturans

50x TAE-Puffer	5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	50 ml
Formamid	80 ml
Urea	84 g
$H_2O_{bidest.}$	ad 250 ml

8 % (w/v) PAA mit 30 % Denaturans

0 % PAA-Lösung	6,5 ml
80 % PAA-Lösung	4,5 ml

10 % Ammoniumperoxydisulfat (APS)

APS	0,2 g
$H_2O_{bidest.}$	ad 2 ml

Zwei Glasplatten wurden mit 1 mm Abstand vertikal in einem Ständer fixiert und am unteren Ende mit Parafilm abgedichtet. 2 ml der 80 %-Lösung wurden mit 25 µl 10 % APS und 8 µl TEMED versetzt, um die Polymerisation des Gels zu starten, und zwischen die Glasplatten pipettiert. 11 ml der 30 %-Lösung und 11 ml der 80 %-Lösung wurden nach Zugabe von jeweils 30 µl 10 % APS und 8 µl TEMED über einen Gradientenmischer in die Apparatur gefüllt und abschließend mit 2 ml der 0 %-Lösung (mit 10 µl 10 % APS und 3 µl TEMED versetzt) über-

schichtet. Ein Plastikkamm wurde von oben ca. 3 cm weit in das Gel gesteckt um Auftragetaschen für die Proben zu produzieren.

B.3.6. Elektrophorese

Das auspolymerisierte Gel wurde gemeinsam mit den Glasplatten in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte DGGE-Apparatur eingesetzt. Nach dem Herausziehen des Kammes wurden die Auftragetaschen mit Puffer gespült um eventuell vorhandene Gelstückchen zu entfernen. Die Apparatur wurde auf einem Magnetrührer platziert, an die Stromversorgung angeschlossen und auf 60°C aufgeheizt. Für 30 min wurde eine Spannung von 150 V angelegt, d.h. ein sogenannter „Vorlauf" durchgeführt.
Jeweils 400 µl der vorbereiteten Proben – ausgenommen Proben aus den Moorgebieten Schallhof (200 µl) und Schrems (500 µl) – wurden in einer Vakuumzentrifuge bei 42°C auf ein Volumen von ca. 60 µl konzentriert, mit 10 µl 6x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des PAA-Gels pipettiert. Zusätzlich wurden zwei Aliquote der Reinkulturen-Standards (je 10 µl mit 10 µl 6x Auftragspuffer) aufgetragen.
Während der Elektrophorese für 5 h bei einer Spannung von 150 V wurde die Temperatur des Puffers konstant auf 60°C gehalten. Anschließend wurde das Gel aus der Apparatur ausgebaut, für 60 min in ein SYBR® Green I-Färbebad gelegt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

B.3.7. Statistische Auswertung der DGGE-Gele mittels Primer 5.0

Anhand der Fotos der DGGE-Gele wurde eine sogenannte Presence-Absence-Matrix erstellt, in der festgehalten wurde, welche Banden in welchen Proben vorhanden waren. Banden, die nur auf dem Gel selbst, nicht aber auf den Fotos zu erkennen waren und solche, die nicht klar voneinander abgegrenzt waren, wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Basierend auf dieser Matrix wurde mit dem Statistikprogramm Primer 5.0 eine Bray-Curtis-Ähnlichkeitsmatrix (Bray 1957) berechnet. Die zugrunde liegende mathematische Formel lautet wie folgt:

$$S_{jk} = \frac{100 * 2a}{(2a + b + c)}$$

S_{jk}: Ähnlichkeitskoeffizient der Proben J und K

a: Anzahl der Banden, die in beiden Proben vorhanden sind

b: Anzahl der Banden, die in Probe J, nicht aber in Probe K vorhanden sind

c: Anzahl der Banden, die in Probe K, nicht aber in Probe J vorhanden sind

Aufgrund dieser Berechnungen wurden die untersuchten Proben nach der Ähnlichkeit ihrer Bandenmuster gruppiert und und auf zwei verschiedene Arten grafisch dargestellt: zum einen in einem Baumdiagramm (Menüpunkt „Cluster“) und zum anderen über die Methode des „Non-metric Multidimensional Scaling“ (MDS) in einer zweidimensionalen Variante der Ähnlichkeitsmatrix.

B.3.8. Isolierung und Reamplifikation der *dsrB*-Genfragmente aus den DGGE-Gelen

DGGE-Banden wurden einzeln mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein ERG mit 40 µl $H_2O_{bidest.}$ überführt. Sie wurden über Nacht bei 4°C gelagert um die DNS-Amplifikate aus dem Gel in das $H_2O_{bidest.}$ diffundieren zu lassen. Am folgenden Tag wurde 1 µl dieser DNS-Lösung für eine PCR (s. Tabelle B.17) verwendet.

Um zu überprüfen, ob die Reamplifikation erfolgreich war, wurden je 5 µl der PCR-Produkte mit 5 µl 6x Auftragspuffer auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt (120 V für 45 min). Das Gel wurde in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

Tabelle B.17: PCR zur Reamplifikation von *dsrB*

PCR-Reagentien	Menge
dNTP-Mix	5 µl
Taq-Puffer	5 µl
$MgCl_2$	4 µl
DSRp1728Fa-noGC [a)] (50 pmol/µl)	0,5 µl
DSR4Rmix (50 pmol/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
BSA	0,25 µl
$H_2O_{bidest.}$	33,5 µl
DNS-Lösung	1 µl
insgesamt	50 µl

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	30
Primer-Annealing	48°C	30 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Finale Elongation	72°C	3 min	1

[a)] entspricht dem Primer DSRp1728Fa, trägt aber keine GC-Clamp

B.3.9. Aufreinigung und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente

Die Aufreinigung der restlichen 45 µl der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit, bei dem die DNS in einem Puffer mit hohem Salzgehalt an eine Silica-Membran gebunden, gewaschen und in 30 µl $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen wird. Ethidiumbromid, Primer, dNTPs, Polymerasen und andere Stoffe, die nachfolgende Reaktionen beeinflussen können, werden auf diese Weise entfernt.

Zur Sequenzierung der gereinigten DNS-Amplifikate wurde die in Kapitel B.1.13. beschriebene Methode angewendet.

C. ERGEBNISSE

C.1. Extraktion genomischer DNS aus Bodenproben

Unter Verwendung des MO BIO PowerSoil™ DNA Isolation Kits wurde die genomische DNS aus den in Tabelle F.2 angeführten Bodenproben extrahiert, das Moorgebiet Schlöppnerbrunnen ausgenommen: Davon lag bereits extrahierte genomische DNS vor, die für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde.
Laut spektralphotometrischer Vermessung war in einem der Extrakte (Probe aus dem Moorgebiet Berndorf, Entnahmestelle B, Entnahmetiefe 0-20 cm) keine DNS vorhanden, in einem zweiten Extraktionsversuch konnte aber auch aus dieser Probe genomische DNS isoliert werden. Eine Tabelle mit den genauen Konzentrationsangaben der DNS-Lösungen befindet sich im Anhang (Tabelle F.2).

C.2. *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken

Um die Spezifität der beiden Rückwärtsprimer DSR4Rmix und DSRARmix hinsichtlich der mit ihnen amplifizierbaren DNS-Abschnitte zu vergleichen, wurden zwei Genbanken erstellt. Mittels PCR wurden aus den vereinigten DNS-Extrakten der sechs Subproben des Moores Rasner Möser die *dsrA*- bzw. *dsrAB*-Genabschnitte amplifiziert. Dafür wurden die Primerpaare DSR1F-mix-DSR4Rmix (für *dsrAB*) und DSR1Fmix-DSRARmix (für *dsrA*) verwendet. Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation der beiden Gene wurden in mehreren Testreaktionen optimiert.

Bei der Amplifikation von *dsrAB* lieferten PCR-Ansätze mit einer konstanten Annealingtemperatur von 48°C keine zufriedenstellenden Ergebnisse, d.h. viele unspezifische und sehr schwache spezifische Banden. Um eine höhere Produktspezifität zu erreichen wurde die sogenannte „Touch Down"-Methode angewendet, bei der die Annealingtemperatur in den ersten zehn Zyklen um 1°C pro Zyklus verringert wurde (von 58°C auf 48°C). Die Effizienz der PCR konnte zudem dadurch erhöht werden, dass die Polymerase erst bei einer Temperatur von 95°C zum Reaktionsgemisch zugegeben wurde („Hot Start"). Für die Amplifikation von *dsrA* waren weder Hot Start noch Touch Down nötig, allerdings wurde auch hier die Bildung unspezifischer PCR-Produkte beobachtet.
Wurden von BSA oder Polymerase weniger als 0,5 µl pro 50 µl-Ansatz zugegeben, so hatte das negative Auswirkungen auf die Effizienz der Amplifikation, sowohl hinsichtlich der Menge als

auch der Spezifität der erhaltenen Produkte. Die Gesamtzyklenzahl wurde so niedrig wie möglich gehalten (30 Zyklen für *dsrA* und 25 für *dsrAB*) um den PCR-Bias (Polz 1998) zu minimieren.

Mit beiden Primerpaaren wurden schließlich PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten (*dsrA* ca. 750 bp und *dsrAB* ca. 1.900 bp) und aus dem Agarosegel isoliert (Abb. C.1).

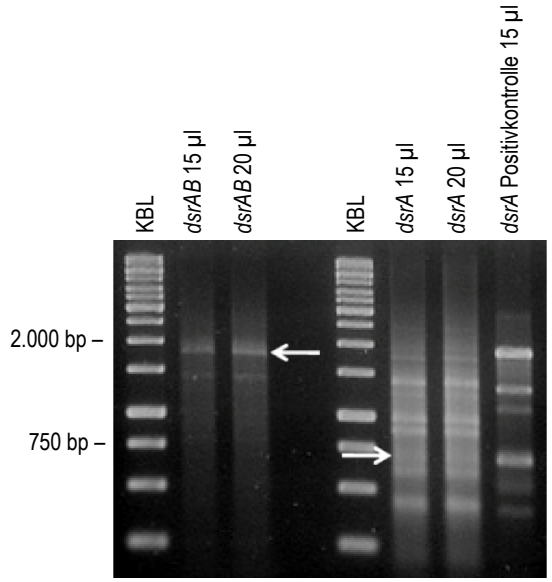


Abb. C.1: *dsrA*- und *dsrAB*-PCR-Produkte. Pfeile markieren die Banden, die aus dem Gel isoliert wurden. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung der Plasmide *dsr*SbI-88 und *dsr*SbII-25 im Verhältnis 1:1 verwendet.

Zur Erstellung einer *dsrA*- und einer *dsrAB*-Genbank wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des TOPO® XL PCR Cloning Kits in Vektorplasmide ligiert und für die chemische Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet. Die Transformationseffizienz war in beiden Fällen zufriedenstellend. Pro Genbank wurden 90 Klone mittels PCR auf die richtige Länge des Plasmid-Inserts überprüft. Aus 11 *dsrA*-Klonen und insgesamt 59 *dsrAB*-Klonen wurde anschließend die Plasmid-DNS isoliert und unter Verwendung des Primers DSR1Fmix sequenziert. Ein Abgleich der Sequenzen mit den Datenbanken des BLAST-Programmes (Menüpunkt BLASTx) ergab für *dsrAB* 39 *dsr*-spezifische Treffer, jedoch keinen einzigen für *dsrA*.

Drei der 39 *dsrAB*-Klone ergaben bei der Sequenzierung so ungenaue Chromatogramme, dass ein Korrekturlesen nicht möglich war. Sie wurden deshalb bei weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Die übrigen 36 Klone wurden aufgrund ihrer Proteinsequenzidentität in 12 OTUs gruppiert, wobei die Zugehörigkeit zu derselben OTU durch einen Identitätswert von mindestens 90 % definiert wurde. OTU 1 umfasste 20 Sequenzen, OTU 9 bestand aus 4 Sequenzen, OTU 2 und

OTU 10 aus jeweils 2 Sequenzen und die restlichen 8 OTUs enthielten jeweils nur eine Sequenz. Aufgrund dieser Einteilung ergab sich ein Erfassungsgrad von 77,8 % für die *dsrAB*-Genbank.

Tabelle C.1: Gruppierung der *dsrAB*-Genbank-Sequenzen in OTUs [a)]

OTU	Enthaltene Sequenzen [b)]				
1	RMab_11	RMab_28	RMab_50	RMab_68	RMab_78
	RMab_12	RMab_31	RMab_51	RMab_70	RMab_79
	RMab_17	RMab_38	RMab_62	RMab_75	RMab_84
	RMab_19	RMab_43	RMab_64	RMab_76	RMab_88
2	RMab_5	**RMab_25**			
3	**RMab_9**				
4	**RMab_22**				
5	**RMab_23**				
6	**RMab_26**				
7	**RMab_27**				
8	**RMab_29**				
9	RMab_32	RMab_55	RMab_69	**RMab_72**	
10	RMab_41	**RMab_71**			
11	**RMab_47**				
12	**RMab_58**				

[a)] AS-Identität ≥ 90 %

[b)] Fettgedruckte Klonsequenzen wurden für die Generierung von Vollsequenzen verwendet.

Aus jeder der 12 OTUs wurde die Plasmid-DNS eines Klons zusätzlich mit dem Primer DSR4R-mix rückwärts sequenziert um jeweils eine *dsrAB*-Vollsequenz pro OTU generieren zu können. Diese Vollsequenzen wurden für die Erstellung phylogenetischer Baumdiagramme mit dem Programm ARB verwendet.

Um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den OTUs der Rasner Möser-Genbank und bereits bekannten OTUs aus dem Moorgebiet Schlöppnerbrunnen (Loy 2004) zu untersuchen, wurden die entsprechenden *dsrAB*-Sequenzen einer vergleichenden Sequenzanalyse auf Aminosäurenbasis mit Verwendung des Filters „indel_SRP“ unterzogen (Abb. C.2). In die Berechnung wurden zum einen die Sequenzen der nächsten Verwandten der Rasner Möser-OTUs (insgesamt sieben; nach Abgleich der Nukleotidsequenzen mit der BLAST-Datenbank; s. Tab. F.3 im Anhang) und zum anderen die *dsrAB*-Vollsequenzen von Vertretern wichtiger SRM-Gruppen (*Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes*, *Euryarchaeota*) einbezogen, die entweder aus Reinkulturen oder nicht kultivierten Mikroorganismen aus Umweltproben stammten und eine Länge von mindestens 1.600 bp hatten. Die Außengruppe bildeten *rdsrAB*-Sequenzen der sulfidoxidierenden Mikroorganismen *Magnetospirillum magnetotacticum*, *M. magneticum* (*Alphaproteobacteria*), *Thiobacillus denitrificans* (*Betaproteobacteria*), *Alkalilimnicola ehrlichei* und *Halorhodospira halophila* (*Gammaproteobacteria*).

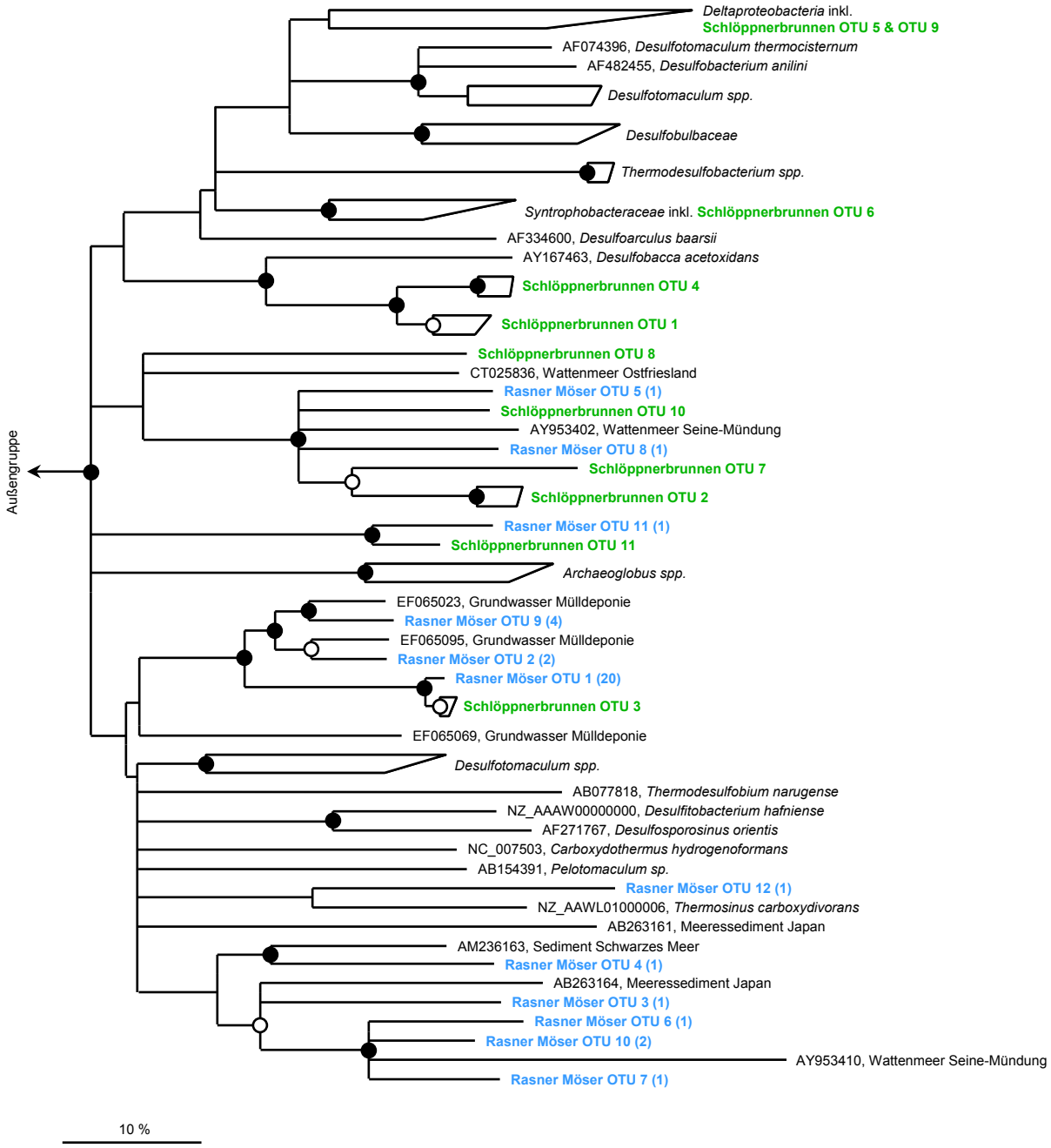


Abb. C.2: Consensus-Baum zur Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den Rasner Möser-OTUs (blau) und bereits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs (grün). Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Bei Klonen nicht kultivierter MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Zahlen in Klammern geben an, wie viele Sequenzen in einer OTU enthalten sind.

Die Hälfte der Rasner Möser-OTUs zeigte eine Verwandtschaft zu mindestens einer der 11 bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs. Die Rasner Möser-OTUs 5 und 8 bildeten eine monophyletische Gruppe mit den OTUs 10, 7, 2 und 8 aus dem Schlöppnerbrunnen (letztere mit etwas größerer phylogenetischer Distanz), konnten aber keinem Phylum zugeteilt werden, da klassifizierte Referenzorganismen in dieser Gruppe nicht vertreten waren. Ein weiteres alleinstehendes Cluster, das durch einen Bootstrappingwert von 100 % und einer minimalen Proteinsequenz-

identität von 87,5 % bestätigt wurde, bestand aus den jeweiligen OTUs 11 der beiden Moorgebiete.

Die Rasner Möser-OTUs 9, 2 und 1, die gemeinsam 26 der insgesamt 36 Klonsequenzen enthielten, bildeten eine monophyletische Gruppe (Bootstrappingwert 100 %) mit der Schlöppnerbrunnen-OTU 3, wobei eine davon, OTU 1, mit einer Proteinsequenzidentität von mindestens 89 % eine besonders enge Verwandtschaft mit der Schlöppnerbrunnen-OTU aufwies: 19 der 20 Sequenzen der Rasner Möser-OTU 1 zeigten sogar Identitätswerte von mindestens 90 % (und maximal 97 %) mit der Schlöppnerbrunnen-OTU 3, womit sie *per definitionem* ein- und derselben OTU angehören. Von allen im Baum vertretenen Phyla erwiesen sich die *Firmicutes* als nächste Verwandte dieser Gruppe.

Die Rasner Möser-OTUs 3, 4, 6, 7, 10 und 12, die insgesamt sieben der 36 Genbank-Klone enthielten, fielen in ein monophyletisches Cluster mit SRM aus dem Phylum *Firmicutes*. Allerdings wies diese Gruppierung aufgrund des niedrigen Bootstrap-Wertes (27 %) und der geringen Länge des sie definierenden Astes nur eine geringe Signifikanz auf. Fünf dieser OTUs (OTU 3, 4, 6, 7 und 10) bildeten ein eigenes Subcluster ohne Sequenzen kultivierter Mikroorganismen. Unter ihnen zeigte sich noch eine weitere Gruppierung (OTUs 6, 10 und 7), die durch einen Bootstrappingwert von 100 % bestätigt wurde. Die Rasner Möser-OTU 12 nahm eine isolierte Stelle mit *Thermosinus carboxydivorans* als nächstem Verwandten ein (Aminosäurenidentität rund 73 %).

Vertreter der *Archaea* und *Thermodesulfobacteria* wurden nicht unter den Klonen der Rasner Möser-Genbank gefunden und bildeten jeweils eine eigene Gruppe im Baum. Die Genbanksequenzen zeigten auch keine nähere phylogenetische Verwandtschaft mit *Proteobacteria* oder *Nitrospirae,* wobei letztere nicht in Abb. C.2, aber in Abb. C.11 (als Außengruppe) dargestellt sind.

C.3. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Um die Diversität und Phylogenie sulfatreduzierender Mikroorganismen in neun verschiedenen Moorgebieten zu untersuchen wurde eine DGGE mit *dsrB*-Genfragmenten durchgeführt. Die extrahierte genomische DNS aller in Tabelle F.2 angeführten Proben wurde mit $H_2O_{bidest.}$ auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, und für zwei aufeinander folgende PCR-Schritte zur Amplifikation von *dsrB* verwendet.

C.3.1. Amplifikation der *dsrB*-Genfragmente

In einem sogenannten „Nested PCR"-Verfahren wurden die *dsrB*-Genabschnitte nicht direkt aus der genomischen DNS amplifiziert, sondern über den Zwischenschritt der *dsrAB*-PCR. Dieser

sollte die Koamplifikation von Nicht-Zielgenen durch unspezifische Primerbindung minimieren und die Ausbeute an spezifischen Produkten erhöhen.

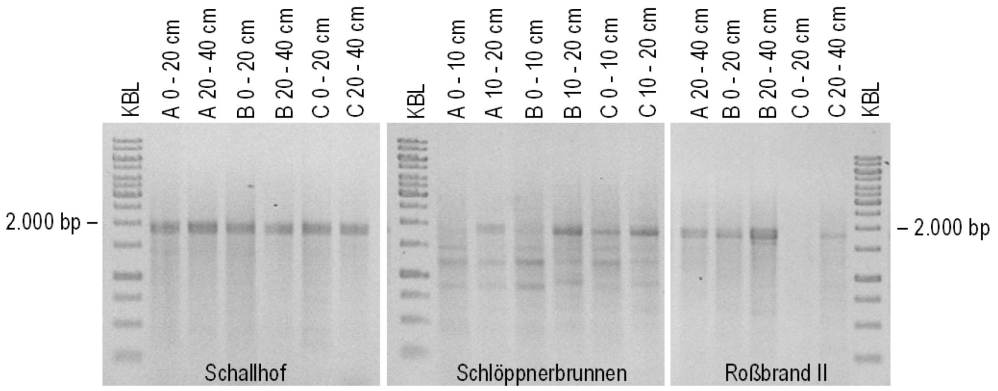


Abb. C.3: *dsrAB*-PCR-Produkte

Die Optimierung der PCR zur Amplifikation von *dsrAB* (1.900 bp) mit Hilfe der Primer DSR-1Fmix und DSR4Rmix wurde in Kapitel C.2.1. beschrieben. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % (w/v)-Agarosegel in 1x Modified TAE-Puffer aufgetrennt, die betreffenden Banden ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß aus dem Millipore DNA Gel Extraction Kit für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, um die *dsrAB*-Amplifikate in 1x Modified TAE-Puffer gelöst zu erhalten. Aus einer Probe (Roßbrand II, Kern C, Entnahmetiefe 0-20 cm) konnten auch nach mehreren Wiederholungen der PCR keine *dsrAB*-Produkte erhalten werden (Abb. C.3). Unspezifische Produkte wurden in den wenigsten Fällen gebildet, nur in den Proben aus dem Moorgebiet Schlöppnerbrunnen waren in jedem Ansatz außer der erwarteten Bande noch mindestens zwei weitere vorhanden (Abb. C.3). Dieser Umstand stellte aber kein Problem dar, da aus dem Gel nur die spezifischen Banden isoliert und für weitere Reaktionen verwendet wurden.

Aus den gereinigten *dsrAB*-Produkten wurden anschließend in einem zweiten PCR-Schritt gemäß Tabelle B.16 die *dsrB*-Genfragmente amplifiziert und mit der für die DGGE benötigten GC-Clamp versehen. Dazu wurden, jeweils in einer separaten Reaktion, die Primer DSRp1728FmixA, -B, -C, -D und -E gemeinsam mit dem Rückwärtsprimer DSR4Rmix verwendet. Die PCR-Produkte hatten gemeinsam mit der GC-Clamp eine Länge von ca. 300 bp.

