Metagenom-Analysen zum PVC-Superphylum im anoxischen Reisfeldboden

Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jana Sabine Glöckner
aus Freiberg/Sachsen

Marburg/Lahn 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom August 2005 bis Juli 2008 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn PD Dr. Werner Liesack durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 27.10.2008

Erstgutachter: PD Dr. Werner Liesack
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel
Tag der Disputation: 30.10.2008

Für einen Teil dieser Dissertation ist ein Beitrag zur wissenschaftlichen Publikation geplant:

Glöckner, J., Kube, M., Reinhardt, R. and Liesack, W. First metagenomic data on members of the candidate divisions OP3 and BRC1. In Vorbereitung für die Einreichung bei „Microbiology“

Wissenschaftiche Beiträge auf Tagungen:

Glöckner, J. and Liesack, W. Metagenomic analysis of novel bacterial lineages in rice paddy soil. Jahrestagung der VAAM. März 2006. Osnabrück (Poster).

Glöckner, J., Kube, M., Reinhardt, R. and Liesack, W. Metagenomic analysis of novel bacterial lineages in rice paddy soil. 1st EuroDIVERSITY Conference. Oktober 2007. Marne-la-Vallée, France (Poster).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

Zusammenfassung V

I. Einleitung 1

1.1 Analyse der mikrobiellen Diversität 1

1.2 Entdeckung neuer bakterieller Entwicklungslinien 2

1.3 Metagenom-Analyse 7

1.4 Modellsystem: Gefluteter Reisfeldboden 8

1.5 Ziele der Arbeit 12

II. Material und Methoden 13

2.1 Sterilisationsverfahren 13

2.2 Chemikalien und Gase 13

2.3 Verwendete Organismen 13

2.4 Modellsystem: Mikrokosmen von geflutetem Reisfeldboden 14

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren 15

2.5.1 Extraktion von DNA aus Umweltproben 15

2.5.2 Extraktion hochmolekularer DNA 16

2.6 Genbanken 18

2.6.1 Größenselektion der HMW-DNA 18

2.6.2 Reparatur gescherter Enden der HMW-DNA 20

2.6.3 Ligation 21

2.7 Screening nach 16S rRNA-Genen der Zielgruppen 22

2.8 Langfristige Lagerung der Fosmid-Klone 23

2.9. Größenbestimmungen der klonierten genomischen Fragmente 23

2.10 Fosmid-Sequenzierung 24

2.11 Genannotation und Vorhersage der abgeleiteten Proteine 25

2.12 Anreicherungsexperimente 26

2.13 Chemische Analysen 28

2.13.1 Gaschromatographische Messungen von Methan und Kohlendioxid ... 28

2.13.2 Analyse organischer Säuren und Alkohole 29

2.13.3 Analyse anorganischer Ionen 30

2.14 PCR-Amplifikation 31

2.15 T-RFLP-Analyse 33
2.16 Erstellung von Klonbibliotheken 34
2.17 Sequenzierung 34
2.18 Vergleichende Sequenzanalyse 35
III. Ergebnisse 37
3.1 Mikrobielle Diversität neuer Entwicklungslinien 37
3.1.1 Untersuchung der mikrobiellen Diversität von *Planctomycetes* 37
3.1.2 Mikrobielle Diversität des BRC1 39
3.2 Extraktion von HMW-DNA aus Reisfeldboden 41
3.3 Aufbau von Genbanken 43
3.4 Analyse der Genbanken 43
3.4.1 PCR-basiertes Screening 43
3.4.2 Phylogenetische Diversität der Test-positiven Fosmid-Klone 44
3.4.3 Größenbestimmung der Genomfragmente 50
3.5 Analyse sequenzierter Genomfragmente 50
3.5.1 Das Genomfragment IV32F6 (OP3) 51
3.5.2 Das Genomfragment IV180F6 (OP3) 57
3.5.3 Das Genomfragment IV226A8 (NBL-UPA2) 61
3.5.4 Das Genomfragment V174F5 (BRC1) 67
3.5.5 23S rRNA-Gen-basierte Phylogenie 71
3.5.6 Taxonomische Zuordnung vorhergesagter Gene 72
3.6 Anreicherungskulturen aus geflutetem Reisfeldboden 75
3.6.1 Strategie der Anreicherung 75
3.6.2 Charakterisierung der ersten Anreicherungsstufe 76
3.6.2.1 Anreicherungen mit Propionat und Butyrat 77
3.6.2.2 Anreicherungskulturen mit Substratgemisch 78
3.6.3 Charakterisierung der zweiten Anreicherungsstufe 82
3.6.4 Selektive Anreicherungsexperimente 86
3.6.4.1 Versuch der Anreicherung neuer RC-I-*Archaea* 87
3.6.4.2 Versuch der Anreicherung von RC-III-*Archaea* 88
IV. Diskussion 91
4.1 Analyse der Genbanken 92
4.1.1 Charakterisierung der Genbanken 92
4.1.2 Phylogenetische Verteilung Test-positiver Genomfragmente 93

4.1.3 16S rRNA-Signaturnukleotide 95
4.1.4 Struktur der rRNA-Operons 96
4.1.5 23S rRNA-basierte Phylogenie 97
4.2 Charakterisierung der sequenzierten Genomfragmente.....98
4.2.1 GC-Gehalt 98
4.2.2 Vergleichende Analyse ausgewählter Sequenzinformationen 99
4.2.3 Taxonomische Zuordnung der vorhergesagten Proteine.....102
4.3 Anreicherungskulturen 106
Literatur.....112

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BRC1	Bacterial Rice Cluster 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-Wert	Erwartungswert
GC	Gaschromatograph
HMW	"High molecular weight", hochmolekular
HPLC	High performance liquid chromatography
IFAM	Stammsammlung Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel
LMP	Low Melting Point
mcrA	Gen für die α-Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase
MPN-PCR	"Most probable number"-Polymerase-Kettenreaktion
NBL-UPA	Novel lineage of uncertain phylogenetic affiliation
OP3	Obsidian Pool 3
ORF	"Open Reading Frame", offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PV	*Planctomycetes-Verrucomicrobia*
RC	Rice Cluster
SD	Subdivision
sp.	Art
T-RF	Terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
UQM	Stammsammlung University of Queensland, Department of Microbiology, St. Lucia, Queensland, Australia
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden Metagenom-Genbanken des Reisfeldbodens aufgebaut, die in der Zukunft für umfangreiche Fragestellungen zur Verfügung stehen. Die Genbanken wurden nach Genomfragmenten von Mitgliedern des *Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae* (PVC)-Superphylums untersucht. Neben Fosmid-Klonen der "candidate divisions" BRC1, OP3 und NBL-UPA2 wurden solche von Vertretern der *Verrucomicrobia* und *Planctomycetes*, insbesondere von Mitgliedern der Gattung *Pirellula*, nachgewiesen. Vier Genomfragmente von Vertretern des OP3, BRC1 und NBL-UPA2 wurden vergleichend sequenziert. Die 16S und 23S rRNA-Phylogenien bestätigen einen monophyletischen Ursprung des PVC-Superphylums. OP3 gruppierte in allen Phylogenien als Mitglied des PVC-Superphylums. BRC1 und WS3 gehören vermutlich ebenfalls diesem Superphylum an, was aber durch zusätzliche Analysen noch zu bestätigen ist. Die auf den OP3-Genomfragmenten lokalisierten rRNA-Operons haben eine typisch bakterielle Struktur mit der Genabfolge 16S, 23S und 5S rRNA. Die Annotation der ORFs ergab keine konkreten Anhaltspunkte, um eine spezifische Anreicherungsstrategie zu formulieren. OP3-Zellen besitzen vermutlich eine klassische Gram-negative Zellwand. ORFs auf dem BRC1-Genomfragment wurden in BlastP-Analysen vermehrt Mitgliedern der *Planctomycetes* zugeordnet, welches konsistent mit dessen vermuteten Zugehörigkeit zum PVC-Superphylum ist. Die OP3-Genomfagmente zeigten dagegen einen überraschend hohen Anteil an taxonomischen Zuordnungen zu Mitgliedern der *Deltaproteobacteria*. Es wird daher spekuliert, dass Mitglieder des OP3 in Analogie zu *Syntrophobacter* und *Pelobacter* einen syntrophen Stoffwechsel besitzen.

Darauf basierend wurden Anreicherungsstrategien formuliert, mit dem Ziel OP3-Genomfragmente, aber auch des BRC1, mit höherer Frequenz in Metagenom-Genbanken dieser biologischen Anreicherungen zu finden. Die Anreicherungen führten mit und ohne Zugabe von *M. formicicum* als potentiell syntrophen Partner nicht zum gewünschten Erfolg. Hingegen wurden mesophile Mitglieder der archaeellen Entwicklungslinien RC-I und RC-III in den angereicherten Konsortien nachgewiesen, deren relative Abundanz durch weitergehende Anreicherungs-versuche erhöht werden konnte.

I. Einleitung

Im Folgenden wird skizziert, wie sich unser Wissen über die mikrobielle Diversität mit der Anwendung kultivierungsunabhängiger Umweltanalyseverfahren revolutionierte. Nach einer Einführung in die Mitglieder der Phyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und weiterer neuer bakterieller Hauptentwicklungslinien, welche möglicherweise ein monophyletisches Superphylum bilden, werde ich die Methode der Metagenom-Analyse vorstellen. Vor der Präsentation meiner Aufgabenstellung werden das Modellsystems des gefluteten Reisfeldbodens sowie die bisher durchgeführten molekularökologischen Analysen kurz eingeführt.

1.1 Analyse der mikrobiellen Diversität

In der mikrobiellen Ökologie wird vor allem das 16S rRNA-Gen als Marker für die Analyse der phylogenetischen Diversität verwendet. rRNA kommt in allen Lebensformen ubiquitär vor. Der horizontale Transfer des 16S rRNA-Gens zwischen verschiedenen Organismen scheint nicht häufig stattgefunden zu haben. Daher kann die Akkumulation von Sequenzunterschieden in dem 16S rRNA-Molekül als ein Marker für die organismische Evolution betrachtet werden (Olsen und Woese, 1993). Das Vorhandensein von hoch konservierten und variablen Regionen erlaubt die Formulierung von Primern zum universellen Nachweis der mikrobiellen Diversität sowie zum spezifischen Nachweis phylogenetisch definierter Gruppen an Mikroorganismen. Die molekularökologischen Analysen über die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften mittels vergleichender 16S rRNA-Sequenzanalyse, T-RFLP- (terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus) Analyse oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zeigten, dass die in den Stammsammlungen hinterlegten Reinkulturen die tatsächliche phylogenetische Diversität der Mikroorganismen nicht korrekt widerspiegeln (Pace *et al*., 1997; Torsvik und Øvreås, 2002; Sait *et al*., 2002; Kirk *et al.*, 2004; Davis *et al*., 2005). Es wird daher vermutet, dass mit den traditionellen Standardmethoden weniger als 1% der Mikroorganismen kultiviert werden kann (Amann *et al*., 1995; Hugenholtz *et al*., 1998, 2002). Donarchie *et al.* (2007) verdeutlichten in einer Studie für verschiedene Standorte beispielhaft, dass die Ergebnisse von Kultivierungen und

Kultivierungsunabhängigen Analyseverfahren in seltenen Fällen überlappen, was zu komplett unterschiedlichen Schlussfolgerungen über die Mikrobiologie des betreffenden Ökosystems führen kann. Die weit verbreitete Anwendung der 16S rRNA-basierten Umweltanalyse führte zu dem Nachweis einer Vielzahl von bakteriellen Hauptentwicklungslinien, welche bisher nicht durch kultivierte Vertreter repräsentiert sind und als "*candidate divisions*" bezeichnet wurden (Abbildung 1, Hugenholtz *et al.*, 1998; Rappe und Giovannoni, 2003). Dabei handelt es sich um Entwicklungslinien, deren Mitglieder in phylogenetischen Analysen weniger als 85% Sequenzähnlichkeit zu 16S rRNA-Sequenzen bekannter Phyla zeigen und damit das Potential besitzen, eine neue Division darzustellen. Die Begriffe Division und Phylum werden als Synonym verwendet. Die Charakterisierung einer neuen *candidate division* sollte auf Basis mehrerer 16S rRNA-Gensequenzen erfolgen, welche in phylogenetischen Analysen reproduzierbar monophyletisch gruppieren und keine Verwandtschaft mit anderen Phyla der Domäne *Bacteria* aufweisen. Die in den letzten 30 Jahren gewonnenen Erkenntnisse der vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalyse stehen in guter Übereinstimmung mit dem 1977 eingeführten phylogenetischen Konzept und der Einteilung aller Lebensformen in die drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* (Woese *et al.*, 1977; Woese *et al*., 1987; Woese *et al*., 1990). Dieses phylogenetische Konzept der Lebewesen ist derzeit die Basis zur Identifikation neuer mikrobieller Isolate und zur Analyse der Zusammensetzung und Diversität mikrobieller Gemeinschaften.

1.2 Entdeckung neuer bakterieller Entwicklungslinien

Die *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* repräsentieren zwei Hauptentwicklungslinien innerhalb der Domäne *Bacteria*. Das Phylum *Planctomycetes* umfasst die vier Gattungen *Pirellula*, *Planctomyces*, *Gemmata* und *Isosphaera*. Die als "*candidate species*" beschriebenen vier Gattungen (Kuenenia, Brocadia, Scalindua und Anammoxoglobus) wurden auf der Grundlage von hoch angereicherten Konsortien beschrieben. Reinkulturen konnten bisher nicht erzielt werden. Diese Organismen sind zur anaeroben Ammonium-Oxidation befähigt.