Tabelle F.4 im Anhang ist zu entnehmen, mit welchen Vorwärtsprimern und welchen Proben das gewünschte Produkt erhalten wurde. Mit DSRp1728FmixA war die Amplifikation bei allen 54 Proben erfolgreich, mit Mix B bei 51. Mit Mix C konnten aus den jeweils geringeren Entnahmetiefen der Krähmoos- und Roßbrand II-Proben keine und aus dem Schremser Moor gar keine

dsrB-Abschnitte amplifiziert werden. Aus den Proben von Roßbrand I und II, Schallhof, Berndorf, Schlöppnerbrunnen und Große Heide wurden mit Mix D Produkte erhalten, bei letzterem allerdings nur in zwei von sechs Subproben. Amplifikationsversuche mit dem Primermix E verliefen mit sämtlichen Proben erfolglos, weshalb die betreffenden Ansätze nicht für die DGGE verwendet wurden. In der Probe, aus der zuvor schon keine *dsrAB*-Amplifikate zu gewinnen waren, konnten erwartungsgemäß auch in diesem zweiten PCR-Schritt keine Produkte nachgewiesen werden.

Die *dsrB*-Amplifikate aus den Reaktionen mit DSRp1728FmixA, -B, -C und -D wurden jeweils pro Probe gepoolt und auf einem 1 % (w/v)-Agarosegel qualitativ überprüft (Abb. C.4).

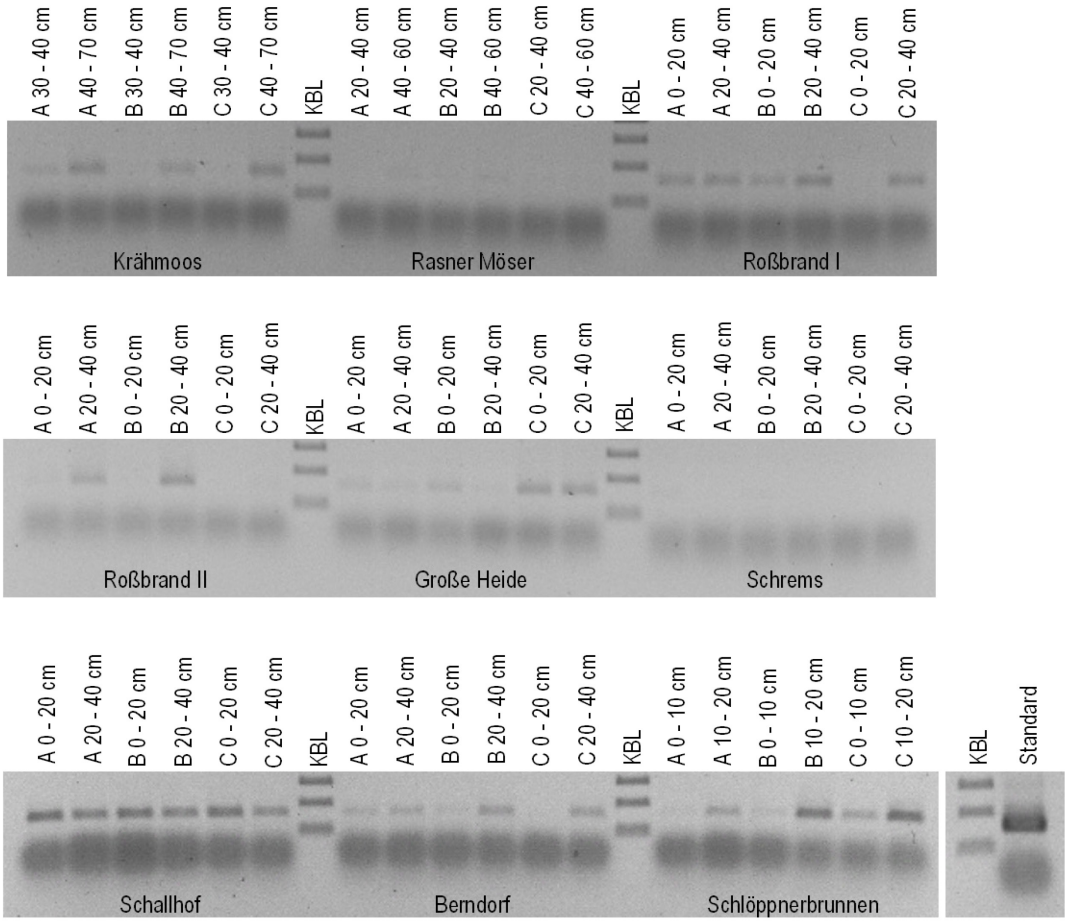


Abb. C.4: Vereinigte *dsrB*-PCR-Produkte aus den jeweils vier Reaktionen mit verschiedenen Vorwärtsprimern. Die beiden untersten Banden des KBL-Markers definieren eine Länge von 250 bzw. 500 bp. Als Standard wurde eine Mischung der Plasmide *dsr*SbI-88, *dsr*SbII-25 und J1_32T zu gleichen Teilen verwendet. Von den Proben wurden jeweils 15 µl auf das Gel aufgetragen, vom Standard 10 µl. Obwohl bei einigen Proben keine Bande am Agarosegel zu erkennen ist, waren laut spektralphotometrischer Messung in allen Proben PCR-Produkte vorhanden.

Für die Analyse mittels DGGE wurden die PCR-Produkte aus unterschiedlichen Entnahmetiefen der jeweiligen Probenahmestellen vereinigt, so dass von jedem der neun untersuchten Moorgebiete drei Proben (Kern A, B und C) vorhanden waren. Bei den Proben aus den Untersuchungsgebieten Rasner Möser, Roßbrand II und Schrems war die Ausbeute an *dsrB*-Amplifikaten

äußerst gering, weshalb für die DGGE entsprechend hohe Probenmengen (200 - 500 µl) eingesetzt werden mussten um deutlich sichtbare Banden zu erhalten.

Aus den Referenz-Plasmidlösungen *dsr*SbI-88, *dsr*SbII-25 und J1_32T wurden unter denselben Reaktionsbedingungen wie für die übrigen Proben die *dsrB*-Genabschnitte amplifiziert (jeweils mit den Primern DSRp1728FmixA, -C und -D), allerdings nicht im Nested PCR-Verfahren, d.h. ohne *dsrAB*-Zwischenschritt. Die Produkte wurden vereinigt und als Positionsmarker für die DGGE verwendet.

C.3.2. Elektrophorese

Basierend auf vorangegangenen Studien (Miletto 2007) wurde für die Auftrennung der *dsrB*-Amplifikate mittels DGGE ein 8 % (v/v)-PAA-Gel mit einem denaturierenden Gradienten von 30 – 80 % verwendet, wobei eine 100 %-Lösung mit 7 M Harnstoff und 40 % (v/v) Formamid definiert wurde. Die Auftrennung der einzelnen Banden unter diesen Bedingungen war zufriedenstellend und konnte auch durch die Erweiterung des Gradienten auf 20 – 80 % in einem Probelauf nicht verbessert werden. In weiteren Probeläufen wurden die Dauer der Elektrophorese und die angelegte Spannung variiert (100 V für 16 h, 75 V für 26 h, 150 V für 5 h). Die besten Ergebnisse wurden bei 150 V für 5 h erzielt, bei längeren Laufzeiten und geringeren Spannungen waren die Banden sehr schwach und teilweise nicht deutlich voneinander abgegrenzt.
Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 1 h in eine SYBR® Green I-Färbelösung gelegt und anschließend auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

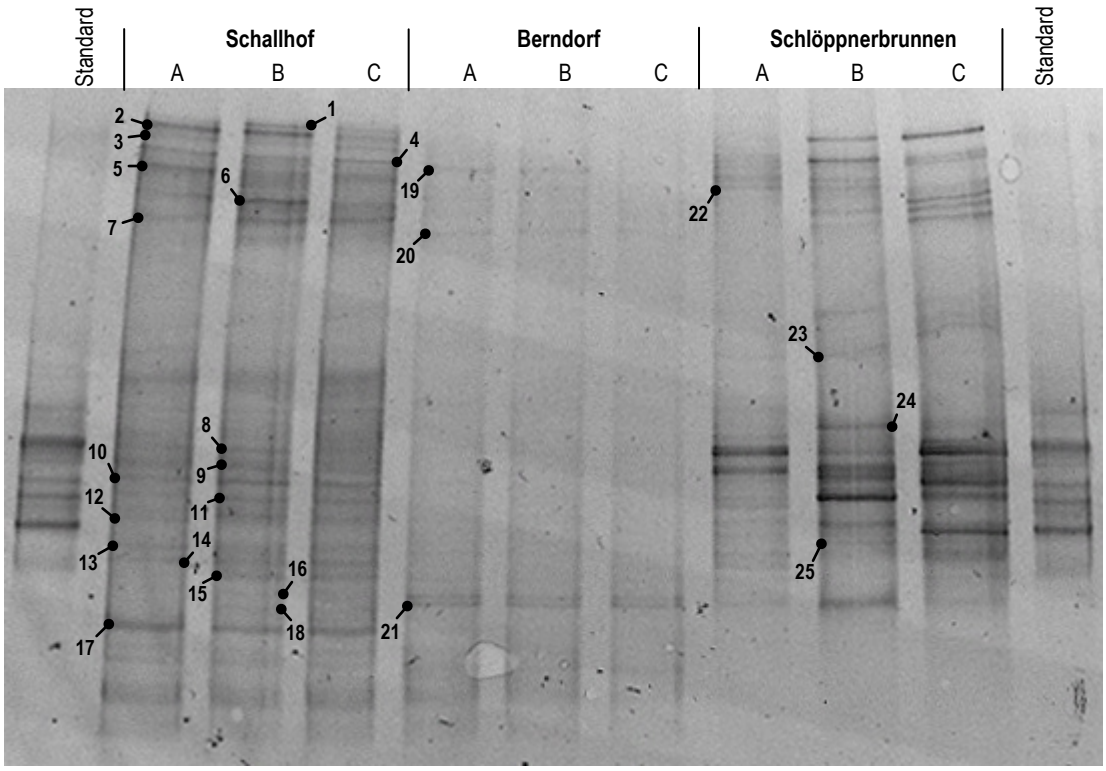


Abb. C.5: DGGE mit *dsrB*-Amplifikaten aus den Moorgebieten Schallhof, Berndorf und Schlöppnerbrunnen. Markierte Banden wurden in die Presence-Absence-Matrix aufgenommen.

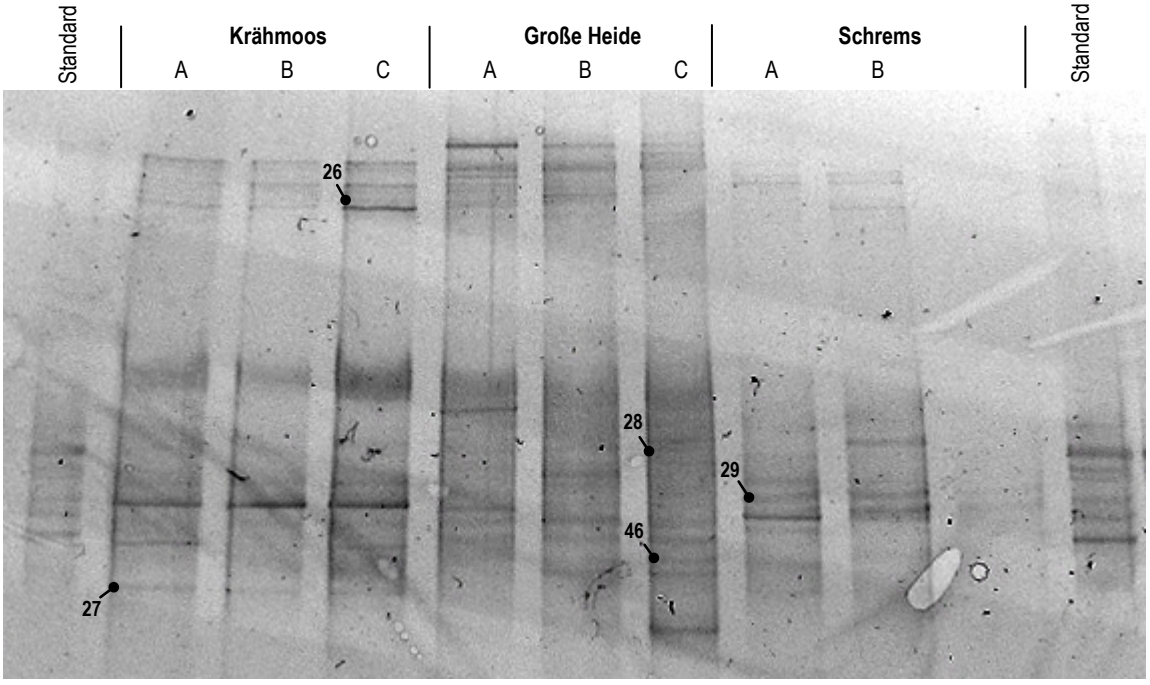


Abb. C.6: DGGE mit *dsrB*-Amplifikaten aus den Moorgebieten Krähmoos, Große Heide und Schrems. Markierte Banden wurden in die Presence-Absence-Matrix aufgenommen.

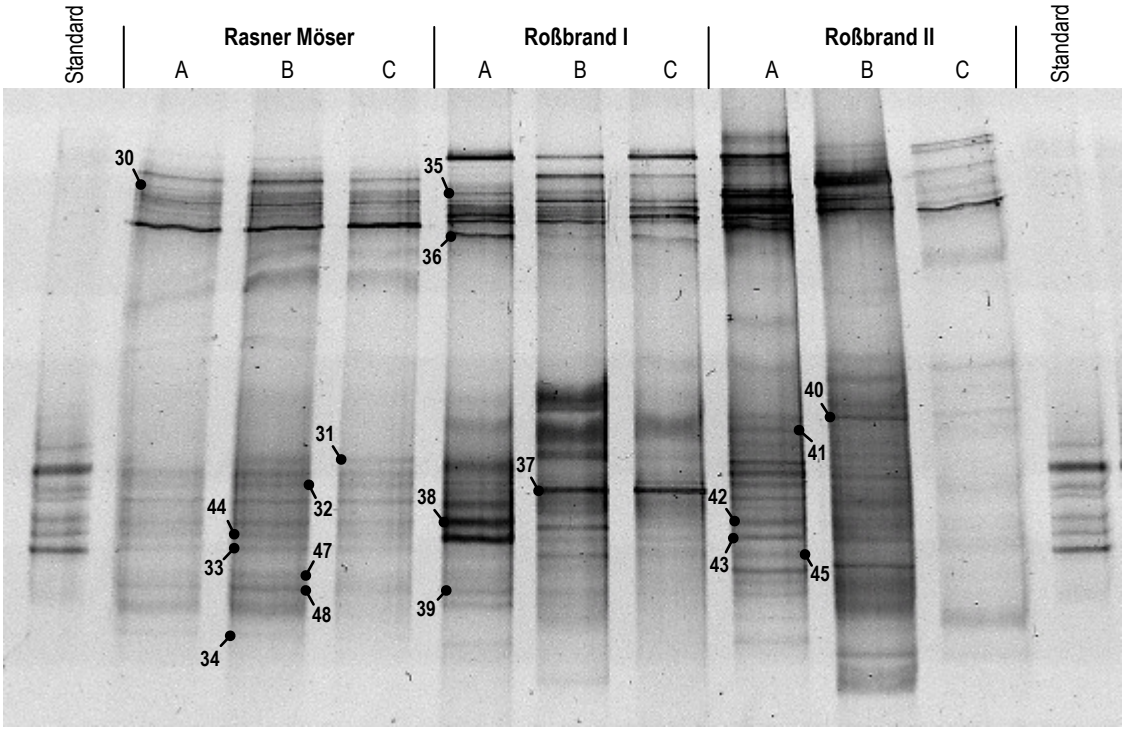


Abb. C.7: DGGE mit *dsrB*-Amplifikaten aus den Moorgebieten Rasner Möser, Roßbrand I und Roßbrand II. Markierte Banden wurden in die Presence-Absence-Matrix aufgenommen.

Die drei Subproben (Kern A, B und C) aus den Moorgebieten Rasner Möser, Roßbrand I, Krähmoos, Schallhof und Berndorf ergaben nahezu identische Bandenmuster und auch die Subproben der vier anderen untersuchten Gebiete zeigten untereinander eine hohe Ähnlichkeit. Im Falle von Roßbrand II waren allerdings bei Kern C deutlich weniger Banden vorhanden als bei den anderen beiden Probenahmestellen. Da bei der Probe C aus dem Schremser Hochmoor nur eine sehr geringe Ausbeute an *dsrB*-PCR-Produkten erhalten worden war, waren auch auf dem DGGE-Gel nur wenige (drei) schwache Banden zu erkennen. Den größten Unterschied in der Position und Stärke der Banden zeigten die einzelnen Schlöppnerbrunnen-Subproben.
Die meisten verschiedenen Banden (durchschnittlich 20) waren in Proben aus Schallhof, Rasner Möser, Roßbrand I und Roßbrand II zu sehen, die wenigsten (vier bis sieben) bei Berndorf und Schrems.

C.3.3. Statistische Auswertung mit dem Programm Primer 5.0

Basierend auf den Fotos der DGGE-Gele (Abb. C.5-C.7) wurden 48 Banden identifiziert, nummeriert und in einer sogenannten Presence-Absence-Matrix erfasst. Anhand dieser Matrix (Tab. F.5 im Anhang) wurde mit dem Programm Primer 5.0 eine Bray-Curtis-Ähnlichkeitsmatrix und

in weiterer Folge ein Baumdiagramm (Abb. C.8) berechnet, das die Ähnlichkeit der Proben ihr Bandenmuster betreffend darstellt.

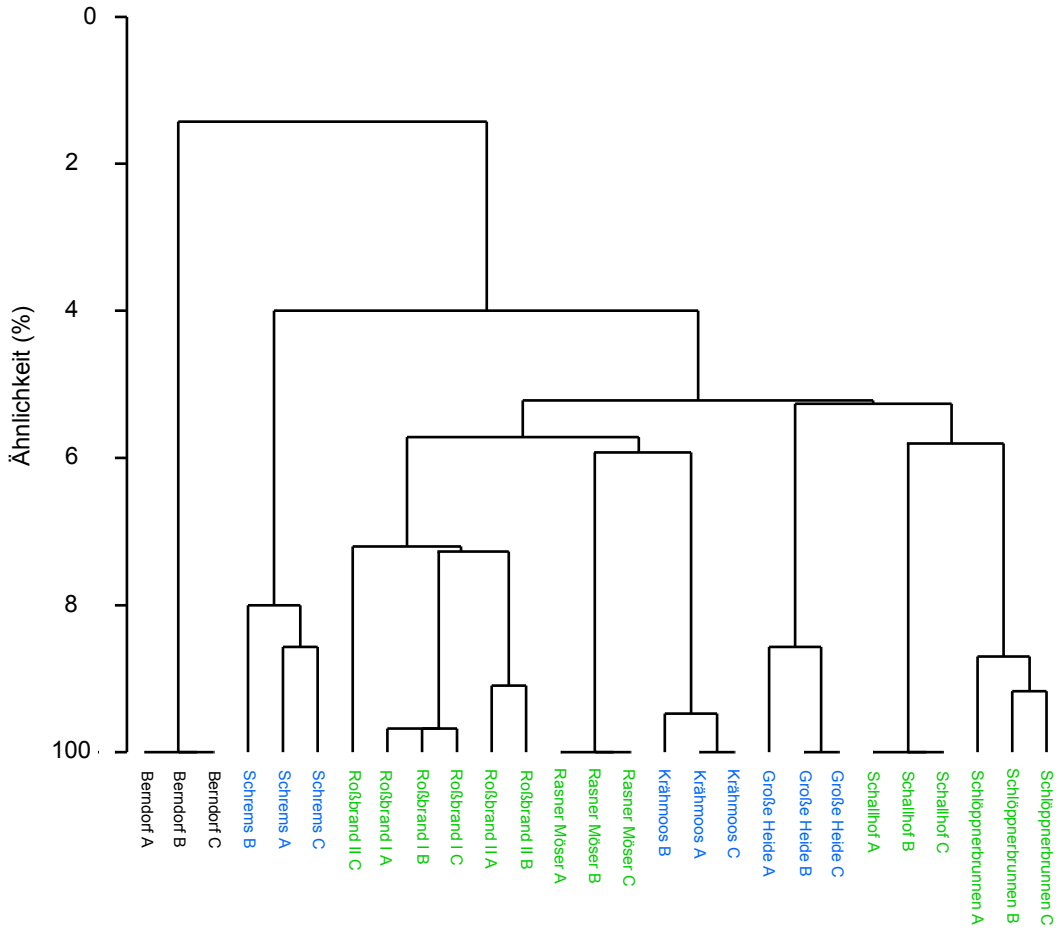


Abb. C.8: Ähnlichkeit der Bandenmuster der DGGE-Proben basierend auf einer Bray-Curtis-Matrix. A, B und C bezeichnen jeweils die drei Subproben der untersuchten Moorgebiete. Hochmoore sind in blau dargestellt, Niedermoore in grün und die Feuchtwiese in schwarz.

Die Subproben aus den Untersuchungsgebieten Berndorf, Rasner Möser und Schallhof wiesen eine hundertprozentige Ähnlichkeit ihrer DGGE-Bandenmuster auf, bei Roßbrand I und Krähmoos lag dieser Wert zumindest über 90 %. Im Fall von Krähmoos und Großer Heide betrug immerhin die Ähnlichkeit zwischen zwei der drei Subproben 100 %. Die größte Heterogenität unter den Subproben war bei Schrems, Schlöppnerbrunnen und Roßbrand II auszumachen.
Mit einer Ausnahme bildeten stets die Subproben desselben Moorgebietes eine monophyletische Gruppe, nur bei Roßbrand II war diese Clusterung nicht gegeben: Die Subproben A und B hatten eine größere Ähnlichkeit zu den Roßbrand I-Proben als zur Subprobe C desselben Standortes. Berndorf, der einzige Vertreter des Moortyps Feuchtwiese in dieser Arbeit, nahm eine isolierte Stelle im Baumdiagramm ein und hatte eine äußerst geringe Ähnlichkeit (unter 20 %) zu den übrigen Proben.

Unter den Hoch- und Niedermooren war keine Moortyp-spezifische Gruppierung zu erkennen. Proben aus Niedermooren hatten zueinander keine größere Ähnlichkeit ihrer Bandenmuster als zu Proben aus Hochmooren und umgekehrt.

In zwei Fällen waren die jeweils geografisch am nächsten gelegenen Untersuchungsgebiete auch hinsichtlich ihrer DGGE-Bandenmuster am ähnlichsten: Roßbrand I und Roßbrand II, die sich in Salzburg befinden und nur wenige km voneinander entfernt sind, sowie die beiden Moore aus Südtirol, Krähmoos und Rasner Möser.

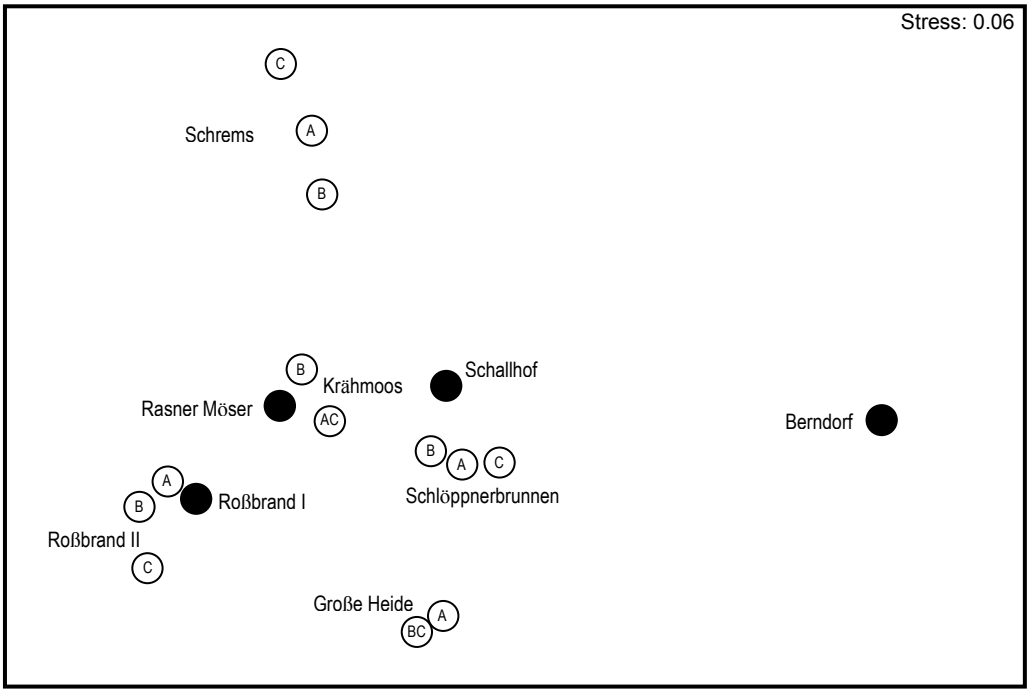


Abb. C.9: Ähnlichkeit der Bandenmuster der DGGE-Proben; zweidimensionale Darstellung der Bray-Curtis-Matrix über die „Non-metric MDS"-Methode. A, B und C bezeichnen jeweils die drei Subproben der untersuchten Moorgebiete. Schwarze Punkte beinhalten alle drei Subproben des betreffenden Gebietes.

In Abb. C.9 ist die Bray-Curtis-Ähnlichkeitsmatrix der DGGE-Banden über ein „Non-metric Multidimensional Scaling"-Verfahren in einer zweidimensionalen Skalierung gezeigt. Da es sich dabei nur um eine andere Darstellungsform des obigen Baumdiagrammes handelt, sind auch die Ergebnisse dieselben. Während die einzelnen Subproben aus Berndorf, Schallhof, Rasner Möser und Roßbrand I so hohe Ähnlichkeitswerte hatten, dass sie nicht als einzelne Punkte in der Abbildung dargestellt werden konnten, sind die große Heterogenität der Schremser Proben und der Unterschied von Roßbrand II C zu A und B deutlich zu erkennen.

Die gemessenenen pH-Werte und Sulfatkonzentrationen der Untersuchungsgebiete korrelieren weder mit der x- noch mit der y-Achse des Diagramms. Allerdings weist die Feuchtwiese Berndorf, die eine äußerst geringe Ähnlichkeit zu den anderen Probenahmeorten hat, mit Abstand die höchste Sulfatkonzentration und den höchsten pH-Wert auf.