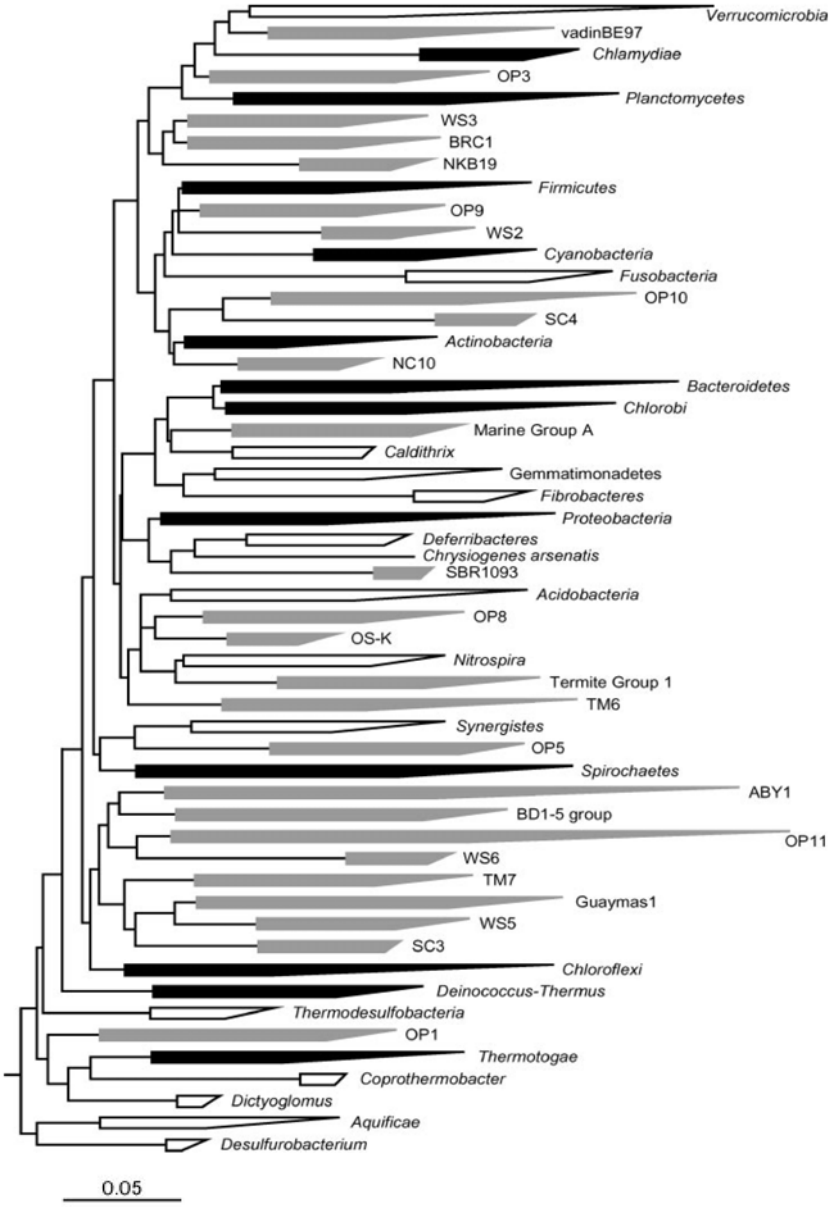

Abbildung 1: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, welche die Hauptentwicklungslinien der Domäne *Bacteria* zeigt (Rappe und Giovannoni, 2003). Der Stammbaum umfasst 12 Phyla, welche bereits von Carl Woese (1987) benannt wurden (Entwicklungslinien in schwarz). Weitere 14 Phyla wurden seit 1987 entdeckt und sind durch entsprechende Reinkulturen definiert (Entwicklungslinien in weiß). Insgesamt 26 der im Stammbaum abgebildeten Entwicklungslinien sind ausschließlich durch Umweltsequenzen definiert (sogenannte *candidate divisions*, Entwicklungslinien in grau).

Das Wissen über die phänotypischen Eigenschaften der *Planctomycetes* ist auf wenige kultivierte Vertreter beschränkt, die hauptsächlich aus marinen Systemen isoliert wurden (Fürst *et al.*, 1995). Exakte Kenntnisse über ihre Funktion in der Umwelt bzw. in den biogeochemischen Kreisläufen sind bisher kaum vorhanden.

Planctomycetes sind ubiquitär verbreitet, wie aus der Vielzahl unterschiedlicher Habitate geschlossen werden kann, aus denen 16S rRNA-Gensequenzen dieses Phylums erzielt wurden. Zu diesen Standorten gehören terrestrische und marine Systeme, Süßwasser, Moore, marine Schwämme und Kläranlagen (Gade *et al*., 2004; Chouari *et al*., 2005; Fieseler *et al*., 2006; Dedysh *et al*., 2006; Morris *et al*., 2006; Elshahed *et al.*, 2007). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von annotierten Genen auf den Genomen von Vertretern der *Planctomycetes* (*Rhodopirellula baltica* SH-1^T, *Blastopirellula marina* DSM 3645^T, *Planctomyces maris* DSM 8797^T und *Gemmata obscuriglobus* UQM 2246^T) sowie zweier Genomfragmente eines marinen Auftriebssystems kodieren vermutlich für Funktionen im C1-Metabolismus (Woebken *et al*., 2007). Diese Gene wurden bisher nur bei Mitgliedern der methanogenen *Archaea* und methylotrophen *Proteobacteria* identifiziert. Das führte zu der Vermutung, dass Vertreter der *Planctomycetes* eine bislang unbekannte Rolle im biogeochemischen Kreislauf von C1-Verbindungen spielen könnten (Bauer *et al*., 2004; Woebken *et al*., 2007). Der Nachweis einer großen Anzahl an vermutlich Sulfatase-kodierenden Genen in den Genomen mariner Planctomyceten ist ein Hinweis darauf, dass Mitglieder der *Planctomycetes* eine wichtige Funktion beim Recycling von Kohlenstoff komplexer sulfatierter Heteropolysaccharide besitzen (Woebken *et al*., 2007).

In der Vergangenheit wurde die phylogenetische Diversität des Phylums *Verrucomicrobia* durch 16S rRNA-Gensequenzen weniger Reinkulturen und durch eine Vielzahl an Umweltsequenzen definiert. Es wird geschätzt, dass Mitglieder der *Verrucomicrobia* etwa 10% der Gesamtzellzahl im Boden ausmachen (Sangwan *et al.*, 2005). Schlesner *et al.* (2006) formulierten sieben phylogenetisch kohärente Unterlinien bzw. Subdivisionen des Phylums *Verrucomicrobia*. In den letzten Jahren wurden neue Isolate kultiviert, die vor allem den Unterlinien 1, 3 und 4 zugeordnet wurden (Josephs *et al*., 2003; Sangwan *et al*., 2005; Yoon *et al*., 2007, 2008). Einzig die Unterlinien 5 und 6 umfassen ausschließlich 16S rRNA-Umweltsequenzen. Die kürzlich beschriebenen methanotrophen Vertreter "*Methyloacida kamchatkensis*", *Candidatus* Methylacidiphilum infernorum und "*Acidomethylosilex fumarolicum*" repräsentieren eine neue Unterlinie der *Verrucomicrobia* (Dunfield *et al*., 2007; Pol *et al*., 2007; Islam *et al*., 2008; Hou *et al*., 2008). In der Vergangenheit war eine methanotrophe Lebensweise ausschließlich für Mitglieder der *Alpha*- und *Gammaproteobacteria* bekannt.

Die molekularökologischen Analysen zur Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in marinen und terrestrischen Standorten weisen auf eine weitaus größere phylogenetische Diversität der *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* hin als bisher vermutet. Vergin *et al*. (1998) zeigten, dass die 16S rRNA-Gensequenzen der *Planctomycetes* Abweichungen in der hoch-konservierten Bindungsstelle des *Bacteria*-Primers 27f aufweisen. Diese Bindungsstelle wurde lange Zeit innerhalb der Domäne *Bacteria* als absolut konserviert betrachtet. Die häufige Verwendung des Primers 27f in Umweltanalysen könnte die Ursache dafür sein, dass die tatsächliche Abundanz von Vertretern der *Planctomycetes* und eng verwandter Mikroorganismen in einigen Standorten nicht entsprechend erfasst wurde.

Mitglieder der Phyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und *Chlamydia* besitzen gemeinsame Signaturnukleotide in mehreren Abschnitten der 16S rRNA-Gensequenz, welche für die Entwicklung spezifischer PCR-Primer genutzt wurden [*Escherichia coli* Positionen: Primer PLA40 (40-60); PLA46 (46-53); PLA58 (58-75); PLA886 (886-904)]. So wurde beispielsweise der spezifische Primer PLA40f kombiniert mit dem für die Domäne *Bacteria* universellen Primer 1492r als PVC-Assay bezeichnet (Derakshani *et al*., 2001). Die Anwendung dieser spezifischen Primersysteme in Analysen zur phylogenetischen Diversität führte zum Nachweis neuer, bakterieller Hauptentwicklungslinien, wie zum Beispiel OP3 ("Obsidian Pool" 3), WWE1 ("Wastewater of Evry 1"), WWE2, WWE3, OD1 (OP-derived 1), WS3 ("Wurtsmith aquifer") und *Poribacteria* (Neef *et al*., 1998; Freitag *et al*., 2003; Chouari *et al*., 2005; Elshahed *et al*., 2007; Kirkpatrick *et al*., 2006; Fieseler *et al*., 2006). 16S rRNA-basierte Phylogenien von Vertretern der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae, Lentisphaerae* und der *candidate divisions Poribacteria* und OP3 führten zu der Schlussfolgerung, dass sich diese Phyla monophyletisch von den Hauptentwicklungslinien der Domäne *Bacteria* abgrenzen und ein sogenanntes PVC-Superphylum bilden (Wagner und Horn, 2006; Abbildung 2).

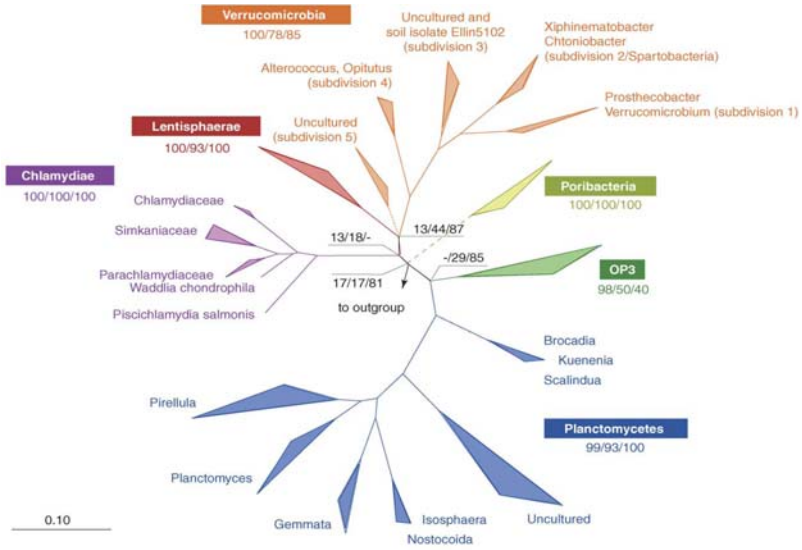

Abbildung 2: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, welches die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae* sowie den *candidate divisions* OP3 und *Poribacteria* als Mitglieder des PVC-Superphylums zeigt (Wagner und Horn, 2006).

Auf Basis von zwölf 16S rRNA-Gensequenzen aus geflutetem Reisfeldboden wurde die neue Hauptentwicklungslinie "*Bacterial Rice Cluster 1*" (BRC1) beschrieben, die im 16S rRNA-Stammbaum phylogenetisch mit der neuen Entwicklungslinie WS3 gruppiert (Derakshani *et al*., 2001). Der Nachweis weiterer 16S rRNA-Gensequenzen des BRC1 in anoxischen Standorten, wie beispielsweise in Kläranlagen, der anoxischen Zone des Schwarzen Meeres, marinem Sediment und einer hypersalinen mikrobiellen Matte, ließen vermuten, dass die Mitglieder dieser Entwicklungslinie einen anaeroben Stoffwechsel besitzen (Freitag *et al*., 2003; Chouari *et al*., 2005; Ley *et al*., 2006; Kirkpatrick *et al*., 2006). BRC1 wird aber bisher vor allem von Umweltsequenzen des Reisfeldbodens dominiert. Der numerische Anteil von BRC1 im Reisfeldboden wurde mittels MPN- ("*most probable number*") PCR auf 10^7 Zellen pro Gramm Boden Trockengewicht geschätzt (Derakshani, Dissertation).

Derakshani *et al*. (2001) detektierte in geflutetem Reisfeldboden auch 16S rRNA-Gensequenzen der neuen Hauptentwicklungslinie OP3. Der Nachweis von 16S rRNA-Gensequenzen des OP3 in verschiedenen aquatischen und terrestrischen Standorten, marinen Sedimenten, Mooren, Butyrat- und Propionat-abbauenden Chemostaten und in Proben aus der Ozeankruste deuten auf eine ubiquitäre

Verbreitung hin. Darüber hinaus wurden von Derakshani *et al*. (2001) 16S rRNA-Gensequenzen erzielt, die phylogenetisch keiner bekannten Entwicklungslinie zugeordnet werden konnten und als neue Linie "*novel bacteria of uncertain phylogenetic affiliation*" (NBL-UPA) 1 und 2 bezeichnet wurden. Allerdings gruppierte NBL-UPA2 in bakteriellen Stammbäumen mit der neuen Entwicklungslinie OP3, so dass ein gemeinsamer Ursprung für beide Entwicklungslinien vermutet wurde (Derakshani *et al*., 2001).

1.3 Metagenom-Analyse

Die vollständigen Genome der gesamten Mikrobiota einer Umweltprobe werden als Metagenom bezeichnet. Der Begriff Metagenom wurde von Handelsmann *et al*. (1998) geprägt. Mittels einer Metagenom-Analyse kann theoretisch die gesamte mikrobielle Fraktion eines Standortes erschlossen werden. DNA hoher Qualität und Reinheit wird aus einer Umweltprobe extrahiert und in einen entsprechenden Vektor kloniert (Abbildung 3). Die Analyse von Genbanken erfolgt nach zwei prinzipiell unterschiedlichen Verfahren. Funktionelle Analysen werden vor allem mit der Zielsetzung durchgeführt, neue Antibiotika und Biokatalysatoren für medizinische und industrielle Anwendungen zu identifizieren und zu entwickeln (Handelsman, 2004; Daniel, 2005). Es wird angestrebt, die Expression bestimmter Enzyme oder Verbindungen über spezifische Assays nachzuweisen. Bei der Sequenz-basierten Umwelt-Analyse werden die Genbanken entweder in Hinblick auf Genomfragmente von bestimmten Vertretern der gesamten Mikrobiota mittels phylogenetischen Markergenen oder komplette Ökosysteme mittels Shotgun-Sequenzierung untersucht (Riesenfeld *et al*., 2004; Streit und Schmitz, 2004; Venter *et al*., 2004; Tyson *et al*., 2004; Hallam *et al*., 2004; Tringe *et al*., 2005; Green und Keller, 2006).

Beja *et al*. (2000) identifizierten beispielsweise auf einem Genomfragment eines marinen, nicht-kultivierten Gammaproteobakteriums (SAR86-Gruppe) ein Protein-kodierendes Gen für einen neuen Rhodopsin-Typ (Proteorhodopsin), einer Licht-betriebenen Protonenpumpe. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte signifikante Homologien mit dem bekannten archaeellen Rhodopsin. In weiteren Studien wurde eine hohe Abundanz dieser Gammaproteobakterien-Gruppe in marinen Systemen nachgewiesen, welches mit der Beschreibung einer neuen phototrophen Lebensweise einherging. Die ersten genetischen und physiologischen

Informationen und die vollständig rekonstruierten Genome bisher nicht-kultivierter Mikroorganismen gaben neue Einblicke in die Mikrobiologie der Prokaryoten, deren Existenz bisher fast ausschließlich von 16S rRNA-basierten Umweltanalysen bekannt war (Vergin *et al*., 1998; Rondon *et al*., 2000; Quaiser *et al*., 2002, 2003; Ricke *et al*., 2005; Woyke *et al*., 2006; Erkel *et al*., 2006; Strous *et al*., 2006; Warnecke *et al*., 2007; Pelletier *et al*., 2008).

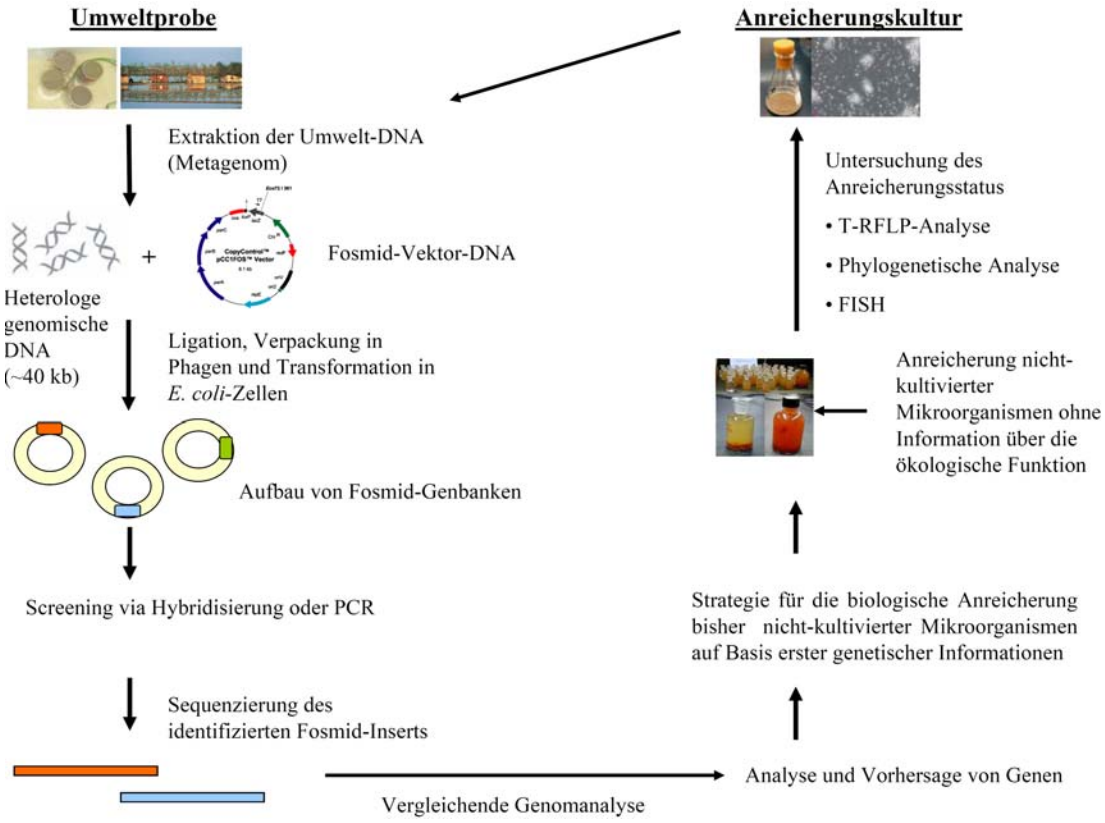

Abbildung 3: Schematische Darstellung von Metagenom-Analysen und der Formulierung möglicher Anreicherungsstrategien. Hochmolekulare DNA wird aus einer Umweltprobe isoliert, welche in BAC- oder Fosmid-Vektoren ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert wird. Die Genbanken werden nach Assay-positiven Genomfragmenten untersucht. Mit der Auswertung der kompletten Sequenzinformation dieser Genomfragmente können beispielsweise erste Einblicke in die Genome von Vertretern nicht-kultivierter Mikroorganismen gewonnen werden. Im Idealfall werden Informationen zur selektiven Anreichung neuer Mikroorganismen erzielt. Darüber hinaus könnte der Nachweis einer biologischen Anreicherung von bisher nicht-kultivierten Zielorganismen Ausgangspunkt für weitere Metagenom-Analysen der angereicherten Konsortien sein.

1.4 Modellsystem: Gefluteter Reisfeldboden

Das Modellsystem des gefluteten Reisfeldbodens ist seit fast zwei Jahrzehnten am MPI für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Biogeochemie Gegenstand

vieler Prozessmessungen und Analysen zu Struktur- und Funktionsbeziehungen mikrobieller Gemeinschaften. Geflutete Reisfelder sind eine wichtige Quelle des klimarelevanten Spurengases Methan. Daher wird versucht die Prozesse, die zur Methanproduktion führen aber auch die Interaktion der Mikroorganismen mit der Reispflanze besser zu verstehen. Als Treibhausgas ist Methan etwa 20-mal effizienter als Kohlendioxid. In den letzten 250 Jahren ist die Methankonzentration in der Atmosphäre um 148% gestiegen (IPCC 2007). Zu den bedeutendsten Methanquellen zählen natürliche Feuchtgebiete, Reisfelder, Wiederkäuer, Termiten und Methanhydrate. Die Methanemission aus Biomasseverbrennung, Mülldeponien, Kläranlagen und der Förderung von fossilen Brennstoffen ist hingegen ummittelbar anthropogenen Ursprungs.

Durch die Anbau-bedingte Flutung von Reis wird der Boden anoxisch und vorübergehend ein anaerobes Süßwasserhabitat. Je nach Bewässerungsform lassen sich vier Kategorien von Reisökosystemen unterscheiden: Beflutung (52% der globalen Anbauflächen), Flachland (27%), Tiefwasser (10%) und Hochlandreis ohne Beflutung (11%) (Minamikawa *et al*., 2006, Waßmann und Renneberg, 1996). Gefluteter Reisfeldboden wird basierend auf den verschiedenen physikochemischen Bedingungen in distinkte Kompartimente gegliedert, die eine definierte Strukturierung des Ökosystems mit sich bringt. Diese Kompartimente sind die oxische Flutungszone, der anoxische Boden sowie die Rhizosphäre der Reispflanze mit den Wurzelexsudaten. Im Fall der Flutung wird Sauerstoff im Boden mikrobiell schnell aufgezehrt, wodurch sich im Boden ein steiler Sauerstoffgradient einstellt. Die mikrobiellen Populationen in der etwa 2 mm tiefen oxischen Zone werden vor allem von Mitgliedern der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria* dominiert (Luedemann *et al*., 2000; Noll *et al*., 2005). Im gefluteten Boden unterhalb der oxischen Zone wird das organische Material durch die sequentielle Reduktion der verfügbaren Elektronenakzeptoren (O_2 >NO_3^- >Mn(IV) >Fe(III) >SO_4^{2-} >CO_2) oxidiert (Liesack *et al*., 2000). In der Interphase kommt es zu einer Regeneration der alternativen Elektronenakzeptoren. Bei Abwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren wird in der anoxischen Zone Methan als Endprodukt des anaeroben Abbaus gebildet. Die bakterielle Komponente im anoxischen Reisfeldboden wird vor allem von Mitgliedern der *Clostridia*, *Bacilli*, *Actinobacteria, Bacteroidetes* und *Verrucomicrobia* dominiert (Chin *et al*., 1998, 1999b; Hengstmann *et al*., 1999; Luedemann *et al*., 2000; Weber *et al*., 2001;

Akasaka *et al*., 2003; Scheid *et al*., 2004; Noll *et al*., 2005). Die Analyse der Zusammensetzung der archaeellen Komponente im gefluteten Reisfeldboden führte zum Nachweis von fünf neuen Entwicklungslinien (Rice Cluster I-V) innerhalb des Phylums *Euryarchaeota* (Großkopf *et al*., 1998b). Mitglieder des Rice Cluster III (RC-III) gruppieren zum Beispiel mit Vertretern der *Thermoplasmatales*. Es wird spekuliert, dass diese Organismen Oligopeptide fermentieren (Kemnitz *et al*., 2005). Die archaeelle Komponente wird im Reisfeldboden, vor allem aber in der oxisch-anoxischen Rhizosphärenzone, von Vertretern des Rice Cluster I (RC-I) dominiert (Lueders *et al*., 2001; Chin *et al*., 2004; Krüger *et al*., 2005). Lu und Conrad lieferten 2005 einen experimentellen Nachweis für diese allgemeine Dominanz. Dabei wurden geflutete Reispflanzen mit $^{13}CO_2$ inkubiert, welche daraufhin das $^{13}CO_2$ in die Blätter aufnahmen. Das markierte ^{13}C war relativ schnell im $^{13}CH_4$ des Porenwassers und in der Atmosphäre der Kammer, welche über die Reispflanze montiert wurde, nachweisbar. Mittels stabiler Isotopenbeprobung und der vergleichenden Sequenzanalyse wurde gezeigt, dass in der Rhizosphäre vor allem Mitglieder des RC-I das $^{13}CO_2$ inkooperierten. Daraus wurde geschlussfolgert, dass RC-I eine bedeutende Rolle bei der Methanproduktion und infolgedessen für die Methanemission im Reisfeldboden spielt. Der erste kultivierte Vertreter (*Methanocella paludicola* DSM 17711^T) des RC-I wurde kürzlich von Sakai *et al*. (2007, 2008) beschrieben. Die Entwicklungslinie RC-I wird jetzt als Order *Methanocellales* bezeichnet. In dieser Arbeit wird hingegen die Bezeichnung RC-I weiterhin verwendet.

Das durch RC-I und andere methanogene Populationen produzierte Methan entweicht in die Atmosphäre entweder durch diffusiven Transport über das intrazelluläre System bzw. Aerenchym der Reispflanze (~90%) oder in Form von Gasblasen an der Wasseroberfläche (~10%). Gegenläufig zum Methan diffundiert Sauerstoff durch das Aerenchym in die Wurzeln der Reispflanze und teilweise auch in den angrenzenden Boden. In dieser oxisch-anoxischen Interphase innerhalb der Rhizosphäre wie auch der Flutungszone sind methanotrophe Bakterien aktiv, die einen erheblich Teil des biogen produzierten Methans zu Kohlendioxid und Wasser re-oxidieren, noch bevor es in die Atmosphäre gelangt.

Der Abbau des organischen Materials im anoxischen Reisfeldboden erfolgt durch das Zusammenspiel von mikrobiellen Populationen verschiedener trophischer Ebenen (Abbildung 4). Während des primären Fermentationsschrittes werden

Polymere, wie Lignin, Cellulose und Hemicellulosen, zu Oligo- oder Monomeren hydrolisiert. Diese Zwischenprodukte werden zu Fettsäuren, Succinat, Alkoholen, Lactat, Acetat und H_2 und CO_2 fermentiert, die dann in einem sekundären Fermentationsschritt zu Acetat, CO_2 und H_2 umgesetzt werden. Wasserstoff und Kohlendioxid bzw. Acetat werden letztendlich von hydrogenotrophen bzw. acetoklastischen methanogenen *Archaea* zu Methan umgesetzt. Die Oxidation von organischen Säuren, Alkoholen, Acetat und H_2 ist unter Standardbedingungen (p_{H2} =1 atm) thermodynamisch sehr ungünstig. Werden in einem angereicherten Konsortium beispielsweise hydrogenotrophe Methanogene aktiv, wird der Wasserstoffpartialdruck deutlich reduziert (p_{H2} $<10^{-3}$-10^{-4} atm). Unter diesen Bedingungen ist die Fermentation von organischen Säuren, Alkoholen, Acetat und H_2 thermodynamisch günstiger. Diese besondere Form der symbiotischen Beziehung, in welcher beispielsweise die Aktivität eines fermentierenden Bakteriums von der Kooperation mit einem methanogenen Partnerorganismus abhängt, wird als Syntrophie bezeichnet (Traore *et al*., 1983; Stams *et al*., 2006).