C.3.4. Reamplifikation und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente

Aus den drei oben gezeigten DGGE-Gelen wurden insgesamt 160 Banden ausgeschnitten und die in $H_2O_{bidest.}$ inkubierten Gelstücke in einer PCR (Tabelle B.17) zur Reamplifikation der *dsrB*-Gene eingesetzt. Mit den dafür verwendeten Primern DSR4Rmix und DSRp1728Fa-noGC (entspricht dem Primer DSRp1728Fa, trägt aber keine GC-Clamp) gelang die Reamplifikation in den meisten Fällen; mit dem Primer DSRp1728Ff-noGC konnten schließlich auch aus den übrigen Proben (Banden 20, 41, 48-50, 60, 75-77, 84, 114, 115, 130, 149, 156, 158-160) *dsrB*-Produkte erhalten werden. Vor dem Sequenziervorgang wurden sämtliche Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen.

Sequenzierversuche mit dem Primer DSRp1728Fa-noGC blieben allesamt erfolglos und ergaben keine zufriedenstellenden Chromatogramme. Unter Verwendung des Primers DSR4Rmix konnten 60 der 160 *dsrB*-Amplifikate erfolgreich sequenziert werden, alle anderen zeigten in ihren Chromatogrammen Überlagerungen von zwei oder mehr verschiedenen Sequenzen und waren für die folgenden phylogenetischen Verwandtschaftsanalysen nicht zu gebrauchen.

C.3.5. Vergleichende Sequenzanalyse

In vier Fällen waren zwei Sequenzen über ihre gesamte Länge identisch (ausgeschnittene Banden 52 und 117, 55 und 101, 26 und 28, 81 und 113), so dass insgesamt 56 verschiedene *dsrB*-Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 300 bp vorlagen. Von 33 der 48 Banden, die in die Presence-Absence-Matrix aufgenommen worden waren, konnten die zugehörigen Sequenzen bestimmt werden. Zusätzlich wurden 23 Sequenzen erhalten, die keine Entsprechung in der Matrix hatten, weil die ausgeschnittenen Banden nur auf den Gelen selbst, nicht aber auf den Gelbildern zu erkennen waren.

C.3.5.1. Schnellanalyse der Sequenzen mittels BLAST

Um erste Informationen über die Identität und Phylogenie der 56 *dsrB*-Sequenzen zu erhalten, wurden sie mit den Programmen BLASTn (Abgleich von Nukleotidsequenzen mit Nukleotiddatenbanken) und BLASTx (Abgleich von translatierten Nukleotidsequenzen mit Proteindatenbanken) analysiert. Eine Tabelle mit den BLASTn-Ergebnissen befindet sich im Anhang (Tabelle F.6). Bei drei Sequenzen (DGGE 65, DGGE 116 und DGGE 158) konnte keine Verwandtschaft mit vorhandenen Datenbankeinträgen festgestellt werden, alle anderen lieferten *dsr*-spezifische

Treffer. Dabei handelte es sich vor allem um nicht kultivierte Umweltklone aus diversen Habitaten (z.B. Grundwasser, marine Sedimente oder diverse Bodenarten), nur bei DGGE 40 stammte die am nächsten verwandte Sequenz aus einer Bakterien-Reinkultur (*Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB). In 13 Fällen wurden Sequenzen bereits bekannter Schlöppnerbrunnen-OTUs als erster Treffer der BLASTn-Analyse angezeigt: OTU 1 bei DGGE 153, OTU 2 bei DGGE 46 und DGGE 58, OTU 4 bei DGGE 91, DGGE 92 und DGGE 131, OTU 6 bei DGGE 35, 51, 52, 123, 140 und 141 und OTU 11 bei DGGE 155, wobei die ermittelten Identitätswerte bei DGGE 35, 51, 52, 58, 91, 92, 131, 141 und 153 mindestens 90 % betrugen.

C.3.5.2. Verwandtschaft der *dsrB*-Sequenzen mit bereits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs

Die *dsrB*-Sequenzen sowie 20 *dsrAB*-Vollsequenzen aus allen 11 bisher bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs wurden in Gruppen mit einer Aminosäuren-Identität von mindestens 89 % eingeteilt (s. Tabelle C.2). Die Berechnung erfolgte dabei einmal mit und einmal ohne Verwendung des Filters „indel_SRP". DGGE-Sequenzen innerhalb derselben Gruppe hatten auch als Banden auf den DGGE-Gelen ähnliche Positionen (d.h. geringe vertikale Abstände).

Tabelle C.2: Gruppierung der DGGE- und Schlöppnerbrunnensequenzen [a)]

Gruppe	Enthaltene Sequenzen [b)]
1	DGGE 51, 52, 117 & Schlöppnerbrunnen OTU 6 (Klon *dsr*SbII-40)
2	DGGE 74, 79, 80, 81, 91, 92, 113, 152, 153, 156 & Schlöppnerbrunnen OTU 1
3	DGGE 58 & Schlöppnerbrunnen OTU 2
4	DGGE 55, DGGE 101 & Schlöppnerbrunnen OTU 3
5	DGGE 131 & Schlöppnerbrunnen OTU 4
6	DGGE 82, DGGE 135 & Schlöppnerbrunnen OTU 11
7	DGGE 35, 37, 123, 140, 141 & Schlöppnerbrunnen OTU 6 (Klon *dsr*SbI-54)
8	DGGE 15 & DGGE 16
9	DGGE 18, 19, 20, 21, 22, 27, 31 & 124
10	DGGE 44, 45, 46 & 50
11	DGGE 158 & DGGE 159
12	DGGE 64, 65, 66 & 87

[a)] Identität der AS-Sequenzen ≥ 89 %; verwendeter Filter: indel_SRP

[b)] Gruppen mit nur einer Sequenz bzw. Schlöppnerbrunnen-OTU sind nicht gezeigt.

Basierend auf diesen Daten wurde in Abb. C.10 dargestellt, in wie vielen und welchen untersuchten Moorgebieten Verwandte der Schlöppnerbrunnen-OTUs nachgewiesen werden konnten. Das Baumdiagramm enthält neben den 11 Schlöppnerbrunnen-OTUs Referenzsequenzen aus allen wichtigen Gruppen der sulfatreduzierenden Mikroorganismen: *Firmicutes* (*Desulfovibrio spp.*, *Desulfotomaculum spp.*), *Proteobacteria* (*Desulfomicrobiaceae*, *Desulfobacteraceae* etc.), *Thermodesulfobacteria* (*Thermodesulfobacterium spp.*), *Nitrospirae* (*Thermodesulfovibrio spp.*) und *Archaea* (*Archaeoglobus spp.*).

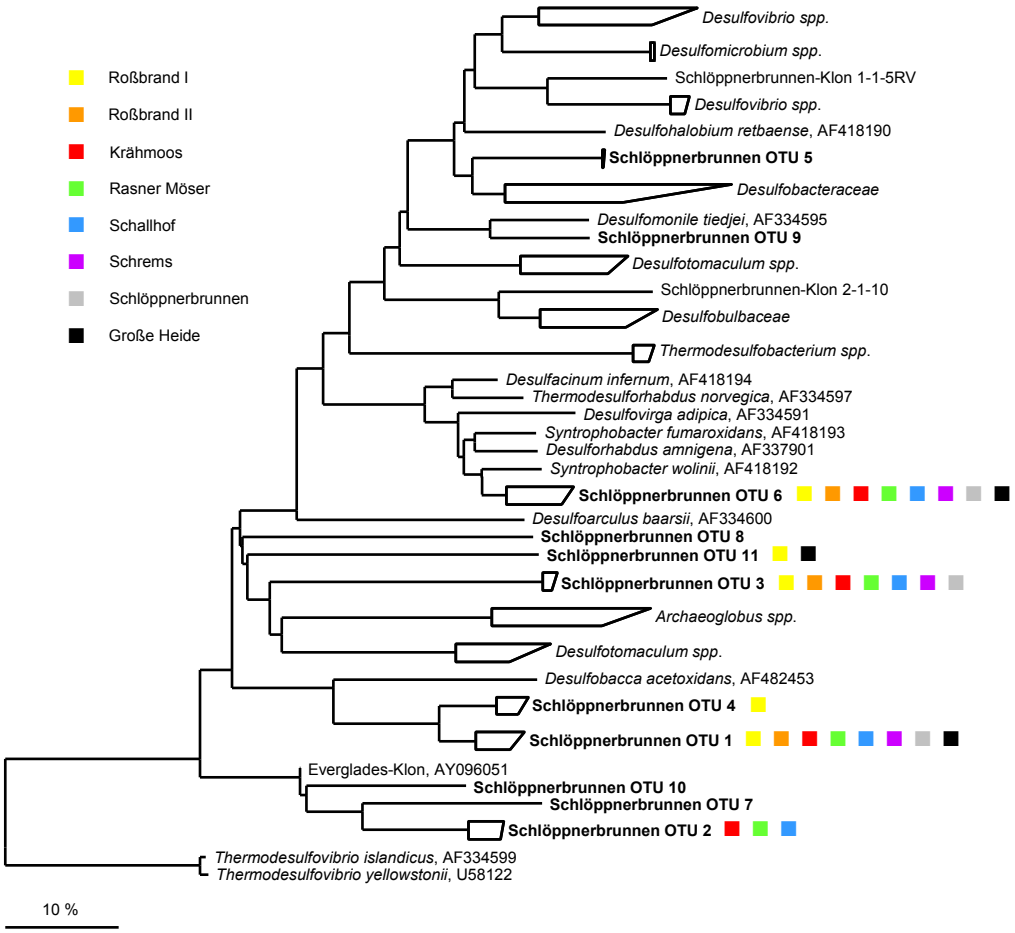


Abb. C.10: Fitch-Baum zur Darstellung der Verwandtschaft von bereits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs mit den nach der DGGE reamplifizierten *dsr*B-Sequenzen. Die Berechnung erfolgte Aminosäuren-basiert unter Verwendung des Filters indel_SRP. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Sequenzidentität. Farbige Kästchen geben an, in welchen der untersuchten Moorgebiete verwandte Sequenzen (Identität ≥ 89 %) der jeweiligen OTU gefunden wurden.

In allen untersuchten Moorgebieten mit Ausnahme von Berndorf konnten Sequenzen identifiziert werden, die eine Aminosäurenidentität von mindestens 89 % mit den Schlöppnerbrunnen-OTUs 1 und 6 hatten. Verwandte der OTU 3 konnten in sieben der neun Testregionen nachgewiesen werden, nicht aber in Berndorf und der Großen Heide. Zu den OTUs 4 und 11 fielen Sequenzen, die aus den Proben von Roßbrand I erhalten worden waren; bei OTU 11 ergab sich zusätzlich eine Verwandtschaft mit Sequenzen aus der Großen Heide. Im Fall der OTU 2 wurde ebenso eine Ähnlichkeit zu *dsrB*-Sequenzen aus anderen Moorgebieten festgestellt, nämlich aus Krähmoos, Rasner Möser und Schallhof. *dsrB*-Amplifikate, deren korrespondierende DGGE-Banden auch in Schlöppnerbrunnen-Proben vorhanden waren, zeigten eine Ähnlichkeit zu drei der bisher bekannten OTUs aus diesem Moorgebiet (OTU 1, 3 und 6).

Berndorf, in dieser Arbeit der einzige Vertreter des Moortyps Feuchtwiese, war auch das einzige Gebiet, aus dem keine Sequenzen mit mehr als 89 % Aminosäurenidentität zu Schlöppnerbrunnen-OTUs erhalten wurden.

C.3.5.3. Berechnung phylogenetischer Baumdiagramme mit *dsr*-Sequenzen aus Süßwasser-Feuchtgebieten

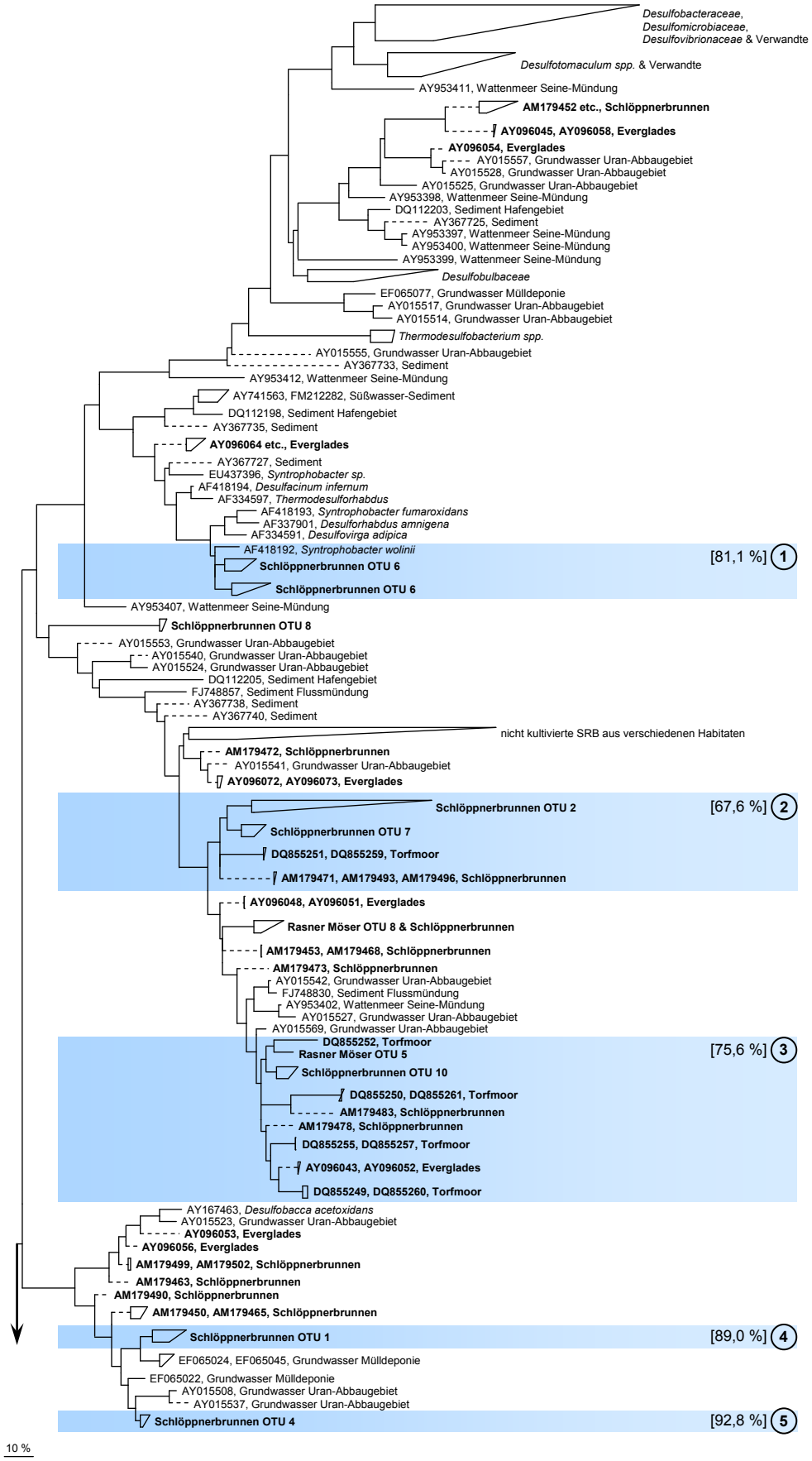
Um eine eventuelle Ausbildung monophyletischer Cluster zu untersuchen, die nur *dsr*-Sequenzen aus Moorböden enthalten, wurde eine phylogenetische Baumberechnung mit sämtlichen zur Verfügung stehenden *dsrA*-, *dsrB*- und *dsrAB*-Sequenzen aus Süßwasser-Feuchtgebieten (Böden, Sedimente oder Biofilme) durchgeführt. Dazu wurden alle *dsr*-Sequenzen der zuvor aktualisierten ARB-Datenbank verwendet, auf die das soeben genannte Kriterium der Isolierungsquelle zutraf (Sequenzen aus bisherigen Publikationen sowie die in dieser Arbeit erhaltenen 56 DGGE-Sequenzen und die 12 Vollsequenzen der Rasner Möser-Genbank-OTUs). Sie wurden einer BLAST-Analyse auf Nukleinsäurebasis unterzogen und die jeweils ersten drei Treffer wurden in die Berechnungen aufgenommen, nachdem doppelt oder mehrfach vorkommende Einträge entfernt worden waren. Zusätzlich wurden rund 40 *dsr*-Sequenzen aus Reinkulturen in die Analyse miteinbezogen, die Vertreter aller bekannten SRM-Phyla beinhalteten.

Die phylogenetische Baumberechnung erfolgte mit der Fitch-Methode unter Verwendung des Filters „indel_SRP“ und nur mit Sequenzen, die eine Länge von mindestens 1.300 bp hatten (229). Der resultierende Baum wurde dupliziert, so dass anschließend einmal die kürzeren Sequenzen von *dsrA*-Genen und einmal die von *dsrB*-Genen über die „Quick Add“-Funktion des Programmes hinzugefügt werden konnten. Als zusätzlicher Filter wurde dabei jeweils eine der kurzen Sequenzen verwendet. Die endgültige Version des Baumes mit *dsrA* umfasste 413 Sequenzen, die mit *dsrB* 442.

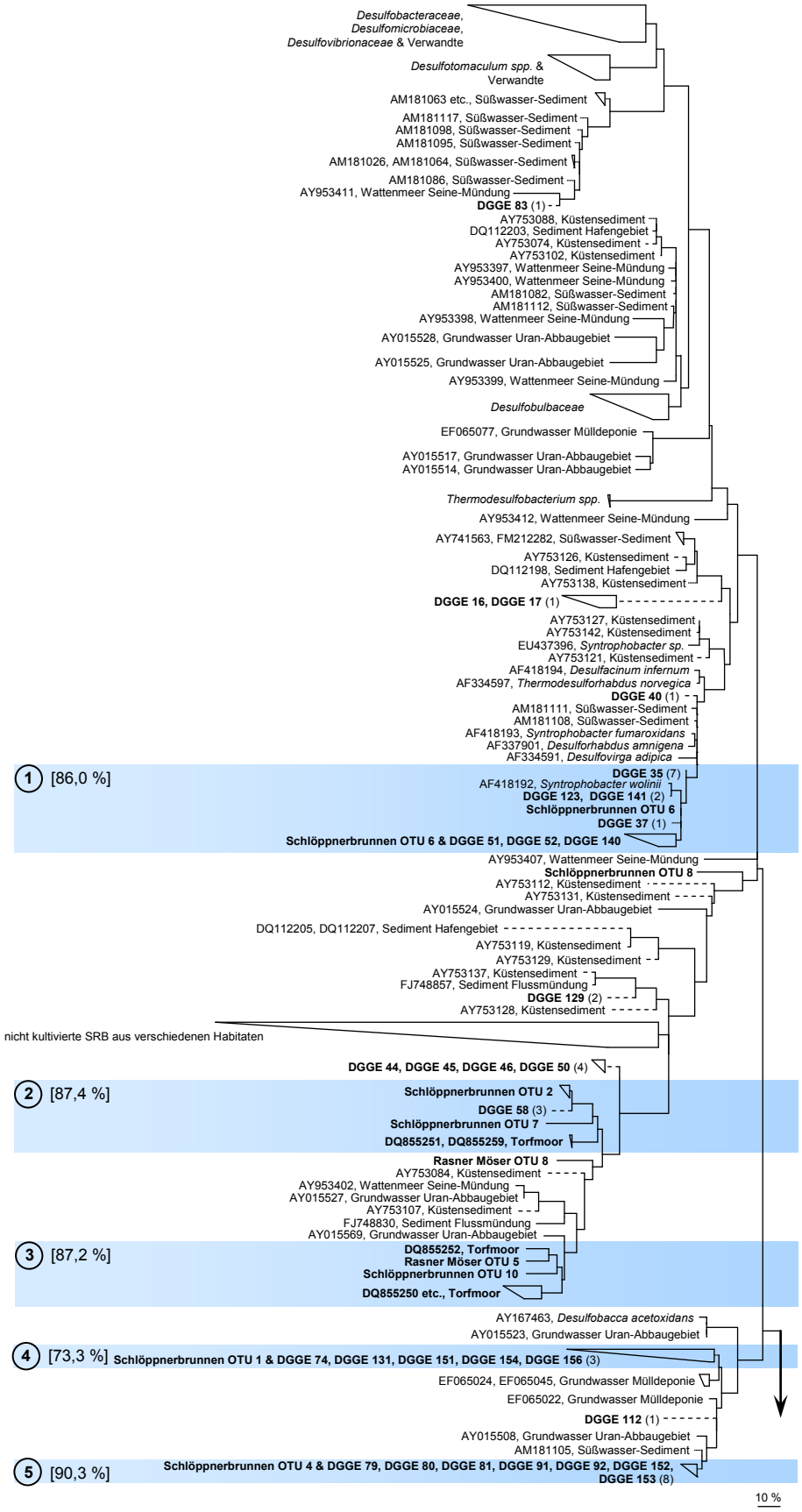
Da der Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sulfatreduzierende Mikroorganismen in Moorböden waren, wurden *dsr*-Sequenzen aus anderen Habitaten nicht berücksichtigt. Einige davon befanden sich allerdings unter den Ergebnissen der BLAST-Suche und sind aus diesem Grund im Fitch-Baum zu finden.

Abb. C.11 auf den nächsten vier Seiten**:** Fitch-Bäume mit allen bisher publizierten *dsr*-Gensequenzen aus Süßwasser-Feuchtgebieten inklusive DGGE- und Genbank-Sequenzen aus dieser Arbeit. Für die Berechnung wurden Sequenzen mit einer Länge von mindestens 1.300 bp verwendet, *dsrA*-Teilsequenzen wurden im linken (A-1 und A-2) und *dsrB*-Teilsequenzen im rechten Baum (B-1 und B-2) nachträglich hinzugefügt und durch strichlierte Äste gekennzeichnet. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Zahlen in runden Klammern geben an, in wie vielen der neun Untersuchungsgebiete die entsprechenden DGGE-Banden vorhanden waren. Potentielle moorspezifische Cluster sind nummeriert und blau markiert. Zahlen in eckigen Klammern geben die minimale Proteinsequenzidentität aller im Cluster enthaltenen Sequenzen an.