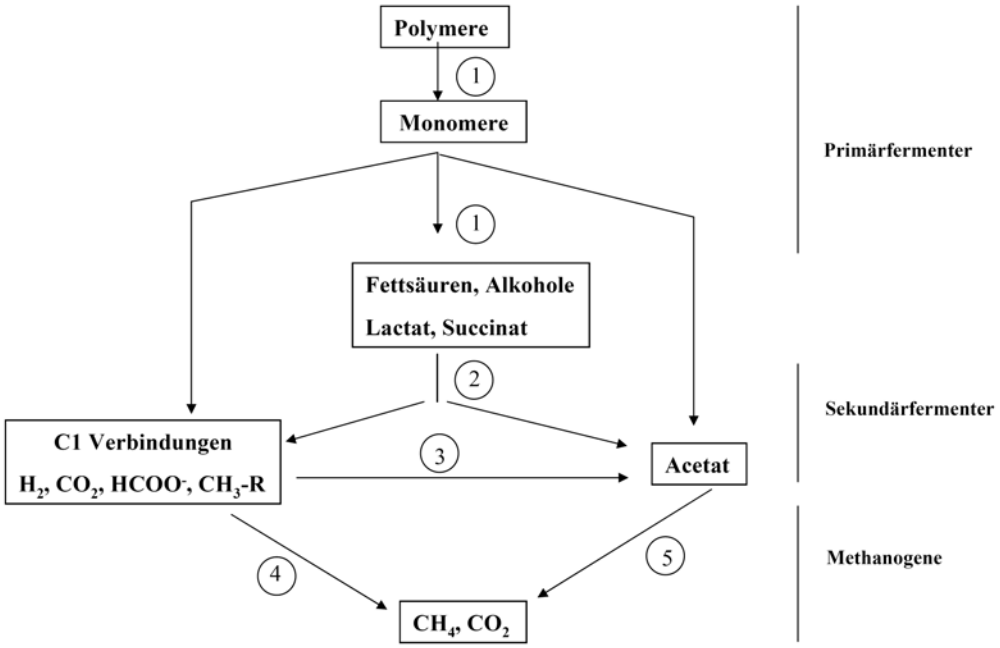

Abbildung 4: Kohlenstoffffluss während des anaeroben Abbaus komplexen organischen Materials durch Mikroorganismen unterschiedlicher trophischer Ebenen. (1) primär fermentierende Bakterien; (2) sekundär (syntroph) fermentierende Bakterien; (3) homoacetogene Bakterien; (4) hydrogenotrophe Methanogene; (5) acetoklastische Methanogene (nach Schink, 1997; Schink und Stams, 2006)

1.5 Ziele der Arbeit

Kultivierungsunabhängige Analysen zur phylogenetischen Diversität von Mitgliedern des PVC-Superphylums im gefluteten Reisfeldboden gaben Hinweise auf die Existenz neuer bakterieller Entwicklungslinien, wie beispielsweise BRC1 und OP3. Da bisher keine Reinkulturen vorliegen, existieren für BRC1 und OP3 keine über die 16S rRNA-Phylogenie hinausgehenden Informationen. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war daher mittels Metagenom-Analyse erste genetische Informationen über diese Organismen zu erzielen. Zu diesem Zweck sollten Metagenom-Genbanken des gefluteten Reisfeldbodens generiert werden, die in Zukunft gleichermaßen für anderweitige Fragestellungen zur Verfügung stehen. Die erste Aufgabe war demzufolge eine zuverläßliche Methode zur Extraktion hochmolekularer DNA aus Reisfeldboden zu etablieren. Mit dem spezifischen 16S rRNA-basierten PVC-Assay sollten die Genbanken im Anschluss nach Genomfragmenten von Mitgliedern des PVC-Superphylums untersucht werden. Die vergleichende Sequenzierung ausgewählter Genomfragmente der Zielgruppen sollte erste Hinweise auf mögliche phänotypische Charakteristika und auf Erfolg versprechende Strategien zur gezielten biologischen Anreicherung von Mitgliedern des BRC1 und OP3 erbringen.

Parallel dazu sollte eine biologische Anreicherung von Vertretern des BRC1 und OP3 angestrebt werden. Dabei war das Ziel, Metagenom-Analysen von angereicherten Konsortien durchführen zu können, so dass sich die Anzahl der Genomfragmente der Zielgruppen gegenüber denjenigen des inkubierten Reisfeldbodens grundlegend erhöht.

II. Material und Methoden

2.1 Sterilisationsverfahren

Die verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden mit vollentsalztem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren (20 min, 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, CA-S, Schleicher und Schuell) und unter sterilen Bedingungen verwendet. Thermostabile Materialien wurden durch Hitzesterilisation (4 h bei 180°C) keimfrei gemacht.

2.2 Chemikalien und Gase

Die Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), B. Braun Biotech International (Melsungen), Bio-Rad Laboratories (München), Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf), Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA), Eppendorf AG (Hamburg), Epicentre® Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA), Eurogentec (Köln), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs, Schweiz), GE Healthcare (München), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Kleinfeld (Gehrden), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet. Die technischen Gase wurden von der Messer Group (Sulzbach) bezogen.

2.3 Verwendete Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Mikroorganismen gearbeitet: *Escherichia coli* EPI300™ (Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA), *Escherichia coli* TOP10 (TOPO-TA Cloning®-Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande), *Methanospirillum hungatei* DSM 684^T und *Methanobacterium formicicum* DSM 1535^T. Die hydrogenotrophen Methanogenen *Methanospirillum hungatei* DSM 684^T und *Methanobacterium formicicum* DSM 1535^T wurden in modifiziertem DSM-Medium 119 angezogen. Dem Mineralsalzmedium (pro Liter: 2 g NaCl, 1 g KCl, 0,8 g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$, 0,2 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 0,6 g NH_4Cl,

0,4 g KH_2PO_4) wurden 30 mM Natriumcarbonat-Puffer, jeweils 1 ml Spurenelement-Lösung SL10, 1 ml der Vitamin-Lösungen 3 und 7, 1 ml Se-W-Lösung, 1 ml eines Gemisches aus verzweigten Fettsäuren (5 mM Stammlösung: 0,068 g Phenylacetat, 0,075 g Phenylpropionat, 0,076 g 4-Hyroxyphenylacetat, 0,088 g 3-Indolacetat in 20 mM NaOH gelöst) und 1 ml eines Gemisches aus aromatischen Fettsäuren (25 mM Stammlösung: 0,22 g i-Buttersäure, 0,255 g DL-2-Methylbuttersäure, 0,26 g n-Valeriansäure, 0,255 g i-Valeriansäure in 0,1 M NaOH gelöst) zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl und 0,5 M Na_2CO_3 auf pH 7 eingestellt. Das Medium wurde zusätzlich mit 0,1% Casaminosäuren und 0,1% Hefeextrakt versetzt. Für das Wachstum der hydrogenotrophen Methanogenen wurde ein Gemisch aus 12 mM Acetat und 29 mM Formiat sowie eine Gasphase aus H_2/CO_2 (80%/20%) verwendet. Als Reduktionsmittel diente 1 mM Natriumdithionit. Die Methanogenen wurden bei 37°C inkubiert. Die beiden *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (1% Trypton, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, pH 7) unter Zusatz verschiedener Antibiotika bei 37°C kultiviert.

2.4 Modellsystem: Mikrokosmen von geflutetem Reisfeldboden

Für die Untersuchungen wurde Reisfeldboden von einem Versuchsfeld des italienischen Reisforschungsinstituts in Vercelli (Italien) verwendet. Vor der Herstellung von gefluteten Mikrokosmen wurde der getrocknete Boden auf eine Korngröße von 2 mm gesiebt und anschließend in einem Verhältnis von 2:1 mit entsalztem Wasser gemischt. Die Bodensuspension wurde in einem Mikrokosmos mit einem Durchmesser von 6,2 cm und einer Tiefe von 10 cm gefüllt. Die Mikrokosmen wurden mit einer Wasserschicht von 1 cm überflutet und bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Die Messungen von Sauerstoffprofilen in den gefluteten Mikrokosmen hatten in vorherigen Studien gezeigt, dass die oxische Zone etwa 2 mm tief ist (Luedemann *et al*., 2000; Noll *et al*., 2005). Daher wurde der obere Zentimeter des Bodenkerns mit einem sterilen Spatel entfernt und die anoxische Zone beprobt. Die Bodenprobe wurde dann homogenisiert.

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Extraktion von DNA aus Umweltproben

Die DNA-Extraktion aus dem inkubierten Reisfeldboden wurde entsprechend dem Protokoll von Henckel *et al*. (1999) durchgeführt. Die Bodenprobe (0,5 g) wurde in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 0,5 g Glaskugeln (ø 0,17–0,18 mm, Braun, Melsungen) versetzt. Nach der Zugabe von 800 µl Natriumphosphat-Puffer (120 mM, pH 8) und 260 µl SDS-Puffer (10% SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 8, 0,1 M NaCl) wurde die Suspension kräftig durchmischt. Die Zellen wurden in einer Zellmühle mechanisch für 45 s und mit einer Geschwindigkeit von 6,5 ms^{-1} (FastPrep, Bio 101, Savant, Thermo Scientific, Waltham, USA) aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (15 min, 14000 × *g,* RT) wurde der Überstand in ein neues 2-ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 600 µl Natriumphosphat-Puffer resuspendiert und das Lyseverfahren wiederholt (15 min, 14000 × *g*, RT). Die Überstände (≈1200 µl) wurden vereint und erneut zentrifugiert (10 min, 14000 × *g*, RT), um alle Bodenpartikel zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in ein 2-ml "*Phase Lock*" Gel Heavy™ Reaktionsgefäß (5 Prime, Eppendorf, Hamburg) überführt. Diese Reaktionsgefäße wurden vor der Verwendung nach Herstellerangaben (5 min, 14000 × *g*, RT) zentrifugiert. Der DNA-Überstand (600 µl) wurde mit 600 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, Fluka, Buchs, Schweiz) gut durchmischt. Die wässrige Phase wurde durch Zentrifugation (5 min, 14000 × *g*, RT) von der organischen Phase getrennt und in ein neues *Phase Lock* Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 600 µl Chloroform:Isoamyl-alkohol (24:1) zur wässrigen Phase gegeben und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 × *g*, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen 100%igem Isopropanol gefällt und für 60 min bei 14000 × *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach der Zentrifugation (15 min, 14000 × *g*, RT) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet getrocknet (Vacufuge Concentrator™ 5301, Eppendorf, Hamburg). Die DNA wurde in 150-500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Aufgrund der Koextraktion von Huminsäuren und Salzen wurden die DNA-Eluate mit dem Wizard®DNA Clean-Up Kit (Promega, Mannheim) zusätzlich aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution der

aufgereinigten DNA erfolgte in TE-Puffer. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde im Spektrophotometer (NanoDrop 1000 Technologies, Delaware, USA) bestimmt.

2.5.2 Extraktion hochmolekularer DNA

Erarbeitung geeigneter Extraktionsverfahren: Für die Extraktion sehr reiner, hochmolekularer (high molecular weight, HMW) DNA aus inkubierten Reisfeldboden wurden verschiedene Verfahren für die direkte und indirekte Zelllyse getestet. Um die Scherkräfte bei der HMW-DNA-Extraktion zu minimieren, wurde das Probenmaterial mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert. Die direkte Lyse der Zellen in der Boden-Zell-Suspension wurde nach dem Protokoll von Ricke *et al*. (2005) durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde im Anschluss mit verschiedenen Extraktionskits aufgereinigt [Fast DNA Spin Kit for soil (Qbiogene, Hilden), Soil Master DNA Extraction Kit (Epicentre), Pesto Spin D DNA Extraction Kit (Molzym, Bremen), Ultra Clean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc, Carlsbad), Power Soil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories) und Genomic tips 20G (Qiagen, Hilden)]. Die Auftrennung der eluierten DNAs mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zeigte, dass mit den kommerziellen Kits nur DNA in einem Größenbereich zwischen 15 und 20 kbp extrahierbar war. Daher wurde anschließend ein indirektes Lyseverfahren getestet, bei der die Zellen vor der Lyse von den Bodenpartikeln durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Die Bodenprobe wurde über Nacht in Tris-HCl-Puffer (120 mM, pH 7,2) in einem Verhältnis 1:5 bei 4°C und 150 rpm inkubiert. Die größeren Bodenpartikel wurden durch zweifache Zentrifugation (15 min, 800 × *g*, RT; 15 min, 1000 × *g*, RT) abgetrennt. Die mikrobielle Fraktion wurde durch erneutes Zentrifugieren (50 min, 4000 × *g*, RT) pelletiert. Das Zellmaterial wurde in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden entweder ohne vorhergehende Einbettung entsprechend dem Protokoll von Ricke *et al*. (2005) und Padmanabhan *et al*. (1998) oder nach Einbettung in "Low melting point"-Agarose (LMP, Certified™ Low Melt Agarose, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach den Protokollen von Quaiser *et al.* (2002) und Dedysh *et al*. (1998) lysiert. Für die Quantifizierung und die Kontrolle der Qualität wurden die DNA-Eluate auf 1%igen Pulsfeldgelen [1,5 g PFGE-Agarose (Bio-Rad) in 0,5 × TBE-Puffer (pro Liter: 10,78 g Tris, 5,50 g Borsäure,

0,58 g EDTA, pH 8)] mittels PFGE aufgetrennt. Die DNA-Lösungen wurden in eine Tasche im oberen Teil des Pulsfeldgels pipettiert und mit 1%iger LMP-Agarose (1,5 g LMP-Agarose in 150 ml 0,5 × TBE-Puffer) verschlossen. Die Agarosewürfel wurden in die Taschen des Pulsfeldgels überführt und diese ebenfalls mit 1%iger LMP-Agarose abgedichtet. Für die Auftrennung der DNA aus den Agarosenudeln wurde im Pulsfeldgel etwa 1 cm ober- und unterhalb der Taschen ausgeschnitten. Jeweils eine Tasche wurde an den beiden Außenrändern des Pulsfeldgels erhalten. Ein neuer, etwa 0,5 cm hoher Taschenboden wurde mit 1%iger PFGE-Agarose erzeugt. Die Agarosenudeln wurden auf den neuen Taschenboden überführt und mit 1%iger PFGE-Agarose abgedichtet. Für die Größenbestimmung wurden Mid Range und Low Range PFGE-Marker [New England Biolabs (NEB), Frankfurt] verwendet. Die PFGE-Marker wurden vom Hersteller in Agarose polymerisiert in Form einer Spritze geliefert. Ein etwa 1 mm schmales Stück des Markers wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und in die Taschen am Außenrand des Pulsfeldgels überführt. Die Taschen wurden mit 1%iger PFGE-Agarose verschlossen. Nach der Polymerisation wurde das Pulsfeldgel in die CHEF-III-DR™ Apparatur (Bio-Rad) überführt. Die PFGE erfolgte in 0,5 × TBE-Puffer bei 14°C. Der Winkel zwischen den beiden Laufrichtungen betrug bei allen während dieser Arbeit durchgeführten PFGE-Läufen 120°. Die Auftrennung der HMW-DNA erfolgte für 15 bis 24 h mit einer Frequenz des Spannungsquellenwechsels von 1 bis 12 s und einer Fließgeschwindigkeit von 6 V/cm. Nach Beendigung des Laufs wurde das Pulsfeldgel in 0,005%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht mittels einer Geldokumentationsanlage (Intas UV Systeme, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) dargestellt. Die PFGE zeigte, dass mit der Einbettung der Boden-Zell-Suspension in LMP-Agarose HMW-DNA bis zu einer Größe von 245 kbp extrahiert werden kann. Damit war diese Methode für die Isolierung von HMW-DNA in einem Größenbereich von 35 bis 48 kbp und für den Aufbau von Fosmid-Genbanken geeignet.

Quantitative Extraktion von HMW-DNA: Für die quantitative HMW-DNA-Isolierung wurden daher 50 g Reisfeldboden in 300 ml Bodenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM ε-Aminocapronsäure) in einem 1-l Erlenmeyerkolben aufgeschlämmt und bei 150 rpm und 4°C inkubiert. Das dipolare Ion ε-Aminocapronsäure besitzt eine hydrophobe Bindestelle und soll die Dissoziation der Zellen von dem gesiebten Bodenpartikeln unterstützen. Nach 15 h

Inkubation wurde die Boden-Suspension in 500 ml BSA-Zentrifugationsgefäßen für 30 min bei 11000 rpm und 4°C (Sorvall RC 5B Plus Centrifuge, Thermo Scientific) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Boden-Zell-Pellet wurde sehr vorsichtig, ohne kräftiges Schütteln, in 8 ml Bodenpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf 45°C temperiert. Anschließend wurde die Boden-Zell-Suspension in LMP-Agarose eingebettet. Dafür wurde die 4%ige LMP-Agarose in sterilem H_2O gelöst und auf 45°C temperiert. Die Boden-Zell-Suspension und die Agaroselösung wurden in einem Verhältnis von 7:1 vorsichtig, ohne kräftiges Schütteln, durchmischt. Das Gemisch wurde in eine 1-ml Spritze aufgezogen und auf Eis gelagert. Nach 1 h Polymerisation wurden die Agarosenudeln aus der Spritze gedrückt und in ein steriles 50-ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Agarosenudeln in 50 ml Lysis-Puffer (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 0,2% Natriumdeoxycholat, 1% Natrium-N-Lauroylsarcosin, 1 mg/ml Lysozym) bei leichtem Schütteln (80 rpm) inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation wurde der Lysis-Puffer dekantiert und durch EPS-Puffer [0,5 M EDTA, pH 8, 1% Natrium-N-Lauroylsarcosin, 350 µl Proteinase K (20 mg/ml)] ersetzt. Die Agarosenudeln wurden bei 50°C für 24 h inkubiert und das Gefäß gelegentlich per Hand geschüttelt. Der EPS-Puffer wurde nach 24 h ausgetauscht und für weitere 24 h bei 50°C inkubiert. Die Agarosenudeln wurden dreimal mit TE-Puffer für je 1 h bei 150 rpm und 25°C gewaschen. Die Agarosenudeln wurden in einem definierten Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA) bei 4°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.6 Genbanken

2.6.1 Größenselektion der HMW-DNA

Quantitative PFGE: Die Auftrennung der HMW-DNA aus den Agarosenudeln erfolgte mittels PFGE. Huminsäuren, die während der Extraktion an die DNA binden und koextrahiert werden, wurden mit einem Zwei-Phasen-Pulsfeldgel entfernt. Für die Elution der HMW-DNA aus dem Pulsfeldgel wurde das Gel mit Enzymen verdaut, deren Aktivität nur bei LMP-Agarose gewährleistet ist (Abbildung 5). Dafür wurde ein 1,5%iges LMP-Agarosegel hergestellt. Nach der Polymerisation wurde etwa ein Fünftel des oberen Gels entfernt und mit einer

Lösung aus 1,5%iger PFGE-Agarose und 2%igem Polyvinylpyrrolidon K 90 (Fluka) aufgefüllt. Ein Kamm wurde in diesen Bereich des Pulsfeldgels eingeführt. Ein etwa 0,5 cm großer Bereich um die Taschen des Pulsfeldgels wurde ausgeschnitten und der Boden mit 1%iger PFGE-Agarose abgedichtet. Zwei Geltaschen an den Außenrändern wurden erhalten. Sechs Agarosenudeln wurden in den neu polymerisierten Boden gelegt und mit 1%iger PFGE-Agarose verschlossen. Die PFGE-Marker (Mid Range und Low Range PFGE-Marker) wurden in die Taschen am Außenrand des Pulsfeldgels transferiert und mit 1%iger PFGE-Agarose verschlossen. Die Auftrennung der HMW-DNA erfolgte in 0,5 × TBE-Puffer bei 14°C für 20 bis 24 h mit einer Frequenz des Spannungsquellenwechsels von 1 bis 15 s und einer Fließgeschwindigkeit von 6 V/cm. Nach der Elektrophorese wurde das Pulsfeldgel in vier Teile geschnitten (Abbildung 5).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der methodischen Schritte zur Isolierung von HMW-DNA. Die HMW-DNA wird aus den Agarosenudeln mittels PFGE aufgetrennt. Nach der Größenselektion wurde das Pulsfeldgel dokumentiert, um die Größe und Menge der aufgetrennten HMW-DNA abzuschätzen.

Die zwei Außenränder mit den PFGE-Markern und ein etwa 1-cm großer Abschnitt mit aufgetrennter HMW-DNA wurde abgeschnitten. Der Gelabschnitt mit den eingebetteten Agarosenudeln wurde entfernt. Die Teilstücke des Pulsfeldgels wurden in 0,005%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt. Nach 30 min wurde der 145 bis 245 kbp Größenbereich der PFGE-Marker unter UV-Licht vorsichtig durch Einschnitte mit einem Skalpell markiert. Das nicht gefärbte Hauptstück wurde zwischen die markierten und gefärbten Gelabschnitte gelegt. Das Hauptstück hatte keinen Kontakt mit Ethidiumbromid oder UV-Licht. Anhand der eingeschnittenen Größenbereiche der Marker wurde der etwa 145 bis 245 kbp große Bereich der aufgetrennten HMW-DNA ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde mit dem Skalpell

in etwa ein Gramm große Stücke geschnitten und in 2-ml Reaktionsgefäße überführt. Der verbliebene Rest des Hauptstückes wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Pulsfeldgel wurde vollständig zusammengefügt und unter der UV-Lampe dokumentiert (Abbildung 5).

Extraktion der HMW-DNA aus den LMP-Agarosestücken: Die Agarosestücke wurden mit 0,1 Volumen 10 × β-Agarasepuffer (NEB) für 15 min bei 65°C geschmolzen. Nach Equilibrierung für 20 min bei 42°C wurden die Agarosewürfel mit β-Agarase (NEB) für 2 bis 3 h verdaut. Die Elution der größenselektierten HMW-DNA wurde entsprechend dem Protokoll des Copy Control™ Fosmid Library Production Kits (Epicentre) durchgeführt. Nach der Inaktivierung der β-Agarase für 10 min bei 65 °C wurden etwa 0,5 Volumen (~500 µl) der Suspension in neue Reaktionsgefäße überführt. Alle Reaktionsgefäße wurden für 15 min auf Eis inkubiert, um auf unverdaute LMP-Agarose zu überprüfen. Im Falle der Polymerisation wurden die Reaktionsgefäße verworfen. Wurde keine Polymerisation beobachtet, erfolgte die Zentrifugation (15 min, 10000 rpm, 12°C). Zwei Drittel des Überstandes, welcher die HMW-DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die HMW-DNA wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7) und 2,5 Volumen absoluten Ethanol für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Zentrifugation (15 min, 10000 rpm, 12°C) wurde der Überstand verworfen. Die DNA-Pellets wurden zweimal mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation (15 min, 10000 rpm, 12°C) pelletiert. Das Ethanol wurde entfernt. Die DNA-Pellets wurden für etwa 5 bis 10 min bei 45°C unter Vakuum getrocknet und über Nacht bei 30°C in 15-20 µl TE-Puffer resuspendiert. Für den Aufbau von Fosmid-Genbanken erfolgten drei PFGE-Läufe. Die DNA-Extrakte wurden vereinigt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.6.2 Reparatur gescherter Enden der HMW-DNA

Die durch das Einwirken der Scherkräfte während der Extraktion entstandenen überhängenden einzelsträngigen Enden der größenselektierten HMW-DNA mussten enzymatisch aufgearbeitet werden. Zu dem DNA-Extrakt (52 µl) wurden 8 µl 10 × "End-Repair"-Enzympuffer, 8 µl 2,5 mM dNTPs, 8 µl 10 mM ATP und 4 µl "End-Repair"-Enzymmix (alle Komponenten aus dem Copy Control™ Fosmid Library Production Kit) gegeben und mit der Pipettenspitze vorsichtig durchmischt.

Nach einer Inkubation von 45 min bei RT wurde das Enzymgemisch für 10 min bei 70°C inaktiviert. Die End-Repair-Reaktionskomponenten wurden mittels Phenol-Extraktion entfernt. HMW-DNA und Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; jeweils 80 µl) wurden in ein 2-ml *Phase Lock* Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig, ohne kräftiges schütteln, durchmischt. Die organische und die wässrige Phase wurden durch Zentrifugation (4 min, 10000 rpm, 12°C) getrennt. Die Proteine wurden durch eine zweite Extraktion mit 80 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) endgültig entfernt. Nach der Zentrifugation (4 min, 10000 rpm, 12°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die HMW-DNA wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7) und mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol für 20 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (13 min, 10000 rpm, 12°C) pelletiert und mit eiskaltem 70%igem Ethanol zweimal gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde für 2 h bei 30°C in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Quantifizierung der extrahierten HMW-DNA erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Der DNA-Extrakt (10 µl), 1 µl und 5 µl T7-Marker (Copy Control™ Fosmid Library Production Kit) sowie 2,5 µl Smart-Ladder (Eurogentec, Köln) wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen und für 2 h bei 66 V aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte nach der Ethidiumbromidfärbung unter der UV-Lampe.

2.6.3 Ligation

Die größenselektierte HMW-DNA wurde in den pCC1FOS™-Vektor (Abbildung 6) ligiert. Alle Reaktionskomponenten wurden dem Copy Control™ Fosmid Library Production Kit entnommen. Für die Ligation wurden 1 µl 10 × "Fast-Link"-Ligationpuffer, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl pCC1FOS™-Vektor (0,5 µg/µl), 6 µl DNA und 1 µl "Fast-Link"-DNA-Ligase vorsichtig mit der Pipettenspitze auf Eis durchmischt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 70°C) wurde die Ligation mit 50 µl Phagenextrakt (Max Plax Lambda Packaging Extrakt, Copy Control™ Fosmid Library Production Kit) für 3 h bei 30°C inkubiert. Die Verpackung wurde durch die Zugabe von 940 µl "Phage Dilution"-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) und 25 µl Chloroform gestoppt. Der Titer der Phagenpartikel wurde durch Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-4} bestimmt. 10 µl Phagenextrakt wurden mit 90 µl (10^{-1}) bzw. 990 µl

Phage-Dilution-Puffer (10^{-2}) durchmischt. 10 µl von der Verdünnung wurden mit 100 µl *E. coli* EPI30™-Zellen (Copy Control™ Fosmid Library Production Kit) durchmischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Das *E. coli*-Zellmaterial wurde vorher von einer Agarplatte in flüssiges LB-Medium überimpft. Die Flüssigkultur hatte bei 600 nm (OD_{600}) eine optische Dichte von 0,8 bis 0,9. Die infizierten *E. coli*-Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (cam) [1% Trypton, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, pH 7, 1,5% Agar, 250 µl/l cam (5% cam in 100%igem absolutem Ethanol gelöst)] ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Basierend auf der geschätzten Anzahl an benötigten Klonen und der Dichte der Klone auf der Platte, wurde 25 µl verpacktes Phagenmaterial mit 225 µl *E. coli* EPI 300™ (OD_{600}= 0,8–0,9) durchmischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten *E. coli*-Zellen wurden auf LB_{cam}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

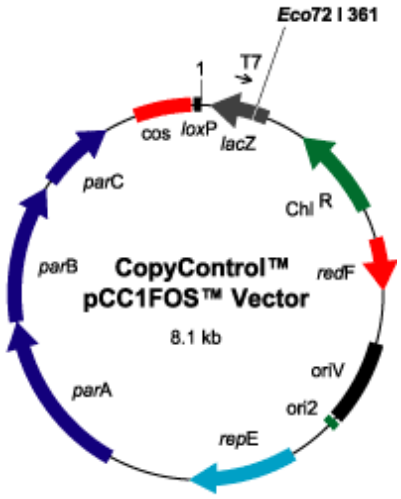

Abbildung 6: Karte des Vektors Copy Control pCC1FOS™ (Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA), der in dieser Arbeit für den Aufbau der Genbanken verwendet wurde.