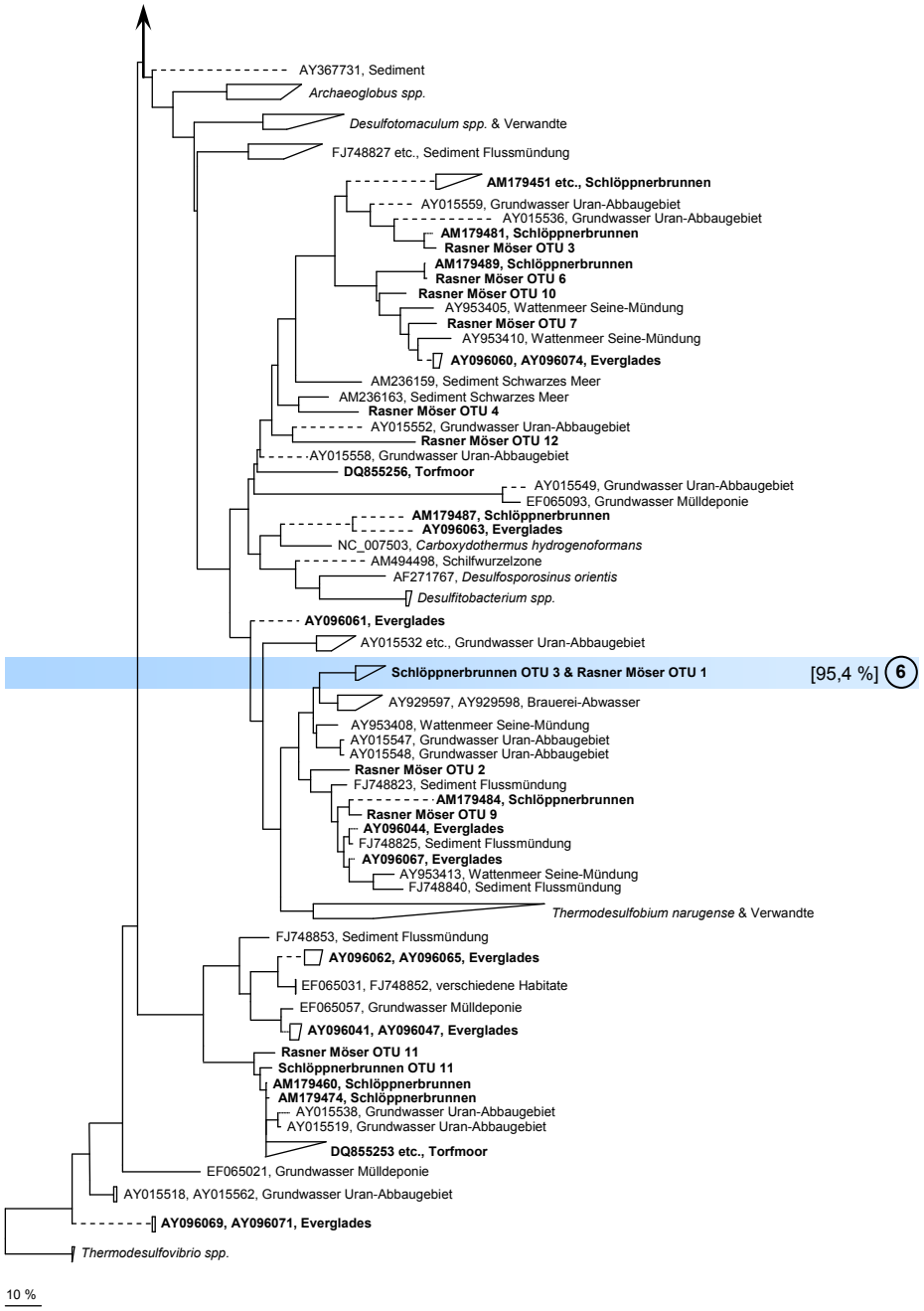
A-1


Desulfobacteraceae, *Desulfomicrobiaceae*, *Desulfovibrionaceae* & Verwandte
Desulfotomaculum spp. & Verwandte
AY953411, Wattenmeer Seine-Mündung
AM179452 etc., Schlöppnerbrunnen
AY096045, AY096058, Everglades
AY096054, Everglades
AY015557, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015528, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015525, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY953398, Wattenmeer Seine-Mündung
DQ112203, Sediment Hafengebiet
AY367725, Sediment
AY953397, Wattenmeer Seine-Mündung
AY953400, Wattenmeer Seine-Mündung
AY953399, Wattenmeer Seine-Mündung
Desulfobulbaceae
EF065077, Grundwasser Mülldeponie
AY015517, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015514, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
Thermodesulfobacterium spp.
AY015555, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY367733, Sediment
AY953412, Wattenmeer Seine-Mündung
AY741563, FM212282, Süßwasser-Sediment
DQ112198, Sediment Hafengebiet
AY367735, Sediment
AY096064 etc., Everglades
AY367727, Sediment
EU437396, *Syntrophobacter sp.*
AF418194, *Desulfacinum infernum*
AF334597, *Thermodesulforhabdus*
AF418193, *Syntrophobacter fumaroxidans*
AF337901, *Desulforhabdus amnigena*
AF334591, *Desulfovirga adipica*
AF418192, *Syntrophobacter wolinii*
Schlöppnerbrunnen OTU 6
Schlöppnerbrunnen OTU 6
[81,1 %] 1
AY953407, Wattenmeer Seine-Mündung
Schlöppnerbrunnen OTU 8
AY015553, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015540, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015524, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
DQ112205, Sediment Hafengebiet
FJ748857, Sediment Flussmündung
AY367738, Sediment
AY367740, Sediment
nicht kultivierte SRB aus verschiedenen Habitaten
AM179472, Schlöppnerbrunnen
AY015541, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY096072, AY096073, Everglades
Schlöppnerbrunnen OTU 2
Schlöppnerbrunnen OTU 7
DQ855251, DQ855259, Torfmoor
AM179471, AM179493, AM179496, Schlöppnerbrunnen
[67,6 %] 2
AY096048, AY096051, Everglades
Rasner Möser OTU 8 & Schlöppnerbrunnen
AM179453, AM179468, Schlöppnerbrunnen
AM179473, Schlöppnerbrunnen
AY015542, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
FJ748830, Sediment Flussmündung
AY953402, Wattenmeer Seine-Mündung
AY015527, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015569, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
DQ855252, Torfmoor
Rasner Möser OTU 5
Schlöppnerbrunnen OTU 10
DQ855250, DQ855261, Torfmoor
AM179483, Schlöppnerbrunnen
AM179478, Schlöppnerbrunnen
DQ855255, DQ855257, Torfmoor
AY096043, AY096052, Everglades
DQ855249, DQ855260, Torfmoor
[75,6 %] 3
AY167463, *Desulfobacca acetoxidans*
AY015523, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY096053, Everglades
AY096056, Everglades
AM179499, AM179502, Schlöppnerbrunnen
AM179463, Schlöppnerbrunnen
AM179490, Schlöppnerbrunnen
AM179450, AM179465, Schlöppnerbrunnen
Schlöppnerbrunnen OTU 1
[89,0 %] 4
EF065024, EF065045, Grundwasser Mülldeponie
EF065022, Grundwasser Mülldeponie
AY015508, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015537, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
Schlöppnerbrunnen OTU 4
[92,8 %] 5
10 %

B-1

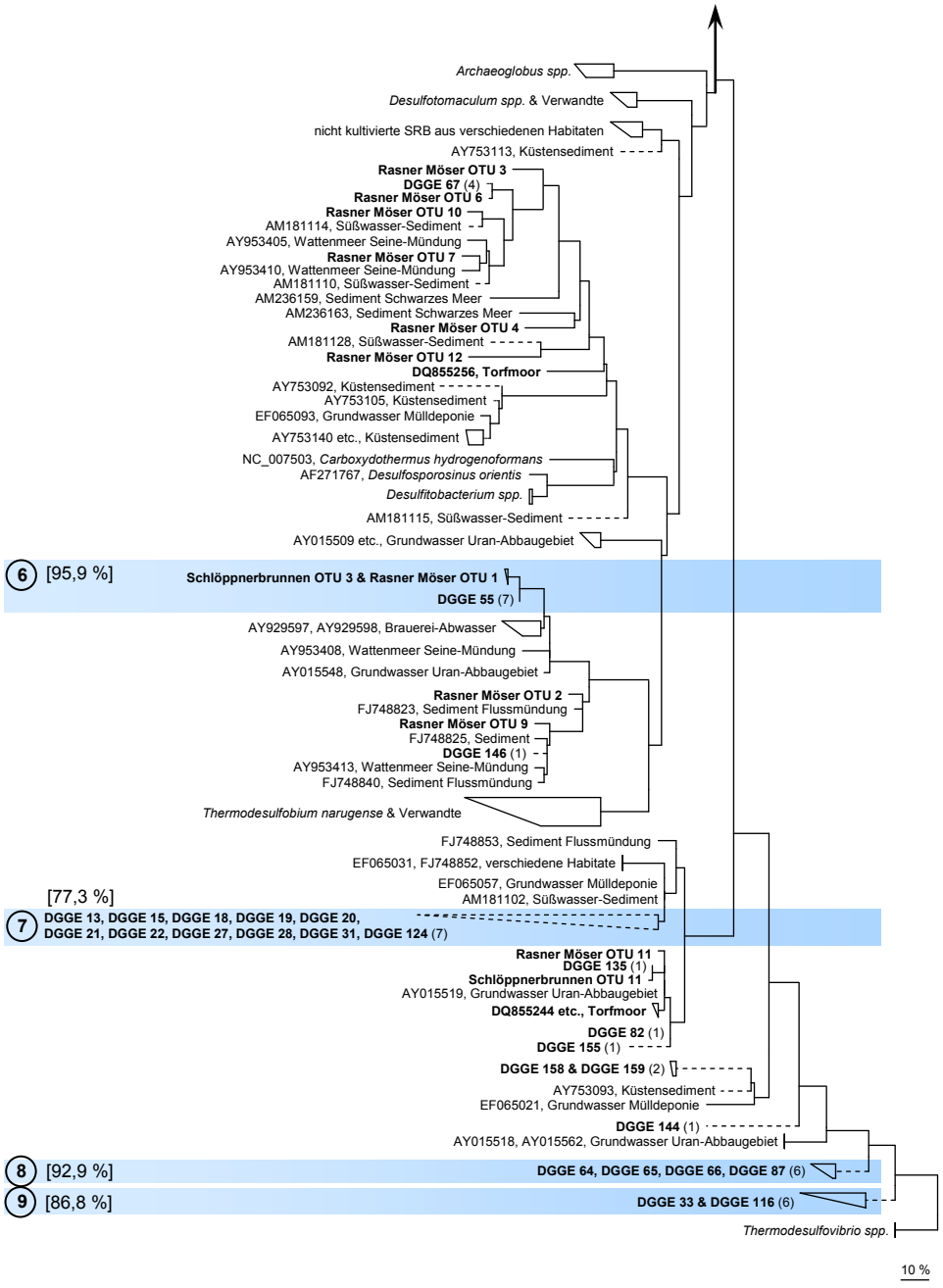

Desulfobacteraceae, Desulfomicrobiaceae, Desulfovibrionaceae & Verwandte
Desulfotomaculum spp. & Verwandte
AM181063 etc., Süßwasser-Sediment
AM181117, Süßwasser-Sediment
AM181098, Süßwasser-Sediment
AM181095, Süßwasser-Sediment
AM181026, AM181064, Süßwasser-Sediment
AM181086, Süßwasser-Sediment
AY953411, Wattenmeer Seine-Mündung
DGGE 83 (1)
AY753088, Küstensediment
DQ112203, Sediment Hafengebiet
AY753074, Küstensediment
AY753102, Küstensediment
AY953397, Wattenmeer Seine-Mündung
AY953400, Wattenmeer Seine-Mündung
AM181082, Süßwasser-Sediment
AM181112, Süßwasser-Sediment
AY953398, Wattenmeer Seine-Mündung
AY015528, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015525, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY953399, Wattenmeer Seine-Mündung
Desulfobulbaceae
EF065077, Grundwasser Mülldeponie
AY015517, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY015514, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
Thermodesulfobacterium spp.
AY953412, Wattenmeer Seine-Mündung
AY741563, FM212282, Süßwasser-Sediment
AY753126, Küstensediment
DQ112198, Sediment Hafengebiet
AY753138, Küstensediment
DGGE 16, DGGE 17 (1)
AY753127, Küstensediment
AY753142, Küstensediment
EU437396, Syntrophobacter sp.
AY753121, Küstensediment
AF418194, Desulfacinum infernum
AF334597, Thermodesulforhabdus norvegica
DGGE 40 (1)
AM181111, Süßwasser-Sediment
AM181108, Süßwasser-Sediment
AF418193, Syntrophobacter fumaroxidans
AF337901, Desulforhabdus amnigena
AF334591, Desulfovirga adipica
1 [86,0 %]
DGGE 35 (7)
AF418192, Syntrophobacter wolinii
DGGE 123, DGGE 141 (2)
Schlöppnerbrunnen OTU 6
DGGE 37 (1)
Schlöppnerbrunnen OTU 6 & DGGE 51, DGGE 52, DGGE 140
AY953407, Wattenmeer Seine-Mündung
Schlöppnerbrunnen OTU 8
AY753112, Küstensediment
AY753131, Küstensediment
AY015524, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
DQ112205, DQ112207, Sediment Hafengebiet
AY753119, Küstensediment
AY753129, Küstensediment
AY753137, Küstensediment
FJ748857, Sediment Flussmündung
DGGE 129 (2)
AY753128, Küstensediment
nicht kultivierte SRB aus verschiedenen Habitaten
DGGE 44, DGGE 45, DGGE 46, DGGE 50 (4)
2 [87,4 %]
Schlöppnerbrunnen OTU 2
DGGE 58 (3)
Schlöppnerbrunnen OTU 7
DQ855251, DQ855259, Torfmoor
Rasner Möser OTU 8
AY753084, Küstensediment
AY953402, Wattenmeer Seine-Mündung
AY015527, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AY753107, Küstensediment
FJ748830, Sediment Flussmündung
AY015569, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
3 [87,2 %]
DQ855252, Torfmoor
Rasner Möser OTU 5
Schlöppnerbrunnen OTU 10
DQ855250 etc., Torfmoor
AY167463, Desulfobacca acetoxidans
AY015523, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
4 [73,3 %]
Schlöppnerbrunnen OTU 1 & DGGE 74, DGGE 131, DGGE 151, DGGE 154, DGGE 156 (3)
EF065024, EF065045, Grundwasser Mülldeponie
EF065022, Grundwasser Mülldeponie
DGGE 112 (1)
AY015508, Grundwasser Uran-Abbaugebiet
AM181105, Süßwasser-Sediment
5 [90,3 %]
Schlöppnerbrunnen OTU 4 & DGGE 79, DGGE 80, DGGE 81, DGGE 91, DGGE 92, DGGE 152, DGGE 153 (8)
10 %

A-2



Zehn *dsrB*-Sequenzen aus dem DGGE-Experiment (DGGE 16, 17, 35, 37, 40, 51, 52, 123, 140 und 141) fielen in ein gemeinsames Cluster mit der bereits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTU 6 und diversen *Deltaproteobacteria* wie *Syntrophobacter spp.*, *Desulfacinum infernum*, *Desulforhabdus amnigena* etc. Eine monophyletische Gruppe um die Schlöppnerbrunnen-OTUs 2, 7 und 10 enthielt neben den OTUs 5 und 8 der Rasner Möser-Genbank außerdem DGGE 44, 45, 46, 50 und 58, deren zugehörige DGGE-Banden in insgesamt fünf der neun untersuchten Moorgebiete vorhanden waren. Die Zuordnung zu einem bestimmten Phylum war in diesem Fall nicht möglich, da die Gruppe keine Sequenzen klassifizierter Mikroorganismen enthielt, sondern nur Klonsequenzen aus marinen und Süßwasser-Sedimenten, aus Moorböden und Grundwasserproben.

B-2



13 DGGE-Sequenzen (DGGE 74, 79-81, 91, 92, 112, 131, 151-154 und 156), die zusammen in allen Untersuchungsgebieten bis auf Berndorf nachgewiesen worden waren, zeigten eine engere phylogenetische Verwandtschaft zu den Schlöppnerbrunnen-OTUs 1 und 4 sowie zu dem Deltaproteobacterium *Desulfobacca acetoxidans*. In dieser Gruppe befanden sich des weiteren Klonsequenzen aus drei verschiedenen Süßwasserhabitaten (eine Sediment- und zwei Grundwasserproben) und den Everglades, aber keine Rasner Möser-OTU, obwohl die DGGE 81, 91 und 112 entsprechenden Banden in diesem Moorgebiet ausgemacht worden waren.

Das *dsrB*-Amplifikat DGGE 67, dessen korrelierende Bande am DGGE-Gel in den Proben der Moorgebiete Krähmoos, Roßbrand I, Roßbrand II und Rasner Möser vorkommt, fiel in eine

monophyletische Gruppe mit sechs der 12 Rasner Möser-OTUs und mehreren Vertretern der *Firmicutes* (*Carboxydothermus hydrogenoformans*, *Desulfosporosinus orientis* und *Desulfitobacterium spp.*).
In einem weiteren Ast des Baumes, der auch *Thermodesulfobium narugense* beinhaltete, fanden sich die Rasner Möser-OTUs 1, 2 und 9 sowie die Schlöppnerbrunnen-OTU 3 und DGGE 55 und 146, wobei sich zwischen der Rasner Möser-OTU 1, der Schlöppnerbrunnen-OTU 3 und DGGE 55 eine besonders geringe phylogenetische Distanz zeigte: Sie hatten eine Proteinsequenzidentität von mindestens 95,9 %, was sie bei der zuvor definierten Untergrenze von 90 % als Zugehörige zu ein- und derselben OTU auswies. Die der Sequenz DGGE 55 entsprechende DGGE-Bande war in Proben aus sieben der neun untersuchten Moorgebiete präsent (nur nicht in Berndorf und der Großen Heide).
Die *dsrB*-Sequenz DGGE 135, deren zugehörige Bande in Roßbrand I-Proben sichtbar war, befand sich im Baum in direkter Nähe bzw. phylogenetischer Verwandtschaft zu Schlöppnerbrunnen-OTU 11 und Rasner Möser-OTU 11. Eine Ähnlichkeit zu diesen Sequenzen zeigten auch DGGE 82, 155, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 31 und 124, wobei die elf letztgenannten ein eigenes Subcluster ausbildeten. Eine Zuordnung zu einem bestimmten Phylum war jedoch mangels klassifizierter Referenzorganismen nicht möglich.
DGGE 144 und drei weitere Gruppen von DGGE-Sequenzen (DGGE 64-66 und DGGE 87; DGGE 33 und 116; DGGE 158 und 159) bildeten im Baum eigene Cluster ohne nähere Verwandtschaften zu anderen *dsr*-Sequenzen. Dasselbe galt für *Archaea* (*Archaeoglobus spp.*), *Thermodesulfobacteria* (*Thermodesulfobacterium spp.*) und *Nitrospirae* (*Thermodesulfovibrio spp.*), zu denen weder in dieser Arbeit erhaltene Sequenzen noch Referenzsequenzen aus der ARB-Datenbank fielen.

C.3.5.4. Identifizierung moorspezifischer SRM-Cluster

Unter Anwendung der folgenden Kriterien wurden im Fitch-Baum (Abb. C.11) neun potentielle moorspezifische Cluster identifiziert:

- Ein moorspezifisches Cluster enthält nur Sequenzen, die aus Moorbodenproben bzw. aus maximal einem nicht moorspezifischen Habitat wie Sediment oder Grundwasser isoliert wurden.

- Es enthält Sequenzen aus mindestens drei verschiedenen Moorgebieten. (Dabei zählen auch *dsrB*-Sequenzen, deren entsprechende Banden in Proben mehrerer Untersuchungsgebiete vorhanden waren.)

Um die phylogenetische Stabilität dieser potentiellen Cluster zu überprüfen, wurden sie detaillierter, d.h. mit mehr Referenzsequenzen und mit verschiedenen Kalkulationsmethoden neu berechnet. Dazu wurden die im jeweiligen Cluster enthaltenen Sequenzen weiteren BLAST-Analysen unterzogen (BLASTx und BLASTn) und Treffer unterschiedlicher Sequenzidentitäten in die anschließenden Berechnungen miteinbezogen. Aufgrund ihres hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrades brachten die meisten Sequenzen desselben Clusters auch identische BLAST-Ergebnisse. In den meisten Fällen waren die Suchergebnisse mit der höchsten Sequenzidentität schon im Universalbaum vertreten, es wurden aber auch Treffer mit niedrigeren Identitätswerten berücksichtigt, da sie möglicherweise trotzdem ein potentielles Cluster aufspalten (oder im Gegenteil bestätigen) konnten. Als Außengruppe dienten die sulfatreduzierenden Vertreter aus dem Phylum *Nitrospirae*, *Thermodesulfovibrio spp.*, und für eine bessere Übersichtlichkeit wurden stets auch einige Sequenzen aus verschiedenen Positionen im Universalbaum einbezogen.

Die Berechnung erfolgte mit den Verfahren Fitch, Maximum Likelihood und Maximum Parsimony inklusive 100 Bootstraps, wobei zuerst nur Sequenzen mit einer Länge von mehr als 1.400 bp mit dem Filter „indel_SRP“ verarbeitet wurden und kürzere Sequenzen anschließend in zwei separaten Schritten über die „Quick Add“-Funktion eingefügt wurden: einmal die *dsrA*-Fragmente und einmal die *dsrB*-Fragmente. Hierbei wurde jeweils eine dieser kurzen Sequenzen als zusätzlicher Filter eingesetzt. Basierend auf der Fitch-Topologie wurde ein Consensus-Baum erstellt, in den auch die Bootstrap-Werte aus der MP-Methode übernommen wurden.

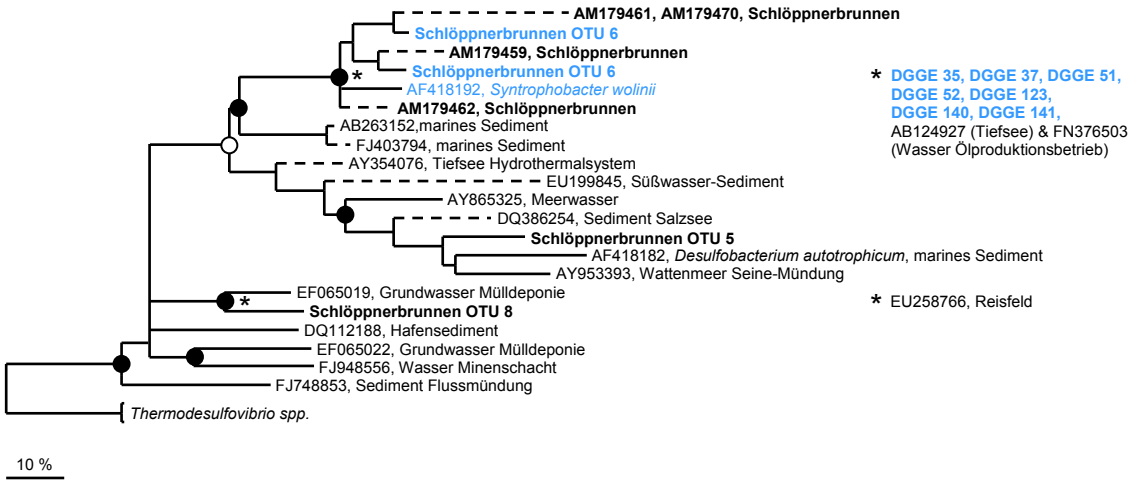


Abb. C.12: Detaillierter Consensus-Baum des Clusters 1. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen (*dsrA*) oder Sternen (*dsrB*) markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus dem ursprünglich definierten Cluster sind blau markiert.

Das potentielle Moorcluster 1 enthielt *Syntrophobacter wolinii* (aus dem anaeroben Tank einer Kläranlage isoliert), die Schlöppnerbrunnen-OTU 6 und die *dsrB*-Sequenzen DGGE 35, 37, 51, 52, 123, 140 und 141, womit insgesamt neun verschiedene DNS-Isolationsquellen und darunter alle in dieser Arbeit untersuchten Moorgebiete bis auf die Feuchtwiese Berndorf vertreten waren. Die meisten der nach der BLAST-Suche hinzugefügten Sequenzen gruppierten sich außerhalb dieses Clusters, zwei jedoch fielen definitiv dazu (Abb. C.12). Eine davon (Accession-Nr. AB124927) stammte aus einem Tiefsee-Hydrothermalsystem vor der Küste Japans (Nakagawa 2004), die andere (FN376503) aus einer Wasserprobe eines Ölproduktionsbetriebes (Studie nicht publiziert). Somit war das Kriterium, dass maximal ein anderes Habitat außer Moorböden vertreten sein darf, im Fall des Clusters 1 nicht erfüllt.

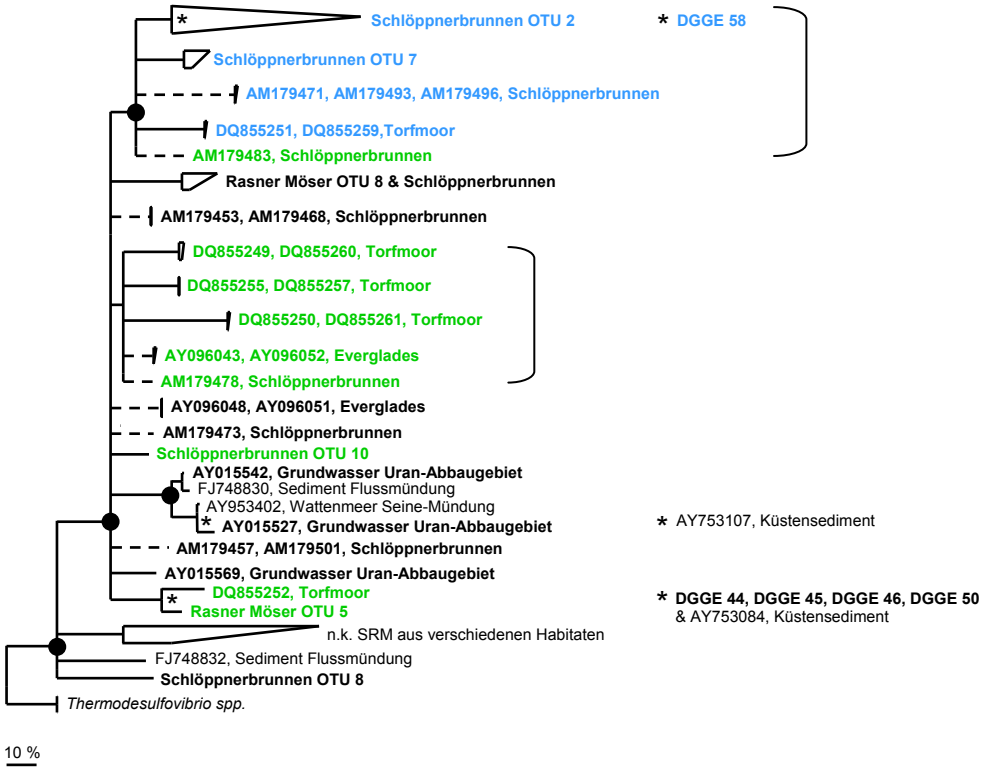


Abb. C.13: Detaillierter Consensus-Baum der Cluster 2 und 3. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen (*dsrA*) oder Sternen (*dsrB*) markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus den ursprünglich definierten Clustern sind blau (Cluster 2) bzw. grün (Cluster 3) markiert. Klammern zeigen bestätigte moorspezifische Cluster.

Abb. C.13 zeigt die Ergebnisse der detaillierten Sequenzanalyse der potentiellen Cluster 2 und 3. Bei ersterem, das die Schlöppnerbrunnen-OTUs 2 und 7 sowie DGGE 58 beinhaltet, handelt es sich tatsächlich um ein reines Moorcluster, das durch einen Bootstrap-Wert von 97 % bestätigt wird. Es enthält keine einzige Sequenz, die aus einer anderen Isolierungsquelle als Moorböden

stammt. Insgesamt sind darin fünf verschiedene Moorhabitate vertreten: das Schlöppnerbrunnen-Moor, ein Torfmoor mit hohem organischen Anteil (Martinez 2007) im US-Bundesstaat New York sowie Krähmoos, Rasner Möser und Schallhof, in deren Proben die DGGE 58 entsprechende Bande detektiert wurde.

In das potentielle Cluster 3 fielen BLAST-Treffer aus insgesamt vier verschiedenen Nicht-Moorhabitaten: Aus dem Grundwasser eines Uran-Abbaugebietes in New Mexico (Chang 2001), aus marinen (Madrid 2006) und Süßwassersedimenten (Studie nicht publiziert) und aus einem Wattenmeer im Mündungsgebiet der Seine (Leloup 2006). Allerdings konnte ein Subcluster ausgemacht werden, das die Kriterien eines reinen Moorclusters erfüllte und neben einer Schlöppnerbrunnen-*dsrA*-Sequenz (AM179478) sechs Sequenzen aus dem New Yorker Torfmoor und zwei aus dem Everglades-Sumpfgebiet (Castro 2002) enthielt.

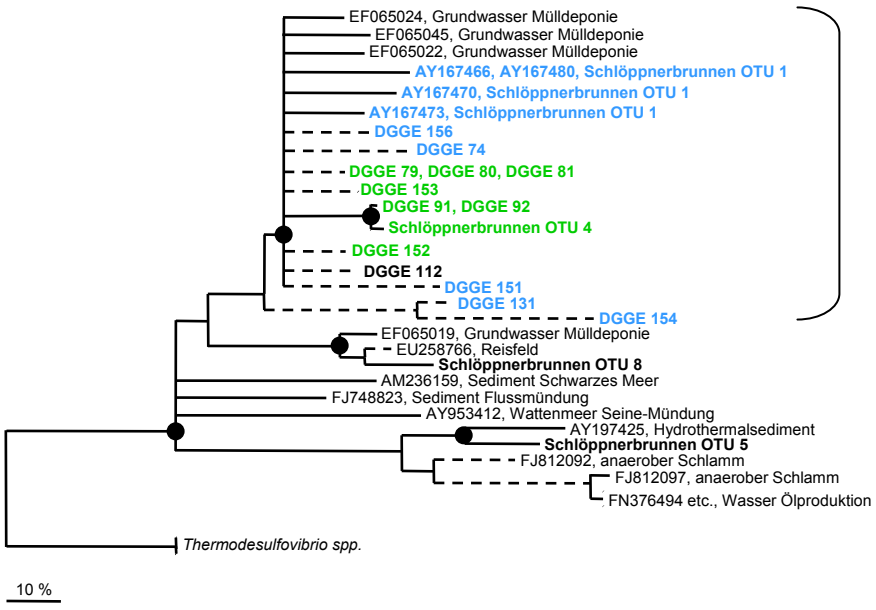


Abb. C.14: Detaillierter Consensus-Baum der Cluster 4 und 5. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. *dsrB*-Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus den ursprünglich definierten Clustern sind blau (Cluster 4) bzw. grün (Cluster 5) markiert. Die Klammer zeigt das bestätigte moorspezifische Cluster.

Die potentiellen Moorcluster 4 und 5 fielen bei der detaillierten Analyse zusammen (Abb. C.14) und bildeten ein gemeinsames Cluster mit einem Bootstrap-Wert von 100 %, das als moorspezifisch bezeichnet werden kann, da außer Moorböden nur ein weiteres Habitat vertreten war, nämlich das Grundwasser einer Mülldeponie in China (Studie nicht publiziert). Insgesamt waren in diesem Cluster Isolate bzw. die entsprechenden DGGE-Banden aus allen Untersuchungsgebieten

dieser Arbeit außer Berndorf vertreten. Die übrigen Sequenzen aus anderen Habitaten, die in die vergleichende Sequenzanalyse einbezogen worden waren, gruppierten sich außerhalb dieses Clusters.

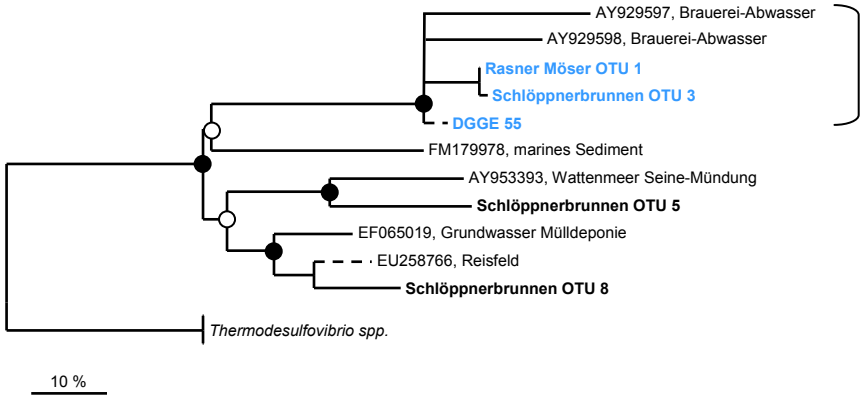


Abb. C.15: Detaillierter Consensus-Baum des Clusters 6. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. *dsrB*-Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus dem ursprünglich definierten Cluster sind blau markiert. Die Klammer zeigt das bestätigte moorspezifische Cluster.

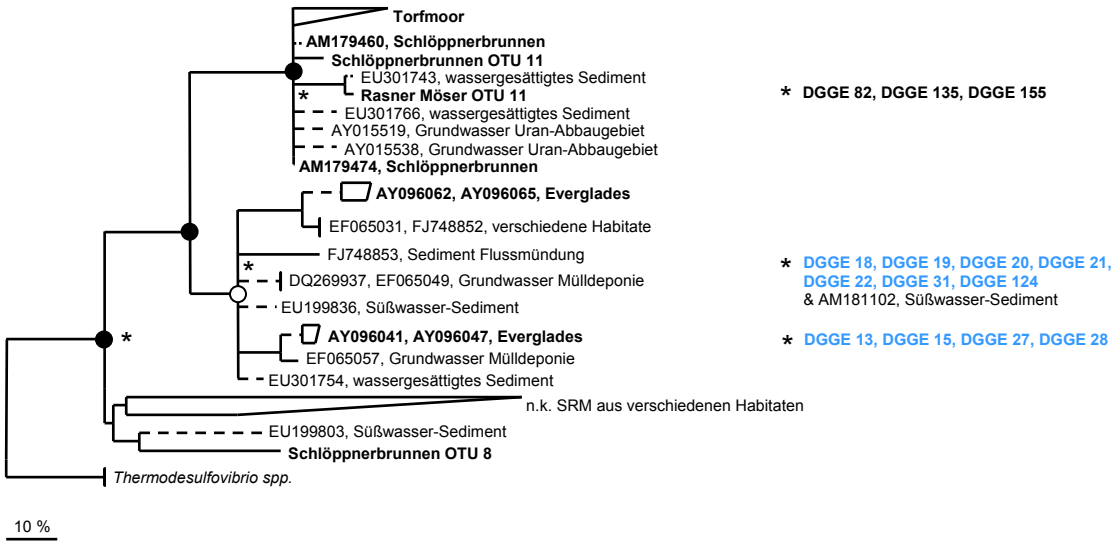


Abb. C.16: Detaillierter Consensus-Baum des Clusters 7. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen (*dsrA*) oder Sternen (*dsrB*) markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus dem ursprünglich definierten Cluster sind blau markiert.

Abb. C.15 zeigt die detaillierte Sequenzanalyse mit den im Cluster 6 enthaltenen Sequenzen der Rasner Möser-OTU 1, der Schlöppnerbrunnen-OTU 3 und DGGE 55, die aufgrund ihrer Proteinsequenzidentität eine einzige gemeinsame OTU ausmachen. Die zu DGGE 55 gehörigen

Banden am DGGE-Gel waren zudem in fast allen untersuchten Moorgebieten (bis auf Berndorf und die Große Heide) präsent. Nach der Einberechnung der BLAST-Treffer fielen zwei Isolate aus einem Bioreaktor mit dem Abwasser einer Brauerei (Studie nicht publiziert) in diese Gruppe; da jedoch keine weiteren Vertreter anderer Habitate dazukamen, kann das Cluster 6, das einen Bootstrap-Wert von 100 % aufweist, als moorspezifisch bezeichnet werden.

Die Cluster 7, 8 und 9 beinhalteten ausschließlich *dsrB*-Sequenzen aus dem DGGE-Experiment, deren entsprechende Banden aber in den meisten der untersuchten Moorgebiete präsent waren.

Das potentielle Moorcluster 7 (Abb. C.16), dessen DGGE-Sequenzen in allen Moorgebieten aus dieser Arbeit bis auf Krähmoos und Schrems nachgewiesen wurden, konnte nach der genaueren Analyse nicht bestätigt werden, da die monophyletische Gruppe von Sequenzen aus anderen Habitaten zerschlagen wurde. Bei diesen handelte es sich unter anderen um Süßwasser-Sedimente (Miletto 2007; Hansel 2008) und Grundwasserproben verschiedener Standorte (Chang 2001).

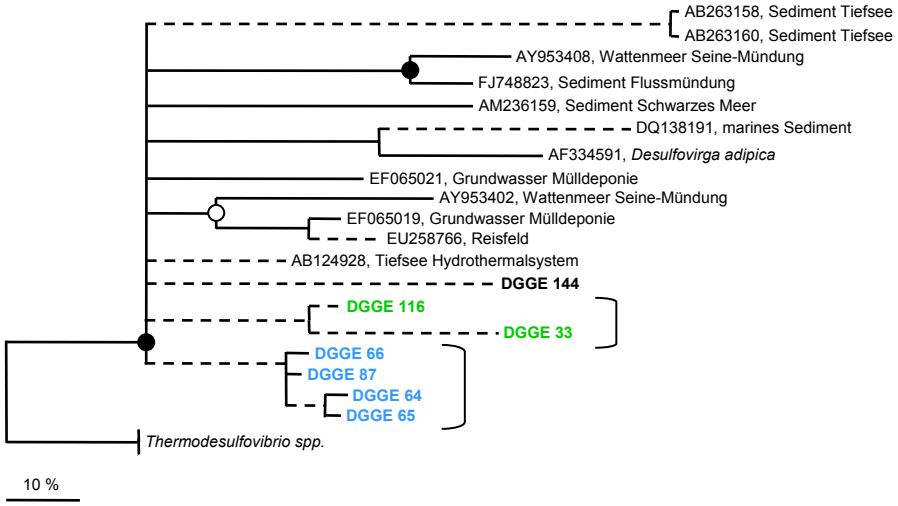


Abb. C.17: Detaillierter Consensus-Baum der Cluster 8 und 9. Die Berechnung erfolgte mit Fitch, ML und MP inklusive 100 Bootstraps, jeweils mit dem Filter indel_SRP. Die Darstellung des Baumes basiert auf der Fitch-Methode. *dsrB*-Teilsequenzen mit einer Länge von weniger als 1.400 bp wurden nachträglich hinzugefügt und sind mit strichlierten Ästen markiert. Bootstrap-Werte sind als weiße (75-90 %) bzw. schwarze (>90 %) Punkte dargestellt. Der Längenstandard definiert einen Unterschied von 10 % in der Proteinsequenzidentität. Aus Moorböden isolierte Klone sind fettgedruckt, bei nicht kultivierten MO ist die Isolierungsquelle angeführt. Sequenzen aus den ursprünglich definierten Clustern sind blau (Cluster 8) bzw. grün (Cluster 9) markiert. Klammern zeigen bestätigte moorspezifische Cluster.

Abb. C.17 zeigt die potentiellen Moorcluster 8 und 9, die beide bestätigt werden konnten. Sie blieben als eigenständige monophyletische Gruppen bestehen, in die keine Sequenzen aus anderen Isolationsquellen außer den in dieser Arbeit analysierten Moorgebieten fielen. DGGE 64, 65, 66 und 87 aus Cluster 8 wiesen entsprechende DGGE-Banden in insgesamt sechs der neun Un-

tersuchungsgebiete auf (Krähmoos, Große Heide, Schlöppnerbrunnen, Rasner Möser, Roßbrand I und Roßbrand II). Im Falle von DGGE 33 konnte nur in Schlöppnerbrunnen-Proben eine korrelierende Bande identifiziert werden, bei DGGE 116 allerdings in Proben aus sechs verschiedenen Mooren (in allen außer Berndorf, Krähmoos und Schrems).

Somit konnten nach der detaillierten Sequenzanalyse sechs moorspezifische SRM-Cluster identifiziert werden: Cluster 2, Cluster 3 (zumindest ein Subcluster darin), Cluster 4 und 5, die eine gemeinsame monophyletische Gruppe bildeten, sowie Cluster 6, 8 und 9.

Tabelle C.3: Identifizierte moorspezifische *dsr*-Cluster

Cluster	enthaltene Sequenzen (*dsrA*/*dsrB*/*dsrAB*)		vertretene Habitate		minimale Proteinsequenz-identität	Bootstrap-Unterstützung [a)]
	aus Mooren	nicht moorspezifisch	Moore	nicht moorspezifische Habitate		
2	18 (4/1/13)	0	5	0	73,4 %	97 %
3 (Subcluster)	9 (3/0/6)	0	3	0	82,5 %	49 %
4 + 5	39 (0/13/26)	3 (0/0/3)	8	1 (Grundwasser Mülldeponie, China)	68,2 %	100 %
6	28 (0/1/27)	2 (0/0/2)	7	1 (Abwasser einer Brauerei)	78,8 %	100 %
8	4 (0/4/0)	0	6	0	92,9 %	-
9	2 (0/2/0)	0	6	0	86,8 %	-

[a)] Bootstrapping erfolgte nur mit *dsrAB*-Vollsequenzen.

D. DISKUSSION

D.1. *dsrA*- und *dsrAB*-Genbanken

D.1.1. Spezifität der Rückwärtsprimer DSR4Rmix und DSRARmix

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die beiden Rückwärtsprimer DSR4Rmix und DSRARmix hinsichtlich der Spezifität der mit ihnen amplifizierbaren DNS-Abschnitte und der Diversität der mit ihnen erfassten sulfatreduzierenden Mikroorganismen zu vergleichen. Dafür wurden mittels PCR und unter Einsatz des Vorwärtsprimers DSR1Fmix die *dsrAB*- (mit DSR4Rmix) bzw. *dsrA*-Genabschnitte (mit DSRARmix) aus der extrahierten genomischen DNS des Untersuchungsgebietes Rasner Möser amplifiziert und für die Erstellung zweier Genbanken verwendet.

Ein Abgleich der Genbanksequenzen mit den Datenbanken des BLAST-Programmes führte zu dem Schluss, dass der Primer DSRARmix keineswegs zur Amplifikation von *dsrA* geeignet ist: Mit ihm konnten im Rahmen dieser Arbeit nur unspezifische Genfragmente erhalten werden. Schon bei einer ersten Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (Abb. C.1) waren außer der erwarteten Bande (*dsrA*-Amplifikate mit einer Länge von ca. 750 bp), die zudem sehr schwach ausfiel, noch mindestens sieben weitere Banden zu erkennen, was auf eine äußerst geringe Spezifität des Primers schließen ließ. Dieser Eindruck wurde dadurch bestätigt, dass von 90 *dsrA*-Klonen nur 11 ein Insert der richtigen Länge enthielten und dass keine einzige dieser Sequenzen bei der BLAST-Analyse (weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäurenbasis) eine phylogenetische Ähnlichkeit zu bekannten *dsr*-Genen aufwies.
Als Grund für die erfolglosen Amplifikationsversuche kann die Annahme, dass in den extrahierten DNS-Lösungen keine *dsrAB*-Gene vorhanden waren, ausgeschlossen werden, weil unter Verwendung des Primerpaares DSR1Fmix-DSR4Rmix aus diesen Proben sehr wohl PCR-Produkte erhalten wurden.
Bevor der Primer DSRARmix für weitere Experimente verwendet wird, sollten dringend seine Komponenten (DSRARa-f) hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz überarbeitet bzw. neue Varianten zu der bestehenden Mischung hinzugefügt werden.

Im Gegensatz zu DSRARmix wurden mit dem Primer DSR4Rmix zufriedenstellende Ergebnisse erzielt, sowohl was die Spezifität der amplifizierten DNS-Abschnitte betraf, als auch im Hinblick auf die Diversität der erhaltenen Sequenzen. Die ca. 1.900 bp langen *dsrAB*-PCR-Produkte er-

zeugten eine intensive Bande auf dem Agarosegel und es waren nur wenige schwache Banden von unspezifischen Produkten zu erkennen, was auf eine sehr gute Amplifikationseffizienz der *dsrAB*-Genabschnitte hinweist. 66,1 % der *dsrAB*-Genbank-Sequenzen erwiesen sich bei der BLAST-Analyse als *dsr*-spezifisch. Dieser Wert ist zwar nicht optimal, aber vergleichbar mit bisherigen Studienergebnissen an *dsrAB*-Genbanken (Loy 2004), bei denen die Spezifität ebenfalls nicht mehr als 70 % betrug. Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Primerkombination DSR1Fmix-DSR4Rmix für die Amplifikation von *dsrAB* aus genomischen DNS-Lösungen gut geeignet ist.

D.1.2. Diversität und Phylogenie der *dsrAB*-Genbank-Sequenzen

Die 36 aus der Genbank erhaltenen *dsrAB*-Sequenzen wurden in 12 OTUs mit mindestens 90 % Aminosäurenidentität gruppiert, wobei OTU 1 mit 20 Sequenzen die bei weitem umfangreichste war. Im Gegensatz dazu enthielten acht OTUs jeweils nur eine Sequenz. Der für diese Genbank berechnete Erfassungsgrad betrug 77,8 %, was bedeutet, dass bei einer Vergrößerung des Stichprobenumfanges mit hoher Wahrscheinlichkeit noch weitere Sequenzen bzw. OTUs gefunden werden könnten. Allerdings muss beachtet werden, dass eine Genbank nie die exakte mikrobielle Zusammensetzung und Diversität einer Umweltprobe repräsentieren kann, da sämtliche Arbeitsschritte, die für ihre Erstellung nötig sind (DNS-Extraktion, PCR, Klonierung, Auswahl rekombinanter Klone), selektiv und anfällig für statistische Verzerrungen sind (von Wintzingerode 1997; Polz 1998; Frostegard 1999; Acinas 2005; Park 2005; Lakay 2007).

Um Aufschluss über die phylogenetische Position der Rasner Möser Genbank-OTUs innerhalb der Gilde der SRM zu erhalten, wurde eine vergleichende Sequenzanalyse auf Aminosäurenbasis durchgeführt. Auf diese Weise sollte zudem untersucht werden, inwiefern eine Verwandtschaft zu bereits bekannten SRM-OTUs aus dem Schlöpperbrunnen-Moor (Loy 2004) besteht, denn laut BLAST-Analyse handelte es sich bei den nächsten Verwandten von insgesamt 18 Genbank-Sequenzen um Klone aus ebendiesem Habitat.
In der Tat zeigte sich in drei Fällen eine große Ähnlichkeit zwischen OTUs aus den beiden Moorgebieten, insbesondere zwischen Rasner Möser-OTU 1 und Schlöppnerbrunnen-OTU 3, die mit Ausnahme einer einzigen Sequenz eine gemeinsame OTU bildeten. Dies ist auch deshalb interessant, weil in der OTU 1 mehr als die Hälfte der *dsrAB*-Genbank-Sequenzen enthalten sind.
Fünf Schlöppnerbrunnen-OTUs waren in ihrer phylogenetischen Position deutlich von den in dieser Arbeit identifizierten OTUs isoliert und befanden sich innerhalb der Klasse der *Deltaproteobacteri*a.

Die Hälfte der Rasner Möser-OTUs fiel in das Phylum der gram-positiven und Endosporen bildenden *Firmicutes* (das allerdings keine der 11 Schlöppnerbrunnen-OTUs beinhaltet), die übrigen sechs konnten mit keinem der verfügbaren klassifizierten Referenzorganismen und somit mit keiner bestimmten Gruppe von SRM in Verbindung gebracht werden. Von sechs bisher bekannten mikrobiellen Phyla mit sulfatreduzierenden Vertretern (*Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota*) konnten somit nur einem Sequenzen der *dsrAB*-Genbank zugeordnet werden. Allerdings wurden in keiner bis dato publizierten Studie über *dsr*-Gene in Süßwasser-Feuchtgebieten nähere Verwandte der *Archaea* und *Thermodesulfobacteria* und nur ein einziger Umweltklon (GenBank Accession-Nr. FJ808970), der zu den *Nitrospirae* fällt, identifiziert. Hier wird die Tatsache bemerkbar, dass die Erforschung der SRM lange Zeit auf den 16S rRNS-Genen basierte und erst in den letzten Jahren auf Ebene der *dsrAB*-Gene betrieben wird (Karkhoff-Schweizer 1995; Wagner 1998).

Innerhalb der *Firmicutes*, die sechs Rasner Möser-OTUs beinhaltete, fand sich zwar keine der elf Schlöppnerbrunnen-OTUs, jedoch sehr wohl *dsrA*-Teilsequenzen aus einer anderen Studie über dieses Moorgebiet (Schmalenberger 2007), was bedeutet, dass sämtliche OTUs der in dieser Arbeit erstellten *dsrAB*-Genbank in einem engen phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnis mit Sequenzen aus dem Schlöppnerbrunnen-Moor stehen. Die größte Divergenz zu Schlöppnerbrunnen-Sequenzen zeigten dabei die Rasner Möser-OTUs 4 und 12, doch selbst diese befanden sich in derselben oben erwähnten monophyletischen Gruppe innerhalb der *Firmicutes*.

D.2. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Diversität und Phylogenie sulfatreduzierender Mikroorganismen in Moorböden wurde in dieser Arbeit die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese verwendet, eine Nachweismethode, mit der auch Organismen erfasst werden können, die nur ein Prozent der Gesamtpopulation in einer Probe ausmachen (Muyzer 1993). Um Aussagen über die Zusammensetzung und Homogenität der Lebensgemeinschaften innerhalb ein- und desselben Moorgebietes treffen zu können, wurden von jedem Untersuchungsgebiet drei Subproben aus verschiedenen Entnahmestellen analysiert.

Analog zu den Genbanken muss auch hier festgehalten werden, dass die Diversität und Abundanz der mittels DGGE identifizierten Mikroorganismen keineswegs hunderprozentig den Verhältnissen in den Umweltproben entsprechen können, da jeder durchgeführte Arbeitsschritt Einschränkungen und Verzerrungen der Ergebnisse mit sich bringen kann. Besonders bei der Ampli-

fikation der *dsrB*-Fragmente handelt es sich um eine potentiell selektive Reaktion, weil die sterischen Eigenschaften der in diesem Schritt eingeführten GC-Clamp die Sensitivität der PCR vermindern können (Vanbroekhoven 2004).

D.2.1. Amplifikation der *dsrB*-Genfragmente

Über ein „Nested PCR"-Verfahren wurden aus der genomischen DNS zuerst die *dsrAB*-Gene amplifiziert, wobei die *Taq*-Polymerase erst bei einer Temperatur von 95°C zum PCR-Ansatz zugegeben und die Annealing-Temperatur in den ersten zehn Zyklen von 58°C auf 48°C abgesenkt wurde. Erst aus den aufgereinigten *dsrAB*-PCR-Produkten wurden die für die DGGE benötigten *dsrB*-Genabschnitte amplifiziert. Diese Vorgehensweise war erforderlich um eine maximale Ausbeute an *dsrB*-Fragmenten zu erhalten. SRM machen generell weniger als 5 % der gesamten mikrobiellen Population in verschiedenen Habitaten aus (Devereux 1996; Scheid 2001). In Kombination mit der extrem hohen Diversität, wie sie in Böden und Sedimenten üblich ist, besteht die Gefahr, dass die relative Abundanz der Mikroorganismen unter dem Detektionslimit der PCR liegt und somit die natürliche Vielfalt in der Umweltprobe signifikant unterschätzt wird. In einer vorangegangenen Studie (Miletto 2007) wurde zudem gezeigt, dass durch den „Nested PCR"-Ansatz die Zahl der DGGE-Banden im Vergleich zu einer direkten Amplifikation deutlich erhöht werden kann.
Trotz dieses optimierten Amplifikationsverfahrens war die Ausbeute an *dsrB*-Produkten äußerst gering, so dass für die DGGE extrem hohe Probenmengen (bis zu 500 µl PCR-Produkt) eingesetzt werden mussten um sichtbare Banden zu erhalten. SRM scheinen also in den untersuchten Moorböden wirklich nur einen kleinen Anteil der mikrobiellen Population zu stellen.

D.2.2. Auswertung der DGGE-Bandenmuster

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der SRM-Lebensgemeinschaften innerhalb eines Moorgebietes relativ homogen ist, da sich die einzelnen Subproben jeweils kaum in ihrem Bandenmuster unterschieden. Bei allen untersuchten Gebieten lag die Ähnlichkeit der drei Probenahmestellen über 80 %, bei mehr als der Hälfte über 90 % und in drei Fällen waren sich die einzelnen Subproben ihr Bandenmuster betreffend sogar zu 100 % ähnlich. Nur bei dem Niedermoor Roßbrand II unterschied sich eine der Proben signifikant von den beiden anderen. Allerdings muss beachtet werden, dass aus dieser Probe auch deutlich weniger *dsr*B-Amplifikate erhalten worden waren als aus den anderen beiden. Es wäre also durchaus möglich, dass die Ähnlichkeit dieser drei Subproben wegen der zu niedrigen Menge an Probenmaterial aus

der einen Entnahmestelle unterschätzt wurde und dass sich bei einer größeren eingesetzten Menge doch sehr ähnliche Bandenmuster herausstellen würden. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass sich die betreffende Subprobe C auch in ihrem pH-Wert (5,8) und ihrer Sulfatkonzentration (9,2 mg/l) deutlich von den beiden anderen (pH 4,4 bzw. 4,5 und Sulfatkonzentration 3,7 mg/l) unterschied. Das Moorgebiet Roßbrand II scheint also tatsächlich ein eher heterogenes Habitat zu sein, sowohl was die abiotischen Faktoren als auch die Biodiversität potentiell sulfatreduzierender Mikroorganismen an verschiedenen Standorten angeht.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Moortypen unterschieden sich deutlich in der Anzahl ihrer DGGE-Banden. Während bei Proben aus Niedermooren mindestens 15 und sogar bis über 20 Banden erhalten wurden, waren es bei Proben aus den drei Hochmooren höchstens zehn und im Falle der Feuchtwiese Berndorf sogar nur vier Banden. Weder pH-Wert und Sulfatkonzentration der Untersuchungsstandorte noch ihre geografische Lage ließen sich in eine eindeutige Verbindung mit der Anzahl der DGGE-Banden bringen. Es kann also angenommen werden, dass der Typus des Habitates der wichtigste Faktor für die mikrobielle Biodiversität in Moorböden ist, wobei Niedermoore gefolgt von Hochmooren die größte Vielfalt an SRM-Arten aufweisen und Feuchtwiesen die geringste. Niedermoore, die vom Grundwasser versorgt werden, sind generell nährstoffreicher und weniger sauer als die regenwassergespeisten Hochmoore, was ein Grund für ihre höhere mikrobielle und pflanzliche Artenvielfalt sein kann. Allerdings sind in der Regel in Feuchtwiesen größere Nährstoffkonzentrationen und mehr verschiedene Pflanzenarten vorhanden als in Hochmooren (Gorham 1985; Ellenberg 1996; Fisk 2003), so dass man in ihnen auch eine größere mikrobielle Biodiversität erwarten würde.
Im Zusammenhang mit dieser Behauptung muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Anzahl der DGGE-Banden zwar ein Maß für die Diversität in einer Probe ist, aber keineswegs jede Bande genau einem Mikroorganismus entspricht. Die tatsächliche Vielfalt kann sowohl über- als auch unterschätzt werden. Eine Bande kann zwei oder mehr verschiedene Sequenzen repräsentieren, wenn diese aufgrund ihres GC-Gehaltes denselben Schmelzpunkt haben. Andererseits kann ein und derselbe Organismus mehr als eine Bande verursachen, wenn die Sequenz seiner *dsrB*-Gene z.B. aufgrund von Punktmutationen (Insertionen, Deletionen, Substitutionen) verändert wurde. Diese Modifikationen können u.a. während eines PCR-Schrittes passieren, wenn die Polymerase ein falsches Nukleotid mit einem DNS-Strang verbindet. Eine weitere Ursache für solche Sequenzunterschiede innerhalb desselben Organismus kann die Verwendung mehrerer verschiedener Primervarianten sein, so wie es in dieser Arbeit der Fall war.