2.7 Screening nach 16S rRNA-Genen der Zielgruppen

Die Fosmid-Genbanken wurden nach 16S rRNA-Genen von Mitgliedern der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und neuer Entwicklungslinien analysiert. Dafür wurde der PLA40f/1492r-PCR-Assay verwendet (Abschnitt 2.14). Agarplatten mit mehr als 50 Fosmid-Klonen wurden mit der Lederberg-Stempelmethode dupliziert. Die Original- und Duplikat-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Original-Agarplatten wurden bei 4°C gelagert, während die Kolonien der Duplikat-

Agarplatten mit sterilem Wasser abgeschwemmt und in Reaktionsgefäße überführt wurden. Die DNA wurde aus 100 µl des abgeschwemmten Zellmaterials mittels Kochlyse-Präparation extrahiert. Dafür wurden die Zellen für 10 min bei 100°C erhitzt. Nach der Zentrifugation (10 min, 8000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Konnte ein PCR-Amplikon eines Duplikat-Agarplattenpools der zu erwartenden Größe amplifiziert werden, wurden die Kolonien der Original-Agarplatte in 96er Mikrotiterplatten überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das PCR-basierte Screening wurden 8 Reihen der Mikrotiterplatte zu 8 Reihenpoolen kombiniert. Diese 8 Reihenpoole wurden zu einem Plattenpool vereint. Konnte mit dem spezifischen PCR-Assay ein 16S rRNA-Amplikon erzielt werden, wurden die Reihenpoole bzw. einzelne Vertiefungen für die Identifikation der Test-positiven Fosmid-Klone gescreent.

2.8 Langfristige Lagerung der Fosmid-Klone

Die 96er Mikrotiterplatten wurden mit einem Mikrotiterplatten-Replikator repliziert. Das Zellmaterial wurde in eine neue 96er Mikrotiterplatte überführt, die pro Vertiefung 100 µl Freeze-Medium enthielt [LB_{cam} mit 4,4% (v/v) Glycerin, 1,7 mM $MgCl_2$, 6,8 mM NH_4SO_4, 13 mM KH_2PO_4, 36 mM K_2HPO_4, 0,4 mM $MgSO_4$]. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und bei -80°C gelagert. Das abgeschwemmte Zellmaterial der Duplikat-Agarplatten (200 µl) wurde mit 200 µl Glycerin-Puffer [65% (v/v) Glycerin, 1,2 mM $MgSO_4$, pH 8] vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Vereinzelte Fosmid-Klone wurden auf Agarplatten ausgestrichen und inkubiert. Nach der Abschwemmung der Kolonien wurden 400 µl des Zellmaterials mit 400 µl Glycerin-Puffer in Cryoröhrchen durchmischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Repräsentative Agarplattenpoole in Glycerinkulturen wurden mehrmals auf frische Agarplatten ausplattiert und der jeweilige Test-positive Fosmid-Klon erneut nachgewiesen.

2.9. Größenbestimmungen der klonierten genomischen Fragmente

Extraktion der Fosmid-DNA: Die Extraktion der Fosmid-DNA wurde mit einem Protokoll des "Qiagen prep® Miniprep Handbook for purification of large plasmids"

mit Komponenten des Plasmid Midi Kits (Qiagen) durchgeführt. Das *E. coli*-Zellmaterial des Fosmid-Klons wurde in LB_{cam}-Medium überimpft. Die Reaktionsgefäße wurden bei 37°C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Nach dem Überführen der Bakteriensuspension in 2-ml Reaktionsgefäße, erfolgte die Zentrifugation (17 min, 200 rpm, 12°C). Der Medium-Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Suspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Mit der Zugabe von 400 µl Puffer P2 erfolgte die Zelllyse. Nach der Inkubation für 5 min auf Eis wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben und das Reaktionsgefäß für weitere 7 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (25 min, 10000 rpm, 12°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fosmid-DNA wurde durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem 80%igem Isopropanol für 20 min bei -80°C gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 10000 rpm, 12°C) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet unter Vakuum bei 45°C getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

Größenbestimmung: Die Größe des in den Fosmid-Vektor ligierten genomischen Fragments wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym SbfI bestimmt. Dafür wurden 38 µl Fosmid-DNA mit 5,3 µl Puffer 4 (NEB), 5,3 µl BSA (1:10) und 6 µl Restriktionsenzym SbfI (NEB) durchmischt. Der Restriktionsverdau erfolgte für 5 h bei 37°C. Nach der Inaktivierung des Enzyms (20 min, 65°C) wurden 30 µl des Restriktionsverdaus auf ein 1%iges Pulsfeldgel geladen. Die Mid Range und Low Range PFGE-Marker wurden in die Taschen am Außenrand des Pulsfeldgels geladen. Die Taschen wurden mit 1%iger PFGE-Agarose abgedichtet. Der Restriktionsverdau wurde mittels PFGE in 0,5 × TBE-Puffer, bei 14°C, einem Spannungsquellenwechsels von 1 bis 12 s, einer Fließgeschwindigkeit von 6 V/cm für 12 h aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte nach der Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht

2.10 Fosmid-Sequenzierung

Die Komplettsequenzierung der Fosmid-Klon-Inserts wurde in Zusammenarbeit mit Richard Reinhardt, Michael Kube und dessen Mitarbeitern am MPI für molekulare Genetik (Berlin/Dahlem) mittels der Shotgun-Methode durchgeführt. Die Fosmid-

DNA wurde extrahiert und mittels Ultraschall auf eine durchschnittliche Größe von 1,5 kbp fragmentiert. Die größenselektierte DNA wurden in den pUC19-Vektor kloniert. Die subklonierten Inserts wurden amplifiziert und die PCR-Produkte mittels eines ABI 3730 Kapillarsequenzierers (Applied Biosystems) sequenziert. Die Bereiche geringer Qualität wurden resequenziert. Nicht vereinigte "Contigs" wurden mittels "Primer walking" verbunden.

2.11 Genannotation und Vorhersage der abgeleiteten Proteine

Die Primärannotation der Genomfragmente wurde vom MPI für molekulare Genetik, Berlin durchgeführt. Die Vorhersage der offenen Leserahmen erfolgte mit dem Programm ORPHEUS. Die vorhergesagten Gene bzw. die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden anschließend mittels der HTGA-Software gegen nicht-redundante Protein-Datenbanken (BlastP, SWISSPROT, TREMBL, PIR) sowie die Einträge der INTERPRO-Datenbank (EBI) verglichen. Die HTGA-Software ermöglicht die Identifikation homologer Sequenzen des zu untersuchenden genomischen Fragments und die Zuordnung der vorhergesagten Proteine zu Proteinfamilien oder COGs ("Cluster of Orthologous Groups"). Darüber hinaus erkennt die HGTA-Software hochkonservierte Protein-Domänen und Sequenzmuster. Die manuelle Feinannotation sowie die Analyse übereinstimmender konservierter genomischer Bereiche mit veröffentlichten Genomsequenzen erfolgte am MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Die offenen Leserahmen ohne signifikante Ähnlichkeit zu Datenbank-Einträgen wurden als hypothetisch Protein-kodierend bezeichnet. Gene mit signifikanter Ähnlichkeit zu Genen unbekannter Funktion wurden als konserviert hypothetisch bezeichnet. Der GC-Gehalt wurde mit dem GEECEE-Programm (http://anabench.bcm.umontreal.ca/cgibin/emboss.pl?_action=input&_app=geece) bestimmt. Die potentiellen Transmembrandomänen wurden mit dem TMHMM 2.0 Server (Trans membrane Hidden Markov Model-TMHMM, http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/, Krogh *et al.*, 2001) und "*DAS Transmembrane Prediction server*" (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html, Cserzo *et al.*, 1997) vorhergesagt. Die Visualisierung der vorhergesagten Gene erfolgte mit dem Programm Artemis (http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/) und Clone Manager Vers 6.0 (Sci-Ed-Software).

2.12 Anreicherungsexperimente

Medium: Für die Anreicherungskulturen wurde ein Bicarbonat-gepuffertes Süßwassermineralmedium nach Widdel und Bak (1992) verwendet. Die Mineralsalzlösung und 0,4 mg/l Resazurin wurden in einer Schottflasche mit Butylstopfen überführt, mit Stickstoff begast und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden sterile anoxische Stammlösungen von 30 mM Bicarbonat zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl und 0,5 M Na_2CO_3 auf 7,2-7,3 eingestellt. Zu dem Mineralsalzmedium wurden jeweils 1 ml Spurenelement-Lösung SL10, je 1 ml Vitamin 3- und Vitamin 7-Lösungen und 1 ml Se-W-Lösung steril zugegeben. Die Komponenten der Stammlösungen wurden jeweils in einem Liter vollentsalztem Wasser gelöst. Die Gasphase des Mediums wurde durch Stickstoff ausgetauscht. Als Reduktionsmittel wurde 1 mM Natriumdithionit verwendet. Das anaerobe Süßwassermedium wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Das Mineralmedium (60 ml) wurde im Anaerobenzelt (Megaplex, Grenchen, Schweiz) in 120 ml Serumflaschen überführt. Diese Serumflaschen wurden mit einem Butylstopfen fest verschlossen und vor dem Einschleusen in das Anaerobenzelt mit Stickstoff gespült. Nach dem Ausschleusen wurde die Gasphase zusätzlich gegen N_2 ausgetauscht.

Substrate: Für die syntrophen Anreicherungsversuche wurden anaerobe, steril filtrierte 1 M Substratstammlösungen des jeweiligen Substrats hergestellt. Die Substrate Propionat, Butyrat und ein Substratgemisch (Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat und Ethanol) wurden vor dem Beimpfen steril zugegeben (Tabelle 1).

Anreicherungskulturen: Als Inokulum für die syntrophen Anreicherungsversuche wurde anoxischer Reisfeldboden verwendet. Die Probenvorbereitung und die Verdünnung des Inokulums erfolgten im Anaerobenzelt. Für zwei Verdünnungsreihen wurden zwei sterile Spritzen mit der breiten Fläche nach unten in einen für 69 Tage inkubierten Reisfeldmikrokosmus gedrückt. Der Bodenkern (7 g) wurde mit 63 ml anaerobem Süßwassermedium in 120 ml Serumflaschen gefüllt, mit Butylgummistopfen und Alukappe fest verschlossen sowie resuspendiert. Das entsprach einer Verdünnung von 1:10. Die Gasphase in den Serumflaschen wurde gegen N_2 ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte bei 50 rpm über Nacht bei 30°C. Nach etwa 10 h Inkubation wurden die Serumflaschen in das Anaerobenzelt eingeschleust. Die Bodenpartikel sedimentierten für 2 bis 4 h. Verdünnungsreihen der Bodenaufschlämmung von 10^{-1} bis 10^{-8} wurden mit

anaerobem Süßwassermedium hergestellt. Die Probe (1 ml) wurde mit 9 ml Medium durchmischt.

Mineralsalzlösung

0,25 g NaCl

0,2 g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$

0,1 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$

0,1 g KCl

0,1 g NH_4Cl

0,05 g KH_2PO_4

Spurenelementlösung SL10

10 ml 25%ige HCl

1,5 g $FeCl_2 \times 7\ H_2O$

0,190 g $CoCl_2 \times 6\ H_2O$

0,1 g $MnCl_2 \times 4\ H_2O$

0,07 g $ZnCl_2$

0,006 g H_3BO_4

0,036 g $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$

0,024 g $NiCl_2 \times 6\ H_2O$

0,002 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$

Se-W-Lösung

0,5 g NaOH

0,003 g $Na_2SeO_3 \times 5\ H_2O$

0,004 g $Na_2WO_4 \times 2\ H_2O$

Vitamin 3-Lösung

0,005 g Liponsäure

0,005 g Riboflavin

0,002 g Folsäure

Vitamin 7-Lösung

0,04 g 4- Aminobenzoat

0,01 g δ-(+) Biotin

0,1 g Nikotinsäure

0,05 g Ca- D-(+) Panthothenat

0,15 g Pyridoxamin-HCl

0,1 g Thiamin-HCl

0,05 g Vitamin B_{12}

Die Anreicherungskulturen wurden mit 1 ml der Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-8} (1,7%) angeimpft (Tabelle 1). Die Anreicherungskulturen wurden mit 1 ml einer gewachsenen Kultur des potentiell syntrophen Partners *M. formicicum* DSM 1535^T

versetzt. Eine Kontrolle wurde mitgeführt, die Substrat und Inokulum, aber keinen hydrogenotrophen Methanogenen enthielt. Die Anreicherungskulturen wurden bei 30°C stehend und im Dunkeln inkubiert. Die angereicherten Konsortien wurden nach dem Nachweis ausgewählter phylogenetischer Gruppen überimpft (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überblick über die Anreicherungsexperimente dieser Arbeit.

Anreicherungskulturen	Ausgangsmaterial	Substrate	Konzentration
1. Anreicherungsstufe (Verdünnungsreihen, Parallele 1 und 2)	für 69 Tage inkubierter Reisfeldboden	Substratgemisch (Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat, Ethanol)	30 mM
		Propionat	30 mM
		Butyrat	30 mM
2. Anreicherungsstufe (2 Parallelen: 1/1, 1/2, 2/1 und 2/2)	angereicherte Konsortien in den 10^{-3}- und 10^{-4}-Verdünnung sowie Kontrolle mit Substrat-gemisch nach 92 Tagen Inkubation	Substratgemisch (Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat, Ethanol)	30 mM
RC-I-Anreicherung (Verdünnungsreihe)	angereicherte Konsortien der Kontrolle Parallele 2/2 aus der 2. Anreicherungsstufe mit Substrat-gemisch nach 40 Tagen Inkubation	Substratgemisch (Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat, Ethanol)	30 mM und 60 mM
RC-I-Anreicherung (Parallele 1 und 2)	angereicherte Konsortien der 10^{-1}- und 10^{-2}-Verdünnung mit 60 mM Substratgemisch nach 35 Tagen Inkubation	Acetat Propionat	jeweils 10 mM, 30 mM und 50 mM
RC-III-Anreicherung (2 Parallelen)	angereicherte Konsortien des Substratgemisches in der 10^{-3}-Verdünnung Parallele 1 nach 158 Tagen Inkubation	Gemisch von Acetat : Propionat	20 mM : 2 mM 30 mM : 3 mM 40 mM : 4 mM 20 mM : 20 mM 20 mM : 40 mM

2.13 Chemische Analysen

2.13.1 Gaschromatographische Messungen von Methan und Kohlendioxid

Die Bestimmung von Methan und Kohlendioxid erfolgte mittels Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu) mit Flammenionisationsdetektor (FID).

Injektor:	Betriebstemperatur 120°C
Trägergas:	Wasserstoff 5,0
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, 1/8 Zoll Durchmesser Trägermaterial: Poropack QS 50/100 mesh; Betriebstemperatur 40°C
Methanisator:	zur Bestimmung von CO_2 (CO_2 und CO wurden zu CH_4 reduziert), Eigenbau, Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Chromopack, Middelburg, NL), Edelstahlsäule, Länge 20 cm, Innendurchmesser 1/8 Zoll, Betriebstemperatur 350°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv CH_4
Auswertung:	Programm Peak Simple (SRI- Instruments, Torrence, USA)
Eichgas:	Gemisch aus CH_4 und CO_2 in Stickstoff (1000 ppmv)

Die gemessenen Konzentrationen (ppmv) wurden in Stoffmengen (µmol) umgerechnet. Die Zustandsgleichung idealer Gase wurde nach der Stoffmenge n umgerechnet.

$$n = \frac{p \times V}{R \times T}$$

n Stoffmenge [mol]

p Partialdruck des gemessenen Gases [bar, 1 ppmv = 10^{-6} bar]

V Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

R allgemeine Gaskonstante [0,083144 ×l bar K^{-1} mol^{-1}])

T Temperatur [K]

2.13.2 Analyse organischer Säuren und Alkohole

Die Konzentrationen der organischen Säuren und Alkohole in den angereicherten Konsortien wurden mittels HPLC- (High Performance Liquid Chromatography) Analyse bestimmt. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 10000 rpm) und der Überstand durch einen Membranfilter (0,2 µm Porengröße, PTFE Membran, Whatman) filtriert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

HPLC-Anlage:	Pumpe S1000, Säulenofen S41000 (Sykam, Gilching) Probenaufgeber Jasco 851-AS (Jasco, Japan)
Trägermaterial:	Polystyrol-Divinylbenzol
Säule:	Edelstahlsäule, 39 cm Länge, 7,8 mm Durchmesser
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäule, Flussrate 0,5 ml/min
Detektor:	Refraktion Index (RI)- Detektor: ERC-7512 (ERMA CR Inc,. Tokio), Betriebstemperatur 40°C, UV-Detektor: UVis 200 (LINEAR Instruments, Reno, USA), Wellenlänge 206 nm
Nachweisgrenze:	5 µM (abhängig von der Substanz)
Auswertung:	Programm Peak Simple (SRI- Instruments, Torrence, USA)
Eichstandard:	Mischstandard aus Pyruvat, Fumarat, Lactat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Ethanol (je 5 mM)

2.13.3 Analyse anorganischer Ionen

Anorganische Ionen wurden mit einem ionenchromatographischen System (IC) nachgewiesen. Dafür wurden die Proben wie in Abschnitt 2.13.2 zentrifugiert und filtriert.

IC- Anlage:	Pumpe S1121, Säulenofen S4260B, Supressorsystem S4260A, Probenaufgeber S5200 (Fa. Schambeck, Bad Honnef)
Trägermaterial:	Polystyrol-Divinylbenzol, 10 µm Korngröße
Säule:	Anionentrennsäule (LCA09, Sykam), Edelstahlsäure, 6 cm Länge, 4,6 mm Durchmesser
Fließmittel:	5 mM Na_2CO_3, 1 ml/min Modifier (1 g 4-Hydroxybenzonitril in 50 ml Methanol); Flussrate: 1,5 ml/min
Ofentemperatur:	65°C
Detektor:	Leitfähigkeitsdetektor S3111 UV-Detektor Linear UVis 200, Wellenlänge 220 nm
Nachweisgrenze:	5 µm (abhängig von der Substanz)
Auswertung:	Programm Peak Simple (SRI- Instruments, Torrence, USA)
Eichstandard:	Mischstandard aus Chlorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat, Sulfat (je 1 mM)

2.14 PCR-Amplifikation

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde das 16S rRNA-Gen als phylogenetisches Markergen aus den DNA-Extrakten amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte entweder für die Klonierung und die vergleichende Sequenzanalyse oder für die T-RFLP-Analyse (Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus) verwendet. Das Gen für die α-Untereinheit der Methyl-Coenzym M Reduktase *(mcrA*), ein Schlüsselenzym der Methanogenese, wurde zur detaillierten Analyse der archaeellen Populationen genutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und die entsprechenden PCR-Programme sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt. Bei jeder Amplifikation wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle der DNA-Matrize das entsprechende Volumen an sterilem Wasser enthielt. Als Positivkontrolle diente bei der Amplifikation eine DNA-Matrize mit der zu amplifizierenden Zielsequenz. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem Gen Amp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) oder MWG AG Biotech Primus 96 plus durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 50 µl:

- 0,5 µl 30 pmol/µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (MWG, Ebersberg bzw. Sigma, Taufkirchen)
- 2,5 µl 8 mM dNTPs (GE Healthcare, München)
- 0,5 µl BSA (Roche Biochemicals, Mannheim, 20 mg/ml)
- 3 µl 25 mM $MgCl_2$ (Promega)
- 10 µl 5 × Reaktionspuffer (Promega)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (Promega)
- 1-20 µl DNA-Matrize

Das Reaktionsgemisch für die Amplifikation des *mcrA*-Gens enthielt 0,5 µl 30 pmol/µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,5 µl BSA (20 mg/ml), 25 µl Premix B (Epicentre) und 0,2 µl Taq-Polymerase (Promega).

Tabelle 2: Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zielgruppe	Referenz
27f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
1492r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
PLA40f	CGG CRT GGA TTA GGC ATG [1)]	PVC-Superphylum, OP3, BRC1, WS3, OD11, OD1, NBL-UPA	Derakshani *et al.*, 2001
1492r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
UNI_355f	AGT CTA GAG GCT TCG	BRC1, WS3	Peter Ricke (Diplomarbeit)
1492r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
M13	CAG GAA AAC AGC TAT GAC	pCR®II-TOPO®-Vektor [2)]	TA Cloning Kit
T7	GTT TTC CCCA GTC ACG AC	pCR®II-TOPO®-Vektor [2)]	Invitrogen
Arch109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT [1)]	*Archaea*	Großkopf *et al*., 1998a
Arch934r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	*Archaea*	Großkopf *et al*., 1998a
Mcrf	TAY GAY CAR ATH TGG YT [1)]	*mcrA* (Methanogene)	Springer *et al*., 1995
Mcrb	ACR TTC ATN GCR TAR TT [1)]	*Archaea* (Methanogene)	Springer *et al*., 1995
519f	ACG CMG CCG CGG TAA TWC [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
907r	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT [1)]	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991
1100r	AGG GTT GCG CTC GTT G	*Bacteria*	Lane *et al*., 1991

[1)] Abkürzungen der Nukleotide: K = G/T; H = A/C/T; M = A/C ; N = A/C/G/T; R = A/G; S = G/C, W = A/T, Y = C/T, H = A/C/T.

[2)] Die Vektorinserts der Umweltklone wurden mit Primern des TOPO-TA-Cloning®-Kit (Invitrogen, Niederlande) amplifiziert.

Tabelle 3: PCR-Bedingungen für die entsprechenden PCR-Assays.

Primer	Anzahl Zyklen	Annealing Temperatur (°C)	D1 [1)] [min]	D2 [2)] [s]	A [3)] [min]	DS [4)] [min]	DS2 [5)] [min]
27f*/1492r	30	48	2	45	1	2	6
PLA40f*/ 1492r	30-35	65	2	45	1	2	7
Uni_355f*/ 1492r	30-35	56	2	45	1	2	7
M13/T7	27	55	3	45	1	2	7
Arch109f/ Arch943r*	30-32	52	2	45	1	2	7
Mcrf*/Mrcb	35	50	3	45	0,45	1,3	5

[1)] Dauer der initialen Denaturierungsphase (D1)
[2)] Dauer der Denaturierung (D2)
[3)] Dauer der Primeranlagerung (A)
[4)] Dauer der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung (DS)
[5)] Dauer der abschließenden DNA-Synthese (DS2)
* Primer waren für die T-RFLP-Analyse mit FAM markiert.

Nach der PCR-Reaktion wurden 5 µl des Reaktionsgemisches auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Als Längenmarker wurden 2,5 µl Smart-Ladder aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese in 1 × TAE-Puffer (pro Liter: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8). Für die Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel für 30 min in 0,005%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht. Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurden mit den Aufreinigungskits QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), Gen Elute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) oder Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.15 T-RFLP-Analyse

Mikrobielle Gemeinschaften angereicherter Konsortien wurden mittels T-RFLP-Analyse untersucht (Liu *et al*., 1997). Die Methode basiert auf der Größenbestimmung der Restriktionsfragmente, die am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Marker versehen sind. Basierend auf vorhandenen Gensequenzen können die einzelnen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) mittels *in-silico* T-RF-Analyse mit dem Programm TRF-CUT, welches in das ARB Programm-Packet integriert ist, bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden (Ricke *et al*., 2005). Die eindeutige Identifizierung der T-RFs kann hingegen nur mittels T-RFLP-Analyse einer Klonsequenz der Klonbibliothek des jeweiligen Probenmaterials erfolgen. Ein Primer war für die T-RFLP-Analyse mit 6-Carboxy-fluorescein (FAM) markiert (Tabelle 3).

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und die Konzentration spektroskopisch bestimmt. Anschließend wurde der Restriktionsverdau mit 120 ng Matrizen-DNA, 1 µl Puffer, 1 µl BSA (1:10) und 0,25 µl Restriktionsenzym durchgeführt. Die PCR-Produkte bakterieller 16S rRNA-Gene wurden mit MspI (Promega) (3 h bei 37°C) und diejenigen von archaeellen 16S rRNA-Genen mit TaqI (NEB) (3 h bei 65°C) verdaut. Der Restriktionsverdau der PCR-Produkte des *mcrA*-Gens wurde mit dem Enzym Cfr13I (Fermentas, St. Leon-Roth) bei 37°C für 3 h durchgeführt. Der Restriktionsverdau wurde mit AutoSeq™ G-50-Chromotografiesäulen aufgereinigt. Das Eluat wurde bei 4°C gelagert. Der aufgereinigte Restriktionsverdau (2-4 µl) wurde mit einem internen Längenstandard

(0,3 µl, Gene-Scan-1000 ROX, Applied Biosystems) und 11 µl Formamid-Auftragspuffer gemischt und für 3 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung des Restriktionsverdaus erfolgte durch Gelelektrophorese auf einem automatischen Kapillarsequenzierer (ABI3010). Die Auswertung wurde mit der GeneMapper Analysesoftware Vers 4.0 (Applied Biosystems) durchgeführt. Mit Hilfe des internen Längenstandards wurde die Länge und relative Abundanz einzelner T-RFs bestimmt.