In begrenztem Maße kann auch die geografische Distanz zwischen zwei Habitaten als Faktor für die Ähnlichkeit ihrer Bandenmuster angesehen werden. In zwei Fällen (Roßbrand I und II sowie Krähmoos und Rasner Möser) konnte beobachtet werden, dass die jeweils am nächsten zueinander gelegenen Moorgebiete auch die ähnlichsten Bandenmuster aufwiesen. Die anderen Untersuchungsgebiete, die sich in geringer räumlicher Distanz voneinander befanden (Schallhof und Berndorf im südlichen Niederösterreich sowie Schrems und Große Heide im Waldviertel), zeigten jedoch keine besonders ähnlichen Bandenmuster. Mehrere Studien unterstützen die Behauptung, dass geografische Distanzen keinen gewichtigen Einfluss auf die Biodiversität von Bodenbakterien haben (Mantel 1967; Kuske 2002; Horner-Devine 2004b). In anderen Untersuchungen mit Bodenproben wurde hingegen eine solche Korrelation festgestellt (Staddon 1998; Cho 2000; Schwalbach 2005), ebenso in aquatischen Lebensräumen wie Seen (Reche 2005; Yannarell 2005).
Weitere Faktoren, die sich auf die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften an verschiedenen Standorten auswirken können, sind Gewässertiefe (Ovreas 1997; Garcia-Martinez 2000; Pinhassi 2003), Salzgehalt im Wasser (Casamayor 2002; Crump 2004) und Vegetationsform bzw. Ausmaß der Kultivierung einer Landschaft (McArthur 1988; Buckley 2003).

Obwohl die statistische Analyse der Bandenmuster (Abb. C.8 und C.9) keinen eindeutigen Unterschied zwischen Hoch- und Niedermooren erkennen ließ, wurde bei einer probeweisen Berechnung während der Erstellung der Presence-Absence-Matrix, die zu jenem Zeitpunkt erst 41 der schließlich 48 Banden umfasste, eine gegenteilige Beobachtung gemacht: In der Ähnlichkeitsanalyse nach Bray-Curtis bildeten die Niedermoore im Baumdiagramm ein eigenständiges monophyletisches Cluster neben den Hochmooren (Abb. F.1 im Anhang). Diese Gruppierung war aufgrund der Kürze des sie definierenden Astes zwar nicht besonders signifikant, gab aber einen Hinweis darauf, dass der Moortyp doch einen gewissen Einfluss auf das DGGE-Bandenmuster der einzelnen Proben hat: Tendenziell zeigen Proben aus demselben Moortypus in der Zusammensetzung ihrer SRM-Lebensgemeinschaften eine größere Ähnlichkeit zueinander als zu Proben aus einem anderen Habitat. 29 dieser 41 Banden (70,7 %) waren moortypspezifisch, also nur in Proben eines einzigen Moortyps präsent, 21 Banden (51,2 %) waren sogar standortspezifisch, d.h. sie wurden jeweils nur in einem bestimmten Moorgebiet detektiert. Die entsprechenden Mikroorganismen sind phylogenetisch sehr divers und fallen in verschiedene Gruppen innerhalb des *dsrAB*-Stammbaumes.
Die Mikroorganismen, die von den sieben ausgenommenen Banden (42 - 48) repräsentiert werden, fanden sich mit einer Ausnahme (Bande 44, hier lag keine *dsrB*-Sequenz vor) in der monophyletischen Gruppe, die aus den moorspezifischen Clustern 4 und 5 gebildet wird. Fünf von

ihnen wurden jeweils nur in einem Moortyp identifiziert, während die übrigen beiden (Bande 44 und 48) sowohl in Hoch- als auch in Niedermooren nachgewiesen wurden.

Diese These, dass der Moortypus in Relation mit dem DGGE-Bandenmuster steht, wird dadurch unterstützt, dass ein extremer Unterschied (mehr als 80 %) zwischen der Feuchtwiese Berndorf und den Hoch- und Niedermooren erkennbar war, was die Anzahl und Position ihrer DGGE-Banden betraf. Die Sonderstellung dieses Habitates wird auch dadurch betont, dass es den höchsten pH-Wert (7,6) und die bei weitem höchste Sulfatkonzentration (11,2 mg/l) unter allen untersuchten Moorgebieten hatte.

In einer vorangegangenen Studie zur Biogeografie von Bodenbakterien (Fierer 2005) wurde postuliert, dass der pH-Wert ein optimales Maß für die Einschätzung der Anzahl und Diversität von Mikroorganismen in Bodenproben sei. Demnach gäbe es in leicht basischen Lebensräumen die größte und in sauren Habitaten die geringste Vielfalt. Diese These wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keineswegs bestätigt, sondern eher widerlegt, da jenes Moorgebiet mit dem höchsten pH-Wert (Berndorf) zugleich die deutlich wenigsten DGGE-Banden aufwies.

D.2.3. Reamplifikation und Sequenzierung der *dsrB*-Genfragmente

Um weitere Analysen zur Diversität und Phylogenie von SRM in den untersuchten Moorgebieten durchführen zu können, wurden die DGGE-Banden bzw. die *dsrB*-Genfragmente aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Zwar konnten alle Isolate reamplifiziert werden, die Sequenzierung war aber nur in 60 von 160 Fällen erfolgreich. Diese Tatsache ist ein bekanntes Problem bei der Methode der DGGE (Füreder 2005) und kann mehrere Gründe haben. Einerseits können Nebenprodukte (z.B. aus der vorangegangenen PCR) die Sequenzierung stören, andererseits kann, wie bereits zuvor erwähnt, eine Bande mehrere verschiedene Sequenzen mit demselben Schmelzpunkt beinhalten, deren Überlagerung dann im Chromatogramm sichtbar wird und ein Korrekturlesen unmöglich macht (Muyzer 1993). Um Beeinträchtigungen dieser Art zu minimieren und eine möglichst vollständige Auftrennung zu erreichen, wurde deshalb der breite denaturierende Gradient von 30 bis 80 % gewählt. Abhilfe könnte auch ein zweiter DGGE-Durchlauf schaffen, bei dem die isolierten *dsrB*-Amplifikate über einen enger gewählten Gradienten erneut aufgetrennt und dann erst sequenziert werden. Diese Vorgehensweise wäre aber bei einer so großen Anzahl an Proben (160 ausgeschnittene Banden) äußerst aufwendig und nur schwer durchführbar.

Speziell in dieser Arbeit ergab sich eine zusätzliche Quelle für Verunreinigungen: Da die Ausbeute an *dsrB*-PCR-Produkten so gering war, musste eine verhältnismäßig große Probenmenge von mehreren hundert µl eingesetzt und zuvor auf ein Volumen von rund 50 µl konzentriert werden. Dies geschah in einer beheizten Vakuumzentrifuge, in der die Proben in geöffneten Reaktionsgefäßen für bis zu 30 min verblieben. In dieser Zeit konnten Kontaminanten aus der Luft in die DNS-Lösungen gelangen, die dann zwar nicht die DGGE selbst beeinträchtigten, aber sehr wohl gemeinsam mit den Banden aus dem Gel isoliert und in der nachfolgenden PCR mitamplifiziert werden konnten. Eine Alternative zur Vakuumzentrifugation, nämlich die Konzentration über ein Aufreinigungskit, wurde probiert, aber wieder verworfen, da diese Methode mit relativ großen DNS-Mengenverlusten verbunden ist und angesichts der ohnehin schon geringen Konzentration der PCR-Produkte unpraktikabel war.

Nach der Isolierung der Banden aus den DGGE-Gelen und der Reamplifikation und Sequenzierung der enthaltenen DNS lagen schließlich 56 *dsrB*-Sequenzen vor (vier davon in Duplikaten), die eine ausreichend gute Qualität für phylogenetische Verwandtschaftsanalysen aufwiesen. Mit dieser Anzahl war durchaus ein zufriedenstellender Prozentsatz aller vorhandenen Banden abgedeckt, zumal 48 verschiedene Banden auf den Gelfotos identifiziert worden waren und nur wenige weitere aufgrund ihrer geringen Intensität nicht berücksichtigt worden waren.

D.2.4. Vergleichende Sequenzanalyse

D.2.4.1. Phylogenetische Analysen mit *dsrB*

Um Aufschluss über die Identität und Phylogenie der mittels DGGE detektierten Mikroorganismen zu erhalten, wurden die aus den Gelen isolierten und sequenzierten *dsrB*-Genfragmente für phylogenetische Verwandtschaftsanalysen eingesetzt. Eine mögliche Einschränkung birgt dabei die geringe Länge der *dsrB*-Amplifikate (rund 300 bp), so dass es beim Vergleich mit *dsrAB*-Vollsequenzen (1.900 bp) zu einer Verzerrung des Ergebnisses kommen kann. Um diesem Problem entgegenzuwirken wurde jedes Mal, wenn kurze Sequenzen in ein bestehendes Baumdiagramm eingefügt wurden, eine von ihnen als zusätzlicher Berechnungsfilter verwendet.
Eine Fragestellung dieser Arbeit war es, ob SRM nachgewiesen werden können, die ubiquitär verbreitet sind, also in allen untersuchten Moorhabitaten vorkommen. Dies war zwar nicht der Fall, aber zwei DGGE-Banden waren in Proben aus immerhin sieben der neun Moorgebiete präsent. Bei den ihnen zugehörigen Mikroorganismen handelte es sich um Vertreter der *Syntrophobacterales* (*Deltaproteobacteria*) und *Firmicutes*. Bei der vergleichenden Sequenzanalyse der *dsrB*-Gene mit be-

reits bekannten Schlöppnerbrunnen-OTUs stellte sich heraus, dass auch die Schlöppnerbrunnen-OTU 1, 3 und 6 weit verbreitete SRM-Gruppen sind, denn nah verwandte *dsrB*-Sequenzen von ihnen wurden in sieben bzw. acht der untersuchten Moorgebiete gefunden.
Die Tatsache, dass die deutliche Mehrheit der DGGE-Banden nur in Proben aus einem einzigen Untersuchungsgebiet vorhanden war, legt allerdings die Vermutung nahe, dass SRM generell eher standortspezifische Organismen sind, die nicht zu einer weiten geografischen Ausbreitung neigen. Darauf weist auch der Umstand hin, dass bei den Schlöppnerbrunnen-OTUs 5, 7, 8, 9 und 10 kein engeres Verwandtschaftsverhältnis mit *dsrB*-Sequenzen aus dem DGGE-Verfahren und damit zu Mikroorganismen eines anderen Moorgebietes nachgewiesen wurde. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass verwandte SRM dieser OTUs sehr wohl in Bodenproben aus anderen untersuchten Mooren vorhanden waren, sie aufgrund ihrer geringen Abundanz aber unter dem Detektionslimit der DGGE lagen.

Von 17 *dsrB*-Sequenzen, deren korrespondierende DGGE-Banden in Proben aus dem Schlöppnerbrunnen-Moor auszumachen waren, ergab sich nur bei sechs eine Aminosäurenidentität von mindestens 89 % zu einer der bekannten OTUs aus diesem Untersuchungsgebiet, was bedeutet, dass die übrigen elf (DGGE 13, 28, 31, 33, 40, 44, 45, 46, 50, 66 und 116) Mitglieder neuartiger und bis dato noch nicht beschriebener Schlöppnerbrunnen-OTUs sind, deren Anzahl aufgrund durchgeführter Sequenzanalysen auf mindestens fünf festgelegt werden kann. Analog dazu wurden auf Basis der *dsrB*-Sequenzen mindestens neun zusätzliche Rasner Möser-OTUs (bestehend aus DGGE 35, 45, 51, 52, 58, 66, 81, 87, 91, 112, 116 und 124) entdeckt.

Etwa die Hälfte der bei der DGGE erhaltenen Sequenzen fiel in monophyletische Cluster, aus denen bis jetzt noch kein Vertreter in Moorgebieten nachgewiesen worden war. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Moore ein Lebensraum für mehr verschiedene Familien von SRM sind, als bisher bekannt war. Die andere Hälfte der Sequenzen ließ sich Gruppen mit SRM zuordnen, deren Vorkommen in Moorböden in Florida (Castro 2002), New York (Martinez 2007) und Deutschland (Loy 2004; Schmalenberger 2007) bereits bestätigt worden war.

Die Identität der DGGE-Banden bzw. ihrer zugehörigen Mikroorganismen konnte in den meisten Fällen nicht einmal auf der Ebene des Phylums geklärt werden, weil entsprechende klassifizierte Referenzorganismen fehlten. Mehrere *dsrB*-Sequenzen ließen sich zwar zweifellos den *Firmicutes* und *Deltaproteobacteria* zuordnen, aber die übrigen könnten möglicherweise zu Phyla gehören, die bisher noch gar nicht dafür bekannt sind, dass sie Vertreter mit DSR-Genen beinhalten. Mitglieder dieser Organismengruppe finden sich nachweislich innerhalb der *Firmicutes*, *Pro-*

teobacteria, *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria*, *Eury-* und *Crenarchaeota*, aber weder in bislang publizierten Studien noch in dieser Arbeit wurden *dsr*-Sequenzen aus Umweltproben erhalten, die eindeutig in eines der vier letztgenannten Phyla fallen. Das liegt sicherlich zum Teil daran, dass SRM im Gegensatz zu manchen anderen Mikroorganismen verhältnismäßig wenig erforscht sind (vor allem auf der Ebene der *dsrAB*-Gene), kann aber auch ein Hinweis auf eine so geringe Abundanz der sulfatreduzierenden *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria* und *Archaea* sein, dass sie unter dem Detektionslimit gängiger Nachweismethoden liegt.
Die Sonderstellung der Feuchtwiese Berndorf als einziger Vertreter dieses Moortypes wurde bereits in Abschnitt D.2.2. erwähnt und auch durch die vergleichende Sequenzanalyse auf *dsrB*-Basis bestätigt: Die beiden nach der DGGE aus Berndorf-Proben isolierten Sequenzen fielen in ein gemeinsames Cluster (potentielles Moorcluster 7), was die äußerst geringe Diversität sulfatreduzierender Mikroorganismen in der Feuchtwiese unterstreicht.

D.2.4.2. Identifizierung moorspezifischer SRM-Cluster

In dem phylogenetischen Baumdiagramm (Abb. C.11), das alle bisher publizierten *dsr*-Fragmente aus Süßwasser-Feuchtgebieten, die aus der Genbank und der DGGE erhaltenen Sequenzen sowie deren nächste Verwandte (laut BLAST-Analyse) umfasste, wurden potentielle moorspezifische Cluster identifiziert, die Sequenzen aus mindestens drei verschiedenen Moorgebieten und höchstens einem anderen Habitat enthielten. Um sie auf ihre Stabilität hin zu überprüfen, wurden sie einer genaueren phylogenetischen Berechnung unterzogen. Dafür wurde zuerst eine BLAST-Suche durchgeführt um mehr Referenzorganismen in die Kalkulation aufnehmen zu können. Ein Cluster galt schließlich als bestätigt, wenn nach dieser detaillierten Analyse noch immer maximal ein Nicht-Moorgebiet darin vertreten war.

Von neun potentiellen moorspezifischen Clustern erwiesen sich sechs als stabil. Solche Cluster sind dahingehend interessant, dass die betreffenden, *dsrAB* besitzenden Mikroorganismen vermutlich spezielle Anpassungen an den Lebensraum Moor entwickelt haben und dort eine wichtige ökologische Rolle spielen. Durch die Konkurrenz mit methanproduzierenden Mikroorganismen um Nährstoffe, wobei sie bei ausreichenden Sulfatkonzentrationen gewöhnlich überlegen sind, können sie einen bedeutenden Einfluss auf den CH_4-Ausstoß und das gesamte Klima haben (Gauci 2004; Muyzer 2008).

Besonders interessant sind die Cluster 8 und 9, die nur aus *dsrB*-Sequenzen aus dieser Arbeit bestehen und im Stammbaum deutlich isolierte Positionen ohne nähere Verwandtschaft zu anderen

dsr-Genen einnehmen. Bei ihnen scheint es sich um eigenständige, bisher noch nicht bekannte Gruppen innerhalb der SRM zu handeln, deren Vertreter außerdem weit verbreitet sind (entsprechende DGGE-Banden wurden in sechs verschiedenen Moorgebieten identifiziert). Die umfangreichste und deswegen vielleicht auch wichtigste moorspezifische SRM-Gruppe besteht aus den Clustern 4 und 5. Sie enthält insgesamt 21 *dsrAB*-Voll- und Teilsequenzen aus acht Hoch- und Niedermooren, nur die Feuchtwiese Berndorf ist darin nicht vertreten.

Die identifizierten SRM-Moorcluster sind naturgemäß nur eine Wiedergabe des gegenwärtigen Forschungsstandes. Es wird sich zeigen, ob sie auch dann noch erhalten bleiben, wenn in Zukunft weitere *dsrAB*-Sequenzen publiziert und in die Analysen einbezogen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die dissimilatorische (Bi-)Sulfitreduktase (DSR), deren Untereinheiten von den Genen *dsrA* und *dsrB* kodiert werden, katalysiert die Reduktion von (Bi-)Sulfit zu Sulfid, den terminalen Stoffwechselschritt während der dissimilatorischen Sulfat- bzw. Sulfitreduktion. Dieser anaerobe Prozess kann ausschließlich von der phylogenetisch äußerst heterogenen Gruppe der sulfat- bzw. sulfitreduzierenden Mikroorganismen (SRM) zur Energiegewinnung genützt werden. Erst seit kurzem ist bekannt, dass einige syntrophe Anaerobier ebenfalls Träger der DSR-kodierenden Gene sind. Ihre Verwandtschaft mit SRM legt nahe, dass sie ursprünglich SRM waren und die Fähigkeit zur Sulfat- bzw. Sulfitreduktion in evolutionärer Anpassung an das Leben in Umgebungen mit geringen Sulfat- oder Sulfitvorkommen verloren haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Diversität und Biogeografie *dsrAB*-tragender Mikroorganismen in neun mitteleuropäischen Moorgebieten untersucht. Zu diesem Zweck wurde einerseits von einem ausgewählten Moorstandort eine *dsrAB*-Genbank angelegt und andererseits die Methode der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) angewendet um die *dsrB*-Diversität an allen Standorten zu bestimmen. Die phylogenetische Einordnung der *dsrAB*-Klone und *dsrB*-DGGE-Banden erfolgte durch vergleichende Sequenzanalysen.

Aus statistischen und phylogenetischen Vergleichen der DGGE-Bandenmuster ging hervor, dass sich verschiedene Typen von Mooren in ihrer *dsrB*-Diversität unterscheiden. Während sich Niedermoore, gefolgt von Hochmooren, als die vielfältigsten Habitate erwiesen, kennzeichnete die Feuchtwiese eine äußerst geringe *dsrB*-Diversität. Auch die Ähnlichkeit der Bandenmuster war tendenziell am größten, wenn die betreffenden Proben aus demselben Moortyp stammten. Neben mehreren moortyp- (43) und sogar standortspezifischen (35) *dsrB*-Sequenzen wurden auch weit verbreitete *dsrB*-Entwicklungslinien identifiziert, die in bis zu sieben der neun untersuchten Moorgebiete präsent waren.

Mittels umfassender vergleichender *dsrAB*- bzw. *dsrB*-Sequenzanalyse und unter Einbeziehung sämtlicher bis dato publizierter *dsr*-Sequenzen aus Süßwasser-Feuchtgebieten wurden zudem sechs moorspezifische *dsr*-Cluster identifiziert. Diese monophyletischen Gruppen enthielten fast ausschließlich Sequenzen, die aus Moorböden isoliert worden waren. Es ist daher anzunehmen, dass die ihnen entsprechenden Mikroorganismen besondere physiologische Anpassungen an diesen Lebensraum entwickelt haben.

Aus den untersuchten Proben gewonnene *dsrAB*- bzw. *dsrB*-Sequenzen konnten unter anderen den bakteriellen Phyla *Firmicutes* und *Proteobacteria* zugeordnet werden. Die meisten Sequenzen repräsentierten völlig neuartige *dsrAB*-Entwicklungslinien, die keine nähere Verwandtschaft zu bisher kultivierten SRM aufwiesen.

Die ausgesprochen große phylogenetische Diversität von *dsrAB*-tragenden Mikroorganismen und die Dominanz der Sequenzen von bislang unkultivierten Mikroorganismen in *dsrAB*-Klonbanken, die in vorangegangenen Umweltstudien beschrieben wurden, konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden.

F. ANHANG

Tabelle F.1: Geografische Entfernungen zwischen den Untersuchungsgebieten (gerundet auf ganze km)

	Krähmoos	Rasner Möser	Roß-brand I	Roß-brand II	Große Heide	Schrems	Schallhof	Berndorf	Schlöppner-brunnen
Krähmoos	0	13	137	138	290	327	328	342	373
Rasner Möser	13	0	125	126	281	320	315	331	372
Roßbrand I	137	125	0	1	160	197	193	207	327
Roßbrand II	138	126	1	0	159	196	192	206	327
Große Heide	290	281	160	159	0	36	115	122	274
Schrems	327	320	197	196	36	0	119	120	278
Schallhof	328	315	193	192	115	119	0	13	390
Berndorf	342	331	207	206	122	120	13	0	395
Schlöppnerbrunnen	373	372	327	327	274	278	390	395	0

Tabelle F.2: Konzentrationen der aus den Bodenproben extrahierten genomischen DNS

Probe			DNS-Konzentration (ng/µl)
Moorgebiet	Entnahmestelle	Entnahmetiefe	
Krähmoos	Kern A	30 - 40 cm	12,36
		40 - 70 cm	10,05
	Kern B	30 - 40 cm	46,83
		40 - 70 cm	27,02
	Kern C	30 - 40 cm	9,52
		40 - 70 cm	12,88
Rasner Möser	Kern A	20 - 40 cm	86,91
		40 - 60 cm	12,34
	Kern B	20 - 40 cm	19,68
		40 - 60 cm	8,63
	Kern C	20 - 40 cm	4,45
		40 - 60 cm	12,75
Roßbrand I	Kern A	0 - 20 cm	18,36
		20 - 40 cm	15,71
	Kern B	0 - 20 cm	26,61
		20 - 40 cm	14,18
	Kern C	0 - 20 cm	21,42
		20 - 40 cm	28,85
Roßbrand II	Kern A	0 - 20 cm	11,29
		20 - 40 cm	12,86
	Kern B	0 - 20 cm	18,63
		20 - 40 cm	20,93
	Kern C	0 - 20 cm	27,71
		20 - 40 cm	11,79
Große Heide	Kern A	0 - 20 cm	16,31
		20 - 40 cm	6,73
	Kern B	0 - 20 cm	10,48
		20 - 40 cm	28,50
	Kern C	0 - 20 cm	14,60
		20 - 40 cm	7,46
Schrems	Kern A	0 - 20 cm	11,69
		20 - 40 cm	56,20

	Kern B	0 - 20 cm	12,84
		20 - 40 cm	9,90
	Kern C	0 - 20 cm	9,29
		20 - 40 cm	31,80
Schallhof	Kern A	0 - 20 cm	11,62
		20 - 40 cm	10,78
	Kern B	0 - 20 cm	19,29
		20 - 40 cm	18,30
	Kern C	0 - 20 cm	8,16
		20 - 40 cm	14,96
Berndorf	Kern A	0 - 20 cm	19,22
		20 - 40 cm	24,39
	Kern B	0 - 20 cm	19,00
		20 - 40 cm	20,84
	Kern C	0 - 20 cm	19,69
		20 - 40 cm	26,88
Schlöppnerbrunnen	Kern A	0 - 5 cm	31,04
		5 - 10 cm	32,21
		10 - 15 cm	26,47
		15 - 20 cm	12,85
	Kern B	0 - 5 cm	30,13
		5 - 10 cm	29,81
		10 - 15 cm	22,27
		15 - 20 cm	28,48
	Kern C	0 - 5 cm	23,24
		5 - 10 cm	24,56
		10 - 15 cm	32,2
		15 - 20 cm	21,04

Tabelle F.3: BLASTx-Analyse der *dsr*-spezifischen Genbank-Sequenzen

Sequenz		Erster BLASTx-Treffer			
Name	Länge (bp)	Accession-Nr.	Beschreibung und Isolationsquelle [a)]	Länge (AS)	Identität
RMab_4	961	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	71 %
RMab_5	862	ABK90813	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	349	91 %
RMab_9	901	ACJ11485	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, marines Sediment	299	78 %
RMab_11	1012	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	75 %
RMab_12	1019	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	88 %
RMab_17	947	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	97 %
RMab_18	976	CAJ84856	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, marines Sediment	339	78 %
RMab_19	1017	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	97 %
RMab_22	918	CAJ84854	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, marines Sediment	349	77 %
RMab_23	953	CAQ77306	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, marines Sediment	338	85 %
RMab_25	948	ABK90813	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	349	88 %
RMab_26	925	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	80 %
RMab_27	919	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	87 %
RMab_28	1031	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	96 %
RMab_29	968	CAQ77306	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, marines Sediment	338	83 %
RMab_31	1044	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_32	888	ACN81640	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Sediment Flussmündung	349	87 %
RMab_38	1020	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	97 %

RMab_41	994	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	84 %
RMab_43	1028	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	96 %
RMab_47	942	ABY84217	DSR, n. k. SRB, Bodenhorizont C	282	94 %
RMab_50	1030	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	96 %
RMab_51	1012	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	92 %
RMab_55	940	ACN81640	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Sediment Flussmündung	349	85 %
RMab_58	930	EAX47854	DSR α-Untereinheit, *Thermosinus carboxydivorans* Nor1	397	68 %
RMab_62	1036	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	89 %
RMab_64	1046	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	96 %
RMab_68	1050	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_69	1021	ACN81640	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Sediment Flussmündung	349	85 %
RMab_70	1050	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	96 %
RMab_71	960	AAY27787	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	338	84 %
RMab_72	986	ACN81640	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Sediment Flussmündung	349	89 %
RMab_75	1054	AAY27783	DSR α-Untereinheit, n. k. SRB, Wattenmeer Seine-Mündung	341	68 %
RMab_76	1066	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_78	1026	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_79	1057	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_83	431	ACM90465	DSR, n.k. SRB, Boden Reisfeld	267	83 %
RMab_84	1022	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	95 %
RMab_88	1030	AAO61104	DSR α-Untereinheit, n. k. P, Schlöppnerbrunnen	348	94 %

[a)] n. k. SRB = nicht kultiviertes sulfatreduzierendes Bakterium; n. k. P = nicht kultivierter Prokaryont

Tabelle F.4: Erfolgreiche (+) bzw. nicht erfolgreiche (-) Amplifikation von *dsrB* mit den DSRp1728Fmix-Vorwärtsprimern

Probe			DSRp1728F-Primermix				
Moorgebiet	Entnahmestelle	Entnahmetiefe	A	B	C	D	E
Krähmoos	Kern A	30 - 40 cm	+	+	-	-	-
		40 - 70 cm	+	+	+	-	-
	Kern B	30 - 40 cm	+	+	-	-	-
		40 - 70 cm	+	+	+	-	-
	Kern C	30 - 40 cm	+	+	-	-	-
		40 - 70 cm	+	+	+	-	-
Rasner Möser	Kern A	20 - 40 cm	-	+	+	-	-
		40 - 60 cm	+	+	+	-	-
	Kern B	20 - 40 cm	+	+	+	-	-
		40 - 60 cm	+	+	+	-	-
	Kern C	20 - 40 cm	+	+	+	-	-
		40 - 60 cm	+	+	+	-	-
Roßbrand I	Kern A	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern C	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
Roßbrand II	Kern A	0 - 20 cm	+	+	-	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	-	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern C	0 - 20 cm	-	-	-	-	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-

Große Heide	Kern A	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	-	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	+	-	-
		20 - 40 cm	+	+	+	-	-
	Kern C	0 - 20 cm	+	+	+	-	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
Schrems	Kern A	0 - 20 cm	+	+	-	-	-
		20 - 40 cm	+	+	-	-	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	-	-	-
		20 - 40 cm	+	+	-	-	-
	Kern C	0 - 20 cm	+	+	-	-	-
		20 - 40 cm	+	+	-	-	-
Schallhof	Kern A	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern C	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
Berndorf	Kern A	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern B	0 - 20 cm	+	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
	Kern C	0 - 20 cm	-	+	+	+	-
		20 - 40 cm	+	+	+	+	-
Schlöppnerbrunnen	Kern A	0 - 10 cm	+	+	+	+	-
		10 - 20 cm	+	+	+	+	-
	Kern B	0 - 10 cm	+	+	+	+	-
		10 - 20 cm	+	+	+	+	-
	Kern C	0 - 10 cm	+	+	+	+	-
		10 - 20 cm	+	+	+	+	-

Tabelle F.5: Presence-Absence-Matrix der DGGE-Banden. Graue Markierungen zeigen an, dass Reamplifikation und Sequenzierung der entsprechenden *dsr*B-Amplifikate erfolgreich waren.

← Bande	Krähmoos			Rasner Möser			Roßbrand I			Roßbrand II			Große Heide			Schrems			Schallhof			Berndorf			Schlöppnerbrunnen		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1

12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
25	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle F.6: BLASTn-Analyse der erfolgreich sequenzierten DGGE-Banden

Sequenz		Erster BLASTn-Treffer			
Name	Länge (bp)	Accession-Nr.	Beschreibung und Isolationsquelle [a)]	Länge (bp)	Identität
DGGE 13	240	EF065022	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1891	92 %
DGGE 15	231	AM181105	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	85 %
DGGE 16	255	AM181075	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	88 %
DGGE 17	304	AM181105	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	84 %
DGGE 18	296	DQ250783	*dsrA*-ähnliches Gen (partiell), n. k. SRB, Grundwasser	700	92 %
DGGE 19	296	DQ250783	*dsrA*-ähnliches Gen (partiell), n. k. SRB, Grundwasser	700	92 %
DGGE 20	296	DQ250783	*dsrA*-ähnliches Gen (partiell), n. k. SRB, Grundwasser	700	92 %
DGGE 21	306	DQ250783	*dsrA*-ähnliches Gen (partiell), n. k. SRB, Grundwasser	700	92 %

DGGE 22	252	AM181102	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	95 %
DGGE 27	216	AM181102	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	91 %
DGGE 28	264	FJ748852	*dsrAB*, n. k. SRB, Sediment Flussmündung	1809	82 %
DGGE 31	306	DQ250783	*dsrA*-ähnliches Gen (partiell), n. k. SRB, Grundwasser	700	91 %
DGGE 33	306	AY753093	*dsrB*, n. k. B, tropisches Sediment	725	74 %
DGGE 35	285	AY167478	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1885	96 %
DGGE 37	285	EU258780	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	632	84 %
DGGE 40	288	CP000478	*dsrB*, *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB	1101	86 %
DGGE 44	291	EF065031	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1805	80 %
DGGE 45	297	AY337160	*dsrAB* (partiell), n. k. SRB, Küstensediment	1270	80 %
DGGE 46	297	AY167467	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 2)	1773	83 %
DGGE 50	301	AY337160	*dsrAB* (partiell), n. k. SRB, Küstensediment	1270	80 %
DGGE 51	315	AY167465	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1889	91 %
DGGE 52	306	AY167465	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1889	91 %
DGGE 55	306	EU258841	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	632	89 %
DGGE 58	291	AY167479	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 2)	1770	96 %
DGGE 64	304	AB263139	*dsrAB*, n. k. SRB, Sediment Tiefsee	1862	91 %
DGGE 65	312		kein Treffer		
DGGE 66	306	FM212388	*dsrAB* (partiell), n. k. SRB, Petroleum-kontaminiertes Sediment	1251	84 %
DGGE 67	293	EU258873	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	632	84 %
DGGE 74	279	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	93 %
DGGE 79	286	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	96 %
DGGE 80	309	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	97 %
DGGE 81	302	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	97 %
DGGE 82	303	EU258862	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	629	91 %
DGGE 83	284	AM181098	*dsrB* (partiell), n. k. SRB, Boden Süßwasser-Gezeitenzone	279	87 %
DGGE 87	313	AB263125	*dsrAB*, n. k. SRB, Sediment Tiefsee	1942	75 %
DGGE 91	300	AY167477	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 4)	1885	94 %
DGGE 92	312	AY167477	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 4)	1885	94 %
DGGE 112	266	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	93 %
DGGE 116	300		kein Treffer		
DGGE 123	296	AY167465	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1889	89 %
DGGE 124	283	EU258877	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	629	86 %
DGGE 129	288	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	85 %
DGGE 131	252	AY167471	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 4)	1889	90 %
DGGE 135	275	EU258768	*dsrB*, n. k. SRB, Boden Reisfeld	629	94 %
DGGE 140	238	AY167465	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1889	89 %
DGGE 141	243	AY167465	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 6)	1889	90 %
DGGE 144	271	EF645664	*dsrAB*, n. k. B, Biofilm aus Reaktor	1943	82 %
DGGE 146	297	AY753088	*dsrB*, n. k. B, tropisches Sediment	734	84 %
DGGE 151	284	EF065022	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1891	86 %
DGGE 152	302	EF065045	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1888	96 %
DGGE 153	299	AY167473	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 1)	1890	94 %
DGGE 154	235	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	89 %
DGGE 155	303	AY167472	*dsrAB*, n. k. P, Schlöppnerbrunnen (OTU 11)	1774	81 %
DGGE 156	301	EF065024	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1892	94 %
DGGE 158	304		kein Treffer		
DGGE 159	304	EF065021	*dsrAB*, n. k. SRB, Grundwasser Mülldeponie	1841	78 %

[a)] n.k. (SR)B = nicht kultiviertes (sulfatreduzierendes) Bakterium; n. k. P = nicht kultivierter Prokaryont

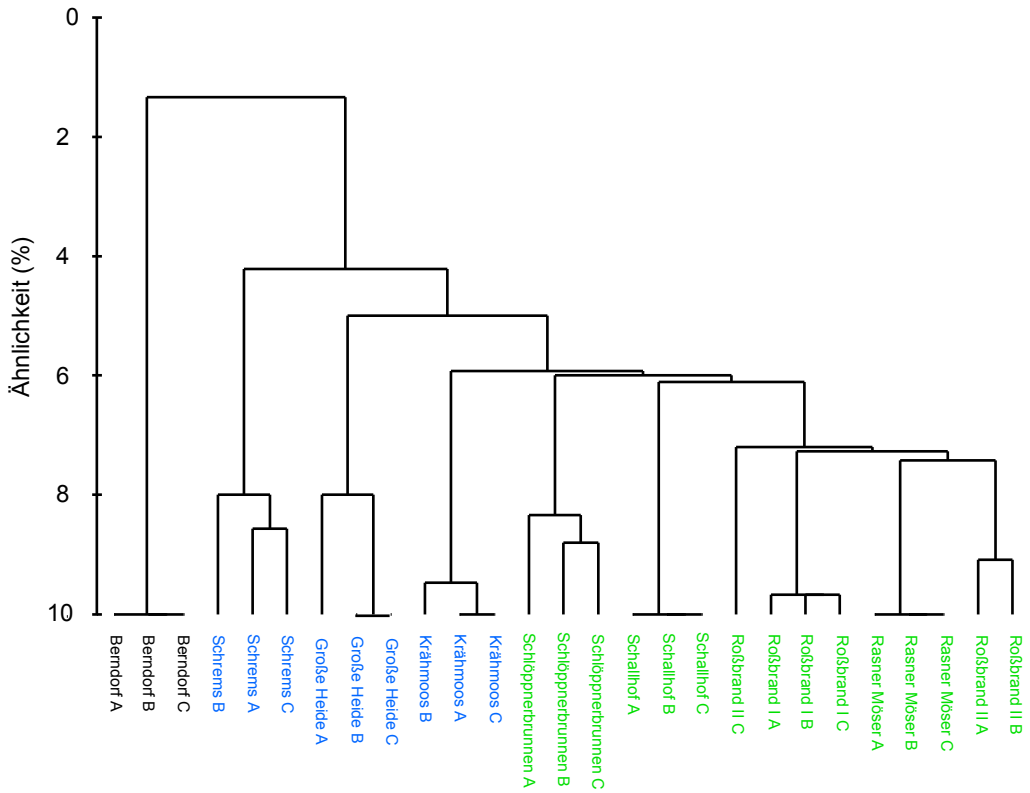


Abb. F.1: Ähnlichkeit der Bandenmuster der DGGE-Proben basierend auf einer Bray-Curtis-Matrix. Für die Berechnung wurden nur die ersten 41 Banden der Presence-Absence-Matrix verwendet. A, B und C bezeichnen jeweils die drei Subproben der untersuchten Moorgebiete. Hochmoore sind in blau dargestellt, Niedermoore in grün und die Feuchtwiese in schwarz.

Tabelle F.7: Vorkommen der DGGE-Banden und ihrer entsprechenden *dsrB*-Sequenzen in den Untersuchungsgebieten

dsrB-Sequenz	Bande in der Presence-Absence-Matrix	Krähmoos	Rasner Möser	Roß-brand I	Roß-brand II	Schrems	Große Heide	Schallhof	Berndorf	Schlöppner-brunnen
DGGE 13	11						x	x		x
DGGE 15	13							x		
DGGE 16	14							x		
DGGE 17	15							x		
DGGE 18	17							x		
DGGE 19								x		
DGGE 20								x		
DGGE 21								x		
DGGE 22								x		
DGGE 27	21								x	
DGGE 28	16							x	x	x
DGGE 31										x
DGGE 33										x
DGGE 35	5	x	x	x	x	x		x		x
DGGE 37										x
DGGE 40										x
DGGE 44										x
DGGE 45	8		x		x			x		x
DGGE 46	12							x		x
DGGE 50										x
DGGE 51	3	x	x	x	x			x		

DGGE 52	4	x	x	x			x	x		x
DGGE 55	6	x	x	x	x	x		x		x
DGGE 58	10	x	x					x		
DGGE 64							x			
DGGE 65							x			
DGGE 66	22	x	x	x	x		x			x
DGGE 67	26	x	x	x	x					
DGGE 74							x			
DGGE 79	25	x					x			x
DGGE 80	46						x			
DGGE 81	48		x		x		x			
DGGE 82							x			
DGGE 83							x			
DGGE 87	30		x							
DGGE 91	9	x	x			x		x		x
DGGE 92	29					x				
DGGE 112	47		x							
DGGE 116	2		x	x	x		x	x		x
DGGE 123	36			x						
DGGE 124	32		x	x	x					
DGGE 129	39			x	x					
DGGE 131				x						
DGGE 135				x						
DGGE 140					x					
DGGE 141					x					
DGGE 144					x					
DGGE 146	40				x					
DGGE 151	42			x	x					
DGGE 152	43				x					
DGGE 153	45			x	x					
DGGE 154	35			x	x					
DGGE 155					x					
DGGE 156					x					
DGGE 158	1				x			x		
DGGE 159					x					
	7							x		
	18							x		
	19								x	
	20								x	
	23									x
	24									x
	27	x								
	28					x	x			
	31		x	x	x					
	33		x							
	34		x							
	37			x						
	38			x						
	41				x					
	44		x			x				

G. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

’	Minuten (geografisch)
“	Sekunden (geografisch)
°	Grad (geografisch)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat; Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
atm	Atmosphäre
ATP	Adenosin-Triphosphat
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
$CaSO_4$	Kalziumsulfat
CH_4	Methan
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
ddNTP	dideoxy-Nukleotidtriphosphat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Deoxyribonukleinsäure(n)
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DSR	Dissimilatorische (Bi-)Sulfitreduktase
dsrA	Gen für die α-Untereinheit der DSR
dsrAB	Gen-Operon für die α- und β-Untereinheit der DSR
dsrB	Gen für die β-Untereinheit der DSR
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
etc.	*et cetera*
FeS	Eisensulfid
FeS_2	Pyrit
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin

h	Stunde(n)
H_2	molekularer Wasserstoff
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$H_2O_{bidest.}$	zweifach entsalztes und filtriertes Reinstwasser
H_2S	Schwefelwasserstoff
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*englisch*: high performance liquid chromatography)
HS^-	Sulfid
inkl.	inklusive
kb	Kilobasen
KBL	Kilobase Ladder
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol, molar
MDS	Multidimensional Scaling
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ML	Maximum Likelihood
mM	Millimol, millimolar
mm	Millimeter
MO	Mikroorganismus, Mikroorganismen
MP	Maximum Parsimony
µM	Mikromol, mikromolar
N	Normal (Konzentration); Nord
n. k.	nicht kultiviert
n. p.	nicht publiziert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NJ	Neighbour Joining
nm	Nanometer
NÖ	Niederösterreich
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
O	Ost
OTU	Operational Taxonomic Unit
p.a.	*pro analysi* (Reinheitsangabe für Chemikalien)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*englisch:* polymerase chain reaction)
pmol	Picomol
rpm	Umdrehungen pro Minute (*englisch:* rounds per minute)

rdsrAB	Gen-Operon für die α- und β-Untereinheit der Reversen DSR
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure(n)
s.	siehe
S.	Seite
s.u.	siehe unten
S_0	elementarer Schwefel
S^{2-}	Sulfid
Sb	Schlöppnerbrunnen
SDS	Natriumdodecylsulfat (*englisch:* sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunden
SO_2	Schwefeldioxid
SO_3^{2-}	Sulfit
SO_4^{2-}	Sulfat
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
SRA	Sulfatreduzierende *Archaea*
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
SRM	Sulfatreduzierende Mikroorganismen
SRP	Sulfatreduzierende Prokaryoten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
u	Einheit(en) (*englisch:* unit)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (*englisch:* weight per volume)
x	-fach
z.B.	zum Beispiel
ΔG	freie Enthalpie

H. LITERATURVERZEICHNIS

Abram, J.W. und Nedwell, D.B. (1978). "Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen." Arch Microbiol **117**(1): 89-92.

Abreu, I.A., Saraiva, L.M. *et al.* (2000). "Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by neelaredoxin." Mol Microbiol **38**(2): 322-334.

Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R. *et al.* (2005). "PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8966-9.

Aeckersberg, F., Rainey, F.A. *et al.* (1998). "Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptations of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions." Arch Microbiol **170**: 361-369.

Alewell, C. und Gehre, M. (1999). "Patterns of stable S isotopes in a forested catchment as indicators for biological S turnover." Biogeochemistry **47**: 319-333.

Alewell, C. und Giesemann, A. (1996). "Sulfate reduction in a forested catchment as indicated by d34S values of sulfate in soil solutions and runoff." Isotopes **32**: 203-210.

Alewell, C. und Novak, M. (2001). "Spotting zones of dissimilatory sulfate reduction in a forested catchment: the 34S-35S approach." Environ Pollut **112**(3): 369-377.

Altschul, S.F., Gish, W. *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.

Anderson, R.T. und Lovley, D.R. (2000). "Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer." Environ Science Techn **34**(11): 2261-2266.

Annweiler, E., Michaelis, W. *et al.* (2001). "Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar-oil-contaminated aquifer." Appl Environ Microbiol **67**(11): 5077-5083.

Baas-Becking, L.G.M., Ed. (1934). Geologie of Inleiding Tot de Milieukunde, W.P. Van Stokum.

Bade, K., Manz, W. *et al.* (2000). "Behaviour of sulfate-reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water." FEMS Microbiol Ecol **32**: 215-223.

Bahr, M., Crump, B.C. *et al.* (2005). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh." Environ Microbiol **7**(8): 1175-85.

Bak, F. und Widdel, F. (1986). "Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum sp. nov.*" Arch Microbiol **146**: 177–180.

Baumgarten, A., Redenius, I. *et al.* (2001). "Periplasmic oxygen reduction by *Desulfovibrio* species." Arch Microbiol **176**(4): 306-9.

Beliakova, E.V., Rozanova, E.P. *et al.* (2006). "The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus gen. nov.*, *sp. nov.*, isolated from an oil field." Mikrobiologiia **75**(2): 201-11.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I. *et al.* (2002). "GenBank." Nucleic Acids Res **30**(1): 17-20.

Blazejak, A., Erseus, C. *et al.* (2005). "Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (*Oligochaeta*) from the Peru margin." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1553-61.

Bonnett, S.A., Ostle, N. *et al.* (2006). "Seasonal variations in decomposition processes in a valley-bottom riparian peatland." Sci Total Environ **370**(2-3): 561-73.

Boothman, C., Hockin, S. *et al.* (2006). "Molecular analysis of a sulphate-reducing consortium used to treat metal-containing effluents." Biometals **19**(6): 601-9.

Bragazza, L. und Freeman, C. (2007). "High nitrogen availability reduces polyphenol content in *Sphagnum* peat." Sci Total Environ **377**(2-3): 439-43.

Bragazza, L., Freeman, C. *et al.* (2006). "Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19386-9.

Brandt, K.K., Patel, B.K. *et al.* (1999). "*Desulfocella halophila gen. nov.*, *sp. nov.*, a halophilic, fatty-acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of the Great Salt Lake." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 1**: 193-200.

Bray, J.R. und Curtis, J.T. (1957). "An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin." Ecol Monogr **27**: 325-349.

Buckley, D.H. und Schmidt, T.M. (2003). "Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems." Environ Microbiol **5**(6): 441-52.

Burggraf, S., Jannasch, H.W. *et al.* (1990). "*Archeoglobus profundus sp. nov.*, represents a new species within the sulfate-reducing archaebacteria." Syst Appl Microbiol **13**: 24-28.

Caldwell, M.E., Garrett, R.M. *et al.* (1998). "Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions." Environmental Science and Technology **32**(14): 2191-2195.

Casamayor, E.O., Massana, R. *et al.* (2002). "Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern." Environ Microbiol **4**(6): 338-48.

Castro, H., Reddy, K.R. *et al.* (2002). "Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades." Appl Environ Microbiol **68**(12): 6129-6137.

Chang, B.V., Shiung, L.C. *et al.* (2002). "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil." Chemosphere **48**(7): 717-724.

Chang, Y.J., Peacock, A.D. *et al.* (2001). "Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site." Appl Environ Microbiol **67**(7): 3149-3160.

Cho, J.C. und Tiedje, J.M. (2000). "Biogeography and degree of endemicity of fluorescent Pseudomonas strains in soil." Appl Environ Microbiol **66**(12): 5448-56.

Cottrell, M.T. und Cary, S.C. (1999). "Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*." Appl Environ Microbiol **65**(3): 1127-1132.

Crane, B.R. und Getzoff, E.D. (1996). "The relationship between structure and function for the sulfite reductases." Curr Opin Struct Biol **6**(6): 744-56.

Crane, B.R., Siegel, L.M. *et al.* (1995). "Sulfite reductase structure at 1.6 A: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions." Science **270**(5233): 59-67.

Crump, B.C., Hopkinson, C.S. *et al.* (2004). "Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1494-505.

Cypionka, H. (1989). "Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio desulfuricans*." Arch Microbiol **152**(3): 237-43.

Cypionka, H. (2000). "Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species." Annu Rev Microbiol **54**: 827-848.

Dahl, C., Kredich, N.M. *et al.* (1993). "Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes." J Gen Microbiol **139**(8): 1817-28.

de Bok, F.A., Harmsen, H.J. *et al.* (2005). "The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, Pelotomaculum schinkii sp. nov., co-cultured with Methanospirillum hungatei, and emended description of the genus Pelotomaculum." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 4): 1697-703.

De Smul, A. und Verstraete, W. (1999). "Retention of sulfate-reducing bacteria in expanded granular-sludge-blanket reactors." Water Environ Res **71**(4): 427-431.

Devereux, R., Hines, M.E. *et al.* (1996). "S cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons." Microb Ecol **32**(3): 283-292.

Devereux, R. und Mundfrom, G.W. (1994). "A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment." Appl Environ Microbiol **60**(9): 3437-3439.

Dhillon, A., Teske, A. *et al.* (2003). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2765-2772.

Dolla, A., Fournier, M. *et al.* (2006). "Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria." J Biotechnol **126**(1): 87-100.

Dubilier, N., Mulders, C. *et al.* (2001). "Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm." Nature **411**(6835): 298-302.

Ellenberg, H. (1996). "Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen", Eugen-Ulmer-Verlag Stuttgart, 5. Auflage, 1098 S.

Elshahed, M.S., Senko, J.M. *et al.* (2003). "Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5609-5621.

Eschemann, A., Kuhl, M. *et al.* (1999). "Aerotaxis in *Desulfovibrio*." Environ Microbiol **1**(6): 489-94.

Felsenstein, J. (1988). "Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability." Annu Rev Genet **22**: 521-65.

Felsenstein, J. (1995). "PHYLIP: phylogeny inference package". Seattle, Department of Genetics, University of Washington.

Fierer, N. und Jackson, R.B. (2005). "The diversity and biogeography of soil bacterial communities." PNAS **103**: 626-631.

Finlay, B.J. und Clarke, K.J. (1999a). "Ubiquitous dispersal of microbial species." Nature **400**: 828.

Finlay, B.J., Esteban, G.F. *et al.* (1999b). "Global distribution of free-living microbial species." Ecography **22**: 138-144.

Fisk, M., Ruether, K. *et al.* (2003). "Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems." Soil Biology and Biochemistry **35**: 591-602.

Fitch, W.M. und Margoliash, E. (1967). "Construction of phylogenetic trees." Science **155**(760): 279-84.

Foti, M., Sorokin, D.Y. *et al.* (2007). "Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes." Appl Environ Microbiol **73**(7): 2093-100.

Friedrich, M.W. (2002). "Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms." J. Bacteriol. **184**(1): 278-289.

Frostegard, A., Courtois, S. *et al.* (1999). "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils." Appl Environ Microbiol **65**(12): 5409-20.

Füreder, S. (2005). "Microarray-based diversity analyses of microorganisms involved in sulfur and nitrogen cycling." Diplomarbeit Universität Wien.

Fulthorpe, R.R., Rhodes, A.N. *et al.* (1998). "High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1620-7.

Gage, S.H., Isard, S.A. *et al.* (1999). "Ecological scaling of acrobiological dispersal processes." Agric. Forest Meteorol. **30**: 249-261.

Garcia-Martinez, J. und Rodriguez-Valera, F. (2000). "Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of Group I." Mol Ecol **9**(7): 935-48.

Gauci, V., Matthews, E. *et al.* (2004). "Sulfur pollution suppression of the wetland methane source in the 20th and 21st centuries." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12583-7.

Geets, J., Vanbroekhoven, K. *et al.* (2006). "Column experiments to assess the effects of electron donors on the efficiency of in situ precipitation of Zn, Cd, Co and Ni in contaminated groundwater applying the biological sulfate removal technology." Environ Sci Pollut Res Int **13**(6): 362-78.

Glombitza, F. (2001). "Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction." Waste Manag **21**(2): 197-203.

Good, I.J. (1953). "The population frequency of species and the estimation of population parameters." Biometrika **40**: 237-264.

Gorham, E., Martin, F.B. *et al.* (1985). "Acid Rain: Statistical Analysis of Ionic Correlations Questioned." Science **228**(4707): 1553.

Goulden, M.L., Wofsy, S.C. *et al.* (1998). "Sensitivity of boreal forest carbon balance to soil thaw." Science **279**(5348): 214-7.

Green, J.L., Bohannan, B.J. *et al.* (2008). "Microbial biogeography: from taxonomy to traits." Science **320**(5879): 1039-43.

Habicht, K.S. und Canfield, D.E. (1997). "Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments." Geochim Cosmochim Acta **61**(24): 5351-61.

Hansel, C.M., Fendorf, S. *et al.* (2008). "Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile." Appl Environ Microbiol **74**(5): 1620-33.

Hansen, T.A. (1994). "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes." Antonie van Leeuwenhoek **66**: 165-185.

Harms, G., Zengler, K. *et al.* (1999). "Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria." Appl Environ Microbiol **65**(3): 999-1004.

Hartman, W.H., Richardson, C.J. *et al.* (2008). "Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17842-7.

Hines, M.E., Evans, R.S. *et al.* (1999). "Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*." Appl Environ Microbiol **65**(5): 2209-2216.

Horn, M.A., Matthies, C. *et al.* (2003). "Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat." Appl Environ Microbiol **69**(1): 74-83.

Horner-Devine, M.C., Carney, K.M. *et al.* (2004a). "An ecological perspective on bacterial biodiversity." Proc Biol Sci **271**(1535): 113-22.

Horner-Devine, M.C., Lage, M. *et al.* (2004b). "A taxa-area relationship for bacteria." Nature **432**(7018): 750-3.

Imachi, H., Sakai, S. *et al.* (2007). "Pelotomaculum propionicicum sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **57**(Pt 7): 1487-92.

Imachi, H., Sekiguchi, Y. *et al.* (2006). "Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with desulfotomaculum cluster I are widely distributed in methanogenic environments." Appl Environ Microbiol **72**(3): 2080-91.

Isa, Z., Grusenmeyer, S. *et al.* (1986). "Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Microbiological Aspects." Appl Environ Microbiol **51**(3): 580-587.

Ito, T., Nielsen, J.L. *et al.* (2002a). "Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent *in situ* hybridization." Appl Environ Microbiol **68**(1): 356-364.

Ito, T., Okabe, S. *et al.* (2002b). "Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions." Appl Environ Microbiol **68**(3): 1392-1402.

Itoh, T., Suzuki, K.-I. *et al.* (1999). "*Caldivirga maquilingensis gen. nov.*, *sp. nov.*, a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines." Int J Syst Bacteriol **49**: 1157-1163.

Itoh, T., Suzuki, K. *et al.* (1998). "*Thermocladium modestius gen. nov.*, *sp. nov.*, a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 3**: 879-87.

Javaherdashti, R. (1999). "A review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: Past, present and future." Anti-Corrosion Methods and Materials **46**(3): 173-180.

Jorgensen, B.B., Isaksen, M.F. *et al.* (1992). "Bacterial Sulfate Reduction Above 100°C in Deep-Sea Hydrothermal Vent Sediments." Science **258**(5089): 1756-1757.

Joulian, C., Ramsing, N.B. *et al.* (2001). "Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments." Appl Environ Microbiol **67**(7): 3314-3318.

Karkhoff-Schweizer, R.R., Huber, D.P. *et al.* (1995). "Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR." Appl Environ Microbiol **61**(1): 290-296.

Keppler, H. (1999). "Experimental evidence for the source of excess sulfur in explosive volcanic eruptions." Science **284**(5420): 1652-4.

King, J.K., Kostka, J.E. *et al.* (2000). "Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments." Appl Environ Microbiol **66**(6): 2430-2437.

Klein, M., Friedrich, M. *et al.* (2001). "Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes." J Bacteriol **183**(20): 6028-6035.

Kniemeyer, O., Fischer, T. *et al.* (2003). "Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium." Appl Environ Microbiol **69**(2): 760-768.

Knoblauch, C. und Jørgensen, B.B. (1999a). "Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments." Environ Microbiol **1**(5): 457-467.

Knoblauch, C., Jørgensen, B.B. *et al.* (1999b). "Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in arctic marine sediments." Appl Environ Microbiol **65**(9): 4230-4233.

Knoblauch, C., Sahm, K. *et al.* (1999c). "Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense gen. nov.*, *sp. nov.*, *Desulfofrigus fragile sp. nov.*, *Desulfofaba gelida gen. nov.*, *sp. nov.*, *Desulfotalea psychrophila gen. nov.*, *sp. nov.* and *Desulfotalea arctica sp. nov.*" Int J Syst Bacteriol **49**(4): 1631-1643.

Koschorreck, M., Wendt-Potthoff, K. *et al.* (2003). "Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina." Environ Sci Technol **37**(6): 1159-62.

Kreke, B. und Cypionka, H. (1992). "Protonmotive force in freshwater sulfate-reducing bacteria, and its role in sulfate accumulation in *Desulfobulbus propionicus*." Arch Microbiol **158**(3): 183-7.

Krekeler, D., Teske, A. *et al.* (1998). "Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat." FEMS Microbiol Ecol **25**(2): 89-96.

Krumholz, L.R., Harris, S.H. *et al.* (1999). "Characterization of two subsurface H2-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium sp. nov.* and *Acetobacterium psammolithicum sp. nov.*, and their ecological roles." Appl Environ Microbiol **65**(6): 2300-2306.

Küsel, K., Pinkart, H.C. *et al.* (1999). "Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*." Appl Environ Microbiol **65**(11): 5117-5123.

Kuske, C.R., Ticknor, L.O. *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**(4): 1854-63.

Lakay, F.M., Botha, A. *et al.* (2007). "Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils." J Appl Microbiol **102**(1): 265-73.

Langendijk, P.S., Hagemann, J. *et al.* (1999). "Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites." J Clin Periodontol **26**(9): 596-599.

Langendijk, P.S., Hanssen, J.T.J. *et al.* (2000). "Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis." J Clin Periodontol **27**: 943-950.

Langendijk, P.S., Kulik, E.M. *et al.* (2001). "Isolation of *Desulfomicrobium orale sp. nov.* and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease." Int J Syst Evol Microbiol **51**(3): 1035-1044.

Laue, H., Friedrich, M. *et al.* (2001). "Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium Bilophila wadsworthia RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit." J Bacteriol **183**(5): 1727-33.

Leff, L.G., McArthur, J.V. *et al.* (1998). "Persistence and Dissemination of Introduced Bacteria in Freshwater Microcosms." Microb Ecol **36**(2): 202-11.

LeGall, J., Prickril, B.C. *et al.* (1988). "Isolation and characterization of rubrerythrin, a non-heme iron protein from *Desulfovibrio vulgaris* that contains rubredoxin centers and a hemerythrin-like binuclear iron cluster." Biochemistry **27**(5): 1636-42.

Lehman, R.M., Roberto, F.F. *et al.* (2001). "Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer." Appl Environ Microbiol **67**(5): 2095-2106.

Leloup, J., Quillet, L. *et al.* (2006). "Diversity of the *dsr*AB (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France." FEMS Microbiol Ecol **55**(2): 230-8.

Lens, P.N., De Poorter, M.-P. *et al.* (1995). "Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems." Water Res **29**(3): 871-880.

Lighthart, B. (1997). "The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere." FEMS Microbiol Ecol **23**: 263-274.

Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R. *et al.* (1998). "Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization." Appl Environ Microbiol **64**(7): 2691-2696.

Löffler, F.E., Sun, Q. *et al.* (2000). "16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1369-74.

Loubinoux, J., Bisson-Boutelliez, C. *et al.* (2002a). "Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets." Oral Microbiol Immunol **17**(5): 321-323.

Loubinoux, J., Bronowicki, J.P. *et al.* (2002b). "Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases." FEMS Microbiol Ecol **1341**: 1-6.

Loubinoux, J., Mory, F. *et al.* (2000). "Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*." J Clin Microbiol **38**(2): 931-934.

Lovley, D.R. (1993). "Dissimilatory metal reduction." Annu Rev Microbiol **47**: 263-90.

Lovley, D.R. (1995a). "Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction." J Ind Microbiol **14**(2): 85-93.

Lovley, D.R., Coates, J.D. *et al.* (1995b). "Benzene Oxidation Coupled to Sulfate Reduction." Appl Environ Microbiol **61**(3): 953-958.

Lovley, D.R. und Phillips, E.J. (1992). "Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*." Appl Environ Microbiol **58**(3): 850-6.

Loy, A. (2003). "DNA microarray technology for biodiversity inventories of sulfate-reducing prokaryotes". Department of Microbiology. München, Technische Universität München**:** 154.

Loy, A., Arnold, R. *et al.* (2008). "probeCheck - a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity." Environ Microbiol.

Loy, A., Kusel, K. *et al.* (2004). "Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages." Appl Environ Microbiol **70**(12): 6998-7009.

Loy, A., Lehner, A. *et al.* (2002). "Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment." Appl Environ Microbiol **68**(10): 5064-5081.

Ludwig, W., Strunk, O. *et al.* (1998). "Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis." Electrophoresis **19**(4): 554-568.

Ludwig, W., Strunk, O. *et al.* (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Res **32**(4): 1363-1371.

Lumppio, H.L., Shenvi, N.V. *et al.* (2001). "Rubrerythrin and Rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system." J Bacteriol **183**(1): 101-108.

Madigan, M., Martinko, J. *et al.* (2000). Brock Biology of Microorganisms. New Jersey, Prentice Hall Upper Saddle River.

Madrid, V.M., Aller, R.C. *et al.* (2006). "Evidence of the activity of dissimilatory sulfate-reducing prokaryotes in nonsulfidogenic tropical mobile muds." FEMS Microbiol Ecol **57**(2): 169-81.

Magot, M., Caumette, P. *et al.* (1992). "*Desulfovibrio longus sp. nov.*, a sulfate-reducing bacterium isolated from an oil-producing well." Int J Syst Bacteriol **42**(3): 398-403.

Magot, M., Ravot, G. *et al.* (1997). "*Dethiosulfovibrio peptidovorans gen. nov., sp. nov.*, a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells." Int J Syst Bacteriol **47**(3): 818-24.

Maki, J.S. (2001). "Genus IV. *Thermodesulfovibrio*". Bergey's manual of systematic bacteriology. G. M. Garrity. New York, Springer. **1:** 460-464.

Mantel, N. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression approach." Cancer Res **27**(2): 209-20.

Manz, W., Eisenbrecher, M. *et al.* (1998). "Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides." FEMS Microbiol Ecol **25**: 43-61.

Martinez, C.E., Yanez, C. *et al.* (2007). "Biogeochemistry of metalliferous peats: sulfur speciation and depth distributions of *dsr*AB genes and Cd, Fe, Mn, S, and Zn in soil cores." Environ Sci Technol **41**(15): 5323-9.

Martiny, J.B., Bohannan, B.J. *et al.* (2006). "Microbial biogeography: putting microorganisms on the map." Nat Rev Microbiol **4**(2): 102-12.

McArthur, J.V., Kovacic, D.A. *et al.* (1988). "Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9621-9624.

McDougall, R., Robson, J. *et al.* (1997). "Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species." J Clin Microbiol **35**(7): 1805-1808.

McNair, J.N., Newbold, J.D. *et al.* (1997). "Turbulent transport of suspended particles and dispersing benthic organisms: How long to hit bottom?" J. Theor. Biol. **188**: 29-52.

Meckenstock, R.U., Annweiler, E. *et al.* (2000). "Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture." Appl Environ Microbiol **66**(7): 2743-2747.

Melillo, J.M. und Cowling, E.B. (2002). "Reactive nitrogen and public policies for environmental protection." Ambio **31**(2): 150-8.

Metje, M. und Frenzel, P. (2005). "Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8191-200.

Miletto, M., Bodelier, P.L. *et al.* (2007). "Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments." J Microbiol Methods **70**(1): 103-11.

Minz, D., Fishbain, S. *et al.* (1999a). "Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4659-4665.

Minz, D., Flax, J.L. *et al.* (1999b). "Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4666-4671.

Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L. *et al.* (2003). "*Desulfovibrio capillatus sp. nov.*, a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico." Anaerobe **9**(2): 97-103.

Morasch, B., Annweiler, E. *et al.* (2001). "The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: Degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria." J Microbiol Methods **44**(2): 183-191.

Mori, K., Kim, H. *et al.* (2003). "A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae fam. nov.*, *Thermodesulfobium narugense*, *gen. nov.*, *sp. nov.*, a new thermophilic isolate from a hot spring." Extremophiles **7**(4): 283-90.

Muller, J.A., Galushko, A.S. *et al.* (1999). "Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate." Arch Microbiol **172**(5): 287-94.

Munk, K. (2001). "Grundstudium Biologie: Mikrobiologie", Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.

Murphy, M.J., Siegel, L.M. *et al.* (1973). "An iron tetrahydroporphyrin prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases." Biochem Biophys Res Commun **54**(1): 82-8.

Muyzer, G., de Waal, E.C. *et al.* (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Appl Environ Microbiol **59**(3): 695-700.

Muyzer, G. und Stams, A.J. (2008). "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria." Nat Rev Microbiol **6**(6): 441-54.

Nakagawa, T., Hanada, S. *et al.* (2002). "Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan)." FEMS Microbiol Ecol **41**: 199-209.

Nakagawa, T., Nakagawa, S. *et al.* (2004). "Phylogenetic diversity of sulfate-reducing prokaryotes in active deep-sea hydrothermal vent chimney structures." FEMS Microbiol Lett **232**(2): 145-52.

Nanninga, H.J. und Gottschal, J.C. (1987). "Properties of *Desulfovibrio carbinolicus sp. nov.* and Other Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from an Anaerobic-Purification Plant." Appl Environ Microbiol **53**(4): 802-809.

Nielsen, L.B., Finster, K. *et al.* (2001). "Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows." Environ Microbiol **3**(1): 63-71.

Noh, S.L., Choi, J.M. *et al.* (2003). "Anaerobic biodegradation of toluene coupled to sulfate reduction in oil-contaminated soils: optimum environmental conditions for field applications." J Environ Sci Health **38**(6): 1087-1097.

Oechel, W.C., Vourlitis, G.L. *et al.* (2000). "Acclimation of ecosystem CO2 exchange in the Alaskan Arctic in response to decadal climate warming." Nature **406**(6799): 978-81.

Oka, A.R., Phelps, C.D. *et al.* (2008). "Identification of critical members in a sulfidogenic benzene-degrading consortium by DNA stable isotope probing." Appl Environ Microbiol **74**(20): 6476-80.

Ollivier, B., Caumette, P. *et al.* (1994). "Anaerobic bacteria from hypersaline environments." Microbiol Rev **58**(1): 27-38.

Ouattara, A.S., Patel, B.K. *et al.* (1999). "Isolation and characterization of *Desulfovibrio burkinensis sp. nov.* from an African ricefield, and phylogeny of *Desulfovibrio alcoholivorans*." Int J Syst Bacteriol **49**: 639-643.

Oude Elferink, S.J.W.H., Vorstman, W.J.C. *et al.* (1998). "Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater." FEMS Microbiol Ecol **27**: 185-194.

Ovreas, L., Forney, L. *et al.* (1997). "Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA." Appl Environ Microbiol **63**(9): 3367-73.

Papke, R.T., Ramsing, N.B. *et al.* (2003). "Geographical isolation in hot spring cyanobacteria." Environ Microbiol **5**(8): 650-9.

Park, J.W. und Crowley, D.E. (2005). "Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE." Biotechniques **38**(4): 579-86.

Peck, H.D. (1959). "The ATP-Dependent Reduction of Sulfate with Hydrogen in Extracts of *Desulfovibrio desulfuricans*." Proc Natl Acad Sci U S A **45**(5): 701-8.

Perez-Jimenez, J.R. und Kerkhof, L.J. (2005). "Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsr*AB)." Appl Environ Microbiol **71**(2): 1004-11.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J. *et al.* (1998). "Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene." FEMS Microbiol Ecol **27**: 269-279.

Pierik, A.J., Duyvis, M.G. *et al.* (1992). "The third subunit of desulfoviridin-type dissimilatory sulfite reductases." Eur J Biochem **205**(1): 111-5.

Pinhassi, J. und Berman, T. (2003). "Differential growth response of colony-forming alpha- and gamma-proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat." Appl Environ Microbiol **69**(1): 199-211.

Polz, M.F. und Cavanaugh, C.M. (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." Appl Environ Microbiol **64**(10): 3724-3730.

Postgate, J.R. (1963). "The examination of sulphur auxotrophs: a warning." J Gen Microbiol **30**: 481-4.

Purdy, K.J., Nedwell, D.B. *et al.* (2003). "Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3181-3191.

Rabus, R., Fukui, M. *et al.* (1996). "Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil." Appl Environ Microbiol **62**(10): 3605-3613.

Rabus, R., Hansen, T. *et al.* (2000). "Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes". The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt. New York, Springer-Verlag.

Ramsing, N.B., Kühl, M. *et al.* (1993). "Distribution of sulfate-reducing bacteria, O_2 and H_2S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes." Appl Environ Microbiol **59**(11): 3840-3849.

Rao, T.S., Sairam, T.N. *et al.* (2000). "Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system." Corrosion Science **42**(8): 1417-1431.

Ravenschlag, K., Sahm, K. *et al.* (2001). "Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard)." Appl Environ Microbiol **67**(1): 387-395.

Reche, I., Pulido-Villena, E. *et al.* (2005). "Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness?" Ecology **86**: 1715-1722.

Rooney-Varga, J.N., Anderson, R.T. *et al.* (1999). "Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer." Appl Environ Microbiol **65**(7): 3056-63.

Rooney-Varga, J.N., Devereux, R. *et al.* (1997). "Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate- reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*." Appl Environ Microbiol **63**(10): 3895-3901.

Safinowski, M. und Meckenstock, R.U. (2004). "Enzymatic reactions in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation by the sulphate-reducing enrichment culture N 47." FEMS Microbiol Lett **240**(1): 99-104.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H. *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.

Saitou, N. und Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.

Sanger, F., Nicklen, S. *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci **74**(12): 5463-5467.

Sass, H., Cypionka, H. *et al.* (1997). "Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin." FEMS Microbiol Ecol **22**(3): 245-255.

Savvichev, A.S., Rusanov, II *et al.* (2003). "Microbial sulfate reduction in sediments of the coastal zone and littoral of the Kandalaksha bay of the White sea." Mikrobiologiia **72**(4): 535-46.

Scheid, D. und Stubner, S. (2001). "Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots." FEMS Microbiol Ecol **36**(2-3): 175-183.

Schloss, P.D. und Handelsman, J. (2005). "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1501-6.

Schmalenberger, A., Drake, H.L. *et al.* (2007). "High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen." Environ Microbiol **9**(5): 1317-28.

Schnell, S., Bak, F. *et al.* (1989). "Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*." Arch Microbiol **152**(6): 556-63.

Schoenborn, L., Abdollahi, H. *et al.* (2001). "A member of the delta subgroup of *Proteobacteria* from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*." J Clin Microbiol **39**(2): 787-790.

Schramm, A., de Beer, D. *et al.* (1999). "Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira spp.* along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors." Appl Environ Microbiol **65**(8): 3690-3696.

Schwalbach, M.S. (2005). "Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR." Limnol. Oceanogr. **50**: 620-628.

Sigalevich, P., Meshorer, E. *et al.* (2000). "Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* results in flocculation." Appl Environ Microbiol **66**(11): 5005-5012.

Silva, G., LeGall, J. *et al.* (2001a). "Molecular characterization of *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin, a protein involved in oxygen detoxification in anaerobes." J Bacteriol **183**(15): 4413-4420.

Silva, G., Oliveira, S. *et al.* (2001b). "Analysis of the *Desulfovibrio gigas* transcriptional unit containing rubredoxin (rd) and rubredoxin-oxygen oxidoreductase (roo) genes and upstream ORFs." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 491-502.

Stackebrandt, E., Sproer, C. *et al.* (1997). "Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis gen. nov.*, *comb. nov.*" Int J Syst Bacteriol **47**(4): 1134-1139.

Staddon, W.J., Trevors, J.T. *et al.* (1998). "Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada." Biodivers. Conserv. **7**: 1081-1092.

Stamatakis, A.P., Ludwig, T. *et al.* (2002). "AxML: A fast program for sequential and parallel phylogenetic tree computations based on the maximum likelihood method." Proceedings of 1. IEEE Bioinformatics Conference (CSB2002): 21-28.

Stams, A.J., Oude Elferink, S.J. *et al.* (2003). "Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria." Adv Biochem Eng Biotechnol **81**: 31-56.

Stams, A.J., Plugge, C.M. *et al.* (2005). "Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors." Water Sci Technol **52**(1-2): 13-20.

Stetter, K.O., Lauerer, G. *et al.* (1987). "Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: Evidence for a novel branch of archaebacteria." Science **236**: 822–824.

Steuber, J., Arendsen, A.F. *et al.* (1995). "Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)." Eur J Biochem **233**(3): 873-9.

Stubner, S. (2004). "Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR." J Microbiol Methods **57**(2): 219-30.

Stubner, S. und Meuser, K. (2000). "Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses." FEMS Microbiol Ecol **34**(1): 73-80.

Sung, Y., Ritalahti, K.M. *et al.* (2003). "Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis sp. nov.*" Appl Environ Microbiol **69**(5): 2964-74.

Tee, W., Dyall-Smith, M. *et al.* (1996). "Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess." J Clin Microbiol **34**(7): 1760-1764.

Teske, A., Ramsing, N.B. *et al.* (1998). "Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt)." Appl Environ Microbiol **64**(8): 2943-2951.

Ulrich, A.C. und Edwards, E.A. (2003). "Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures." Environ Microbiol **5**(2): 92-102.

USEPA (Stand 09.07.2009). "http://www.epa.gov/owow/wetlands/types/." United States Environmental Protection Agency.

Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A. *et al.* (2004). "*Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting." FEMS Microbiol Ecol **50**: 37-50.

Videla, H.A. (2000). "An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments." Biofouling **15**(1-3): 37-47.

Vladar, P., Rusznyak, A. *et al.* (2008). "Diversity of sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation-based and molecular approach." Microb Ecol **56**(1): 64-75.

von Wintzingerode, F., Göbel, U.B. *et al.* (1997). "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis." FEMS Microbiol Rev **21**: 213-229.

Wagner, M., Loy, A. *et al.* (2005). "Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes." Methods Enzymol **397**: 469-89.

Wagner, M., Roger, A.J. *et al.* (1998). "Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration." J Bacteriol **180**(11): 2975-2982.

Whitaker, R.J., Grogan, D.W. *et al.* (2003). "Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea." Science **301**(5635): 976-8.

White, C. und Gadd, G.M. (1998). "Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms." Microbiology **144**(5): 1407-1415.

White, C. und Gadd, G.M. (2000). "Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms." FEMS Microbiol Lett **183**(2): 313-318.

Widdel, F. (1980). Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduziernder Bakterien. Göttingen, Georg-August-Universität.

Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. Biology of anaerobic microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons**:** 469–585.

Widdel, F. und Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. The prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer. New York, Springer-Verlag. **3:** 3352–3378.

Widdel, F. und Pfennig, N. (1981). "Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. solation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei gen. nov., sp. nov.*" Arch Microbiol **129**: 395–400.

Wieland, A., Zopfi, J. *et al.* (2005). "Biogeochemistry of an iron-rich hypersaline microbial mat (Camargue, France)." Microb Ecol **49**(1): 34-49.

Wilms, R., Sass, H. *et al.* (2006). "Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2756-64.

Wind, T. und Conrad, R. (1995). "Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil." FEMS Microbiol Ecol **18**(4): 257-266.

Wind, T., Stubner, S. *et al.* (1999). "Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots." Syst Appl Microbiol **22**(2): 269-279.

Wu, M., Ren, Q. *et al.* (2005). "Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of Carboxydothermus hydrogenoformans Z-2901." PLoS Genet **1**(5): e65.

Würz, A. (1992). "Die Vegetation der Südtiroler Moore", Kölner Geogr. Schriften, H. 56, Universität Köln, 96 S.

Yannarell, A.C. und Triplett, E.W. (2005). "Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition." Appl Environ Microbiol **71**(1): 227-39.

Zverlov, V., Klein, M. *et al.* (2005). "Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited." J Bacteriol **187**(6): 2203-8.

I. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Leuten herzlich danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen haben:

- **Prof. Dr. Michael Wagner** und **Dr. Alexander Loy** für die Möglichkeit, diese Arbeit am Department für Mikrobielle Ökologie zu verfassen

- **Doris Steger** für die ausgesprochen nette, intensive und kompetente Betreuung, für die Einführung in die unendlichen Weiten des ARB, für ihre Geduld und ihren unerschütterlichen Optimismus

- **Christian Baranyi** für die ganze Sequenzierarbeit, die Tipps und Tricks in Bezug auf die DGGE und die statistische Auswertung der Bandenmuster

- **Sebastian Lücker** für die unzähligen ausgefochtenen Kämpfe mit meinem Computer und für viele gute Gespräche über die Wissenschaft und andere lebenswichtige Dinge

- Meinen Kollegen vom Department, allen voran **Stefan**, **Hanna**, **Kilian** und **Chrissy**, für die tolle Arbeitsatmosphäre und anregende fachliche Diskussionen, aber auch für die vielen unterhaltsamen (Poker-)Abende und Nächte

- **Anne**, **Tami** und **Nadine**, meinen Mädels, die von Anfang an mit mir die Höhen und Tiefen des Studentenlebens durchgemacht haben und ohne die die letzten fünf Jahre wohl ziemlich langweilig gewesen wären

- **Meinen Eltern** und **meiner Oma**, die immer für mich da sind, an mich glauben und mich trotzdem meinen eigenen Weg gehen lassen

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört."

Justus von Liebig (1803-1873)

J. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Christina Braunegger
Geburtsdatum:	13. August 1986
Geburtsort:	Steyr, Oberösterreich
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung

1992 - 1996	Volksschule Berggasse, Steyr
1996 - 2004	Bundesgymnasium Werndlpark, Steyr
2004 - 2009	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Genetik/Mikrobiologie an der Universität Wien
2008 - 2009	Diplomarbeit am Department für Mikrobielle Ökologie