2.16 Erstellung von Klonbibliotheken

Für den Aufbau von 16S rRNA-Genbanken wurden die aufgereinigten PCR-Produkte (PLA40f/1492r und UNI_355f/1492r) kloniert (TOPO-TA-Cloning-Kit®, Invitrogen). Das PCR-Produkt (1,5- bis 2 µl) wurde für 5 min bzw. über Nacht in den pCR®II-TOPO®-Vektor ligiert. Kompetente *E. coli*-Zellen (TOP 10) wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert und für 1 h bei 37°C in SOC-Medium (Invitrogen) inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf LB_{kan}- oder LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Die positiven Klone (Blau-Weiß-Selektion) wurden auf eine Masterplatte überführt und erneut bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden entweder direkt in die PCR eingesetzt oder die DNA vorher durch eine Kochlyse-Präparation extrahiert. Dazu wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern in 100 µl steriles Wasser überführt und die Zellen durch Aufkochen (10 min, 100°C) lysiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 10000 × *g*, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der DNA-Extrakt (1 bis 3 µl) wurde in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Plasmid-Inserts wurden mit dem Primerpaar M13/T7 amplifiziert. Für die Herstellung von Dauerkulturen wurde der jeweilige Klon in 1 ml LB_{kan}-Flüssigkultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde mit 1 ml Glycerinpuffer durchmischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.17 Sequenzierung

Die verwendete Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf der Sanger-Methode (Sanger *et al*., 1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem PRISM Ready

Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (v1.1 und v3.1, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. In das Reaktionsgemisch wurden 5 pmol des Sequenzierungsprimers (Tabelle 2), 2 µl Ready-Reaction-Premix, 3 µl Big-Dye-Sequencing-Puffer und ca. 100 ng der Matrizen-DNA eingesetzt. Das Endvolumen des Reaktionsgemischs war 10 µl (v1.0) bzw. 20 µl (v3.0). Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit 25 bis 30 Zyklen. Die initiale Denaturierung wurde für 30 s bei 96°C, die zweite Denaturierung für 10 s bei 96°C, die Primeranlagerung für 5 s bei 50°C und die DNA-Synthese für 4 min bei 60°C durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit AutoSeq™ G-50-Chromotografiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgereinigt. Das Eluat wurde unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 3 µl Formamid-Auftragspuffer (Amersham Pharmacia Biotech) resuspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 min bei 90°C denatuiert und auf Eis abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde über ein Polyacrylamidgel in einem Sequenzierapparat (ABI Prism 377 DNA Sequenzierer, Applied Biosystems) aufgetrennt. Für die Auftrennung des Reaktionsgemischs auf einen Kapillarsequenzierer (ABI 3010, Applied Biosystems) wurde der Sequenzierungskit v3.1 verwendet. Das getrocknete Reaktionsgemisch wurde in 20 µl Formamid-Auftragspuffer (Applied Biosystems) resuspendiert.

2.18 Vergleichende Sequenzanalyse

Die 16S rRNA-Gensequenzen wurden als Elektropherogramme mit Hilfe des Programms Seqman II (DNASTAR, Madison, USA) kontrolliert und editiert. Die Vektorsequenzabschnitte wurden entfernt und die Teilsequenzen wurden zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt. Alle Sequenzen wurden mit dem Online Tool Chimera Check der RDP-Datenbank (http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) und dem Bellerophon-Server (http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl) auf Chimäre untersucht. Chimäre sind Mischprodukte aus Sequenzen phylogenetisch nicht-identischer Organismen und können als Artefakte während der PCR-Reaktion auftreten. Eine erste phylogenetische Zuordnung von 16S rRNA-Klonsequenzen erfolgte durch einen Abgleich mit Sequenzen in öffentlichen Datenbanken [BlastN (NCBI), megaBlast (NCBI), Fasta (EMBL) und RDP]. Relevante Referenz-sequenzen aus diesen Datenbanken wurden in die bereits vorhandene 16S rRNA-

Datenbank des ARB-Software-Pakets (http://www.arb-home.de, http://www.arb-silva.de/arb-silva/) importiert (Ludwig *et al.*, 1998). Die Datenbank vom Juni 2005 mit einem 16S rRNA-Datensatz von etwa 60000 Sequenzen diente als Basis für phylogenetische Analyse. Die importierten Sequenzen wurden mit dem Fast Aligner mit den nächstenverwandten 16S rRNA-Sequenzen in ein ARB-spezifisches Alignment gebracht. Homologe Nukleotide wurden untereinander in Spalten geordnet. Das Alignment wurde manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Integration der importieren Sequenzen in die bereits bestehende Datenbank erfolgte mittels Maximum-Parsimony-Algorithmus unter Anwendung von einem Konsensusfilter für *Bacteria* (Bacteria_rrn5_dec04) oder Phylum-spezifischer Filter (planctomycetes_rr5_dec04, verrucomicrobia_rr5_dec04, verruc_chlamyd_plancto_ rr5_dec04). Durch den Einsatz der Konsensusfilter wurde die Berechnung der Phylogenien auf Nukleotidpositionen des 16S rRNA-Gens beschränkt, die mit 50 bis 100% in den entsprechenden Phyla konserviert sind.

Die Berechnung von 23S rRNA-basierten Phylogenien erfolgte mit der ARB-Datenbank LSURef_94_SILVA_09_04_08_opt.arb (Stand 09.04.2008) unter Anwendung von Maximum-Likelihood RaxML (Parallel A(x)ccelerated Maximum Likelihood, Stamatakis *et al.*, 2005), FastDNAml sowie von Neighbor-Joining-Algorithmen.

Die Aminsäuresequenzen ausgewählter abgeleiteter Proteine wurden in das ARB-Programm-Paket integriert. Die Dendrogramme wurden unter Anwendung von Maximum-Likelihood- (RaxML, protml des Molphy Paket, TREE-PUZZLE) und von Maximum-Parsimony-Algorithmen konstruiert.

Die endgültige grafische Darstellung und Formatierung der Stammbäume wurde mit der Software Adobe Illustrator CS2 durchgeführt.

III. Ergebnisse

3.1 Mikrobielle Diversität neuer Entwicklungslinien

3.1.1 Untersuchung der mikrobiellen Diversität von *Planctomycetes*

In einer vorherigen Studie wurde die Diversität von *Planctomycetes*-verwandten Arten in anoxischem Reisfeldboden mit einem neu entwickelten 16S rRNA-Gen-basiertem PCR-Assay untersucht (Derakshani *et al*., 2001). Die phylogenetische Analyse der Umweltklone veranschaulichte die Existenz neuer Unterlinien der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und *Spirochaetes*. Die erstmalige Entdeckung von mit WS3- und OP3-verwandten Umweltsequenzen im Reisfeldboden unterstützte den Status dieser beiden Entwicklungslinien als *candidate divisions*. Die Untersuchungen zeigten gleichzeitig das Vorhandensein von zwölf 16S rRNA-Gensequenzen, die in phylogenetischen Stammbaumanalysen eine neue Hauptentwicklungslinie darstellte und als Bacterial Rice Cluster 1 (BRC1) bezeichnet wurde. Zu Vergleichszwecken und für die Auswahl eines geeigneten Habitats für die metagenomische Analyse neuer bakterieller Entwicklungslinien wurde anoxischer Reisfeldboden mit dem für die Phyla *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* (PV)-spezifischen 16S rRNA-Gen-basiertem PCR-Assay untersucht.

Nach Extraktion der Gesamt-DNA aus einem für zehn Tage inkubierten Reisfeldmikrokosmus wurden die 16S rRNA-Gene mit dem Primerpaar PLA40f/1492r amplifiziert und kloniert. Die vollständige Sequenzanalyse von 24 16S rRNA-Gensequenzen zeigte, dass die Umweltklonsequenzen mit bekannten Hauptentwicklungslinien der Domäne *Bacteria* gruppierten (Abbildung 7). Die mit etwa 33% (8 Klone) vorherrschenden bakteriellen Klonsequenzen waren mit BRC1 verwandt. Die Umweltklone A-III-30, A-III-47, A-III-50, A-III-52, A-III-59, A-II-3, A-II-4 und A-II-5 wiesen 87 bis 97% Sequenzähnlichkeit zu den Unterlinien A1, A2 und A4 des BRC1 auf. Eine 16S rRNA-Gensequenz (A-III-31) zeigte eine enge Verwandtschaft mit WS3. Darüber hinaus gruppierten weitere Umweltklone mit den Phyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia,* den Grünen Nicht-Schwefelbakterien

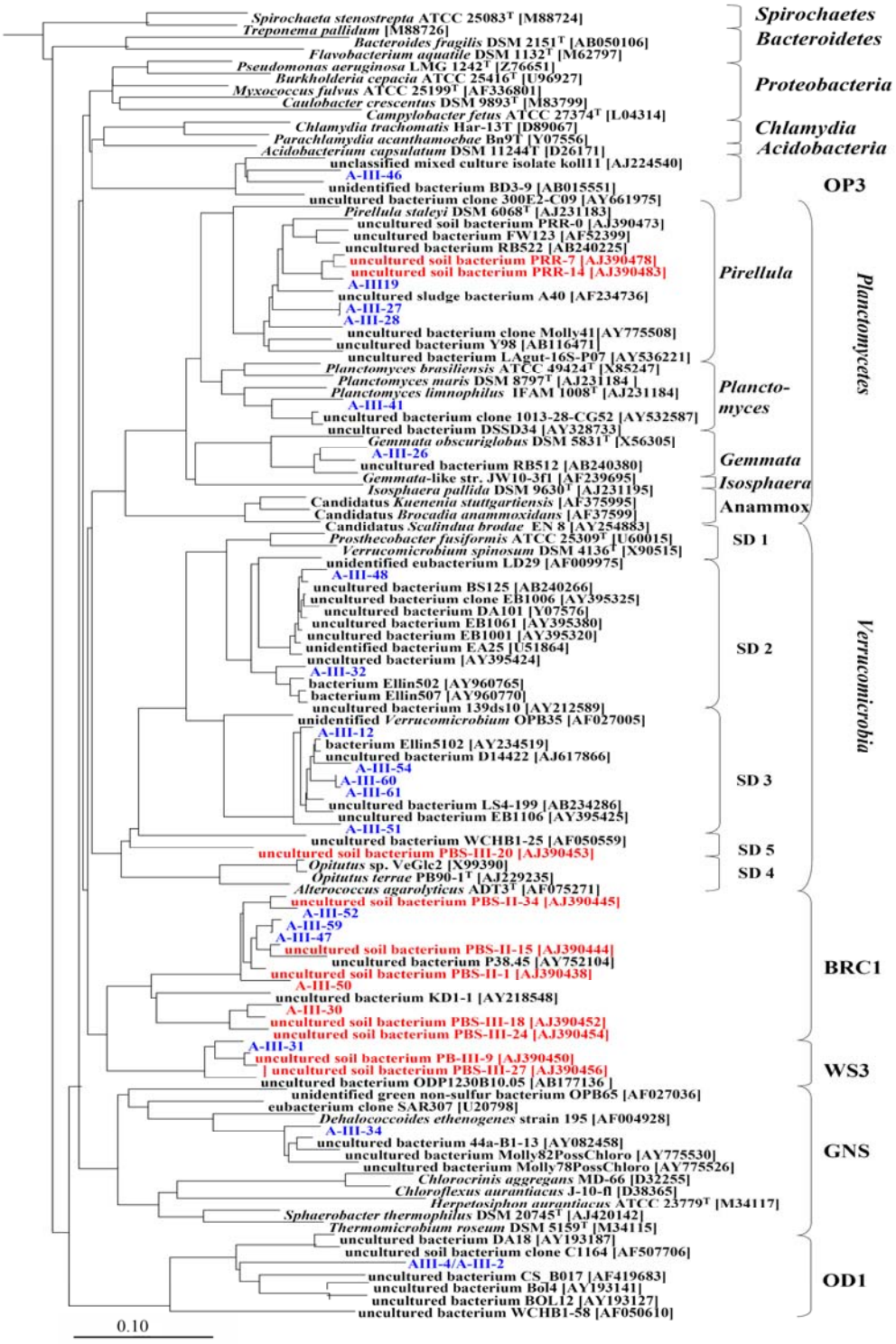

Abbildung 7: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den detektierten Umweltklonen dieser Arbeit (blau), einer vorherigen Studie des Reisfeldbodens (rot) und Mitgliedern verschiedener bakterieller Phyla zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 987 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus konstruiert. Abkürzungen: Subdivision (SD), Obsidian Pool 3 (OP3), Bacterial Rice Cluster 1 (BRC1), Wurtsmith aquifer 3 (WS3), Grüne Nicht-Schwefelbakterien (GNS) und Obsidian Pool 11-derived (OD1). Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

(GNS) sowie mit OP3 und OD1. Die größte Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen wurden dem Phylum *Verrucomicrobia* (7 Klone) zugeordnet. Die *Planctomycetes*-verwandten Sequenzen (5 Klone) stellten in der Klonbibliothek mit moderater Frequenz (18% der Klone) eine numerisch weniger abundante phylogenetische Gruppe dar. Außerdem wurden drei 16S rRNA-Gene detektiert, die keine Verwandtschaft mit Mitgliedern des PVC-Superphylums zeigten und mit GNS sowie mit OD1 verwandt sind (Abbildung 7).

Diese vergleichende Sequenzanalyse veranschaulichte, dass 16S rRNA-Gene des BRC1 und OP3 nachweisbar sind und daher gefluteter Reisfeldboden für den Aufbau von Genbanken geeignet war.

3.1.2 Mikrobielle Diversität des BRC1

Der von Peter Ricke (Diplomarbeit) entwickelte 16S rRNA Gen-basierte PCR-Assay mit dem Primerpaar UNI_355f/1492r wurde zum spezifischen Nachweis des BRC1 und WS3 im inkubierten Reisfeldboden verwendet. Das Ziel war es, mit BRC1-verwandte Umweltklonsequenzen zu erzielen, die dann bei der Anwendung des spezifischen PCR-Assays als 16S rRNA-Referenzsequenzen zur Verfügung stehen. Die DNA der mikrobiellen Gemeinschaft wurde aus für zehn Tage inkubierten Reisfeldboden extrahiert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für den Aufbau von 16S rRNA-Klonbibliotheken verwendet. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass alle Umweltklonsequenzen (18) dem BRC1 zugeordnet werden konnten (Abbildung 8). Mit etwa 66% war die Mehrzahl der erhaltenen 16S rRNA-Gene (12) mit der Unterlinie A1 verwandt. Stammbaumanalysen veranschaulichten, dass die Unterlinie BRC1-A1 von Umweltklonsequenzen des anoxischen Reisfeldbodens dominiert wird (Derakshani *et al.*, 2001; Ricke, Diplomarbeit). 16S rRNA-Sequenzen (6 Klone) der Unterlinie BRC1-A4 stellen den zweitgrößten Anteil in der Klonbibliothek (33%) dar, welche vor allem Klone des Reisfeldbodens, anaerober Sedimente und von Klärschlamm beinhaltet.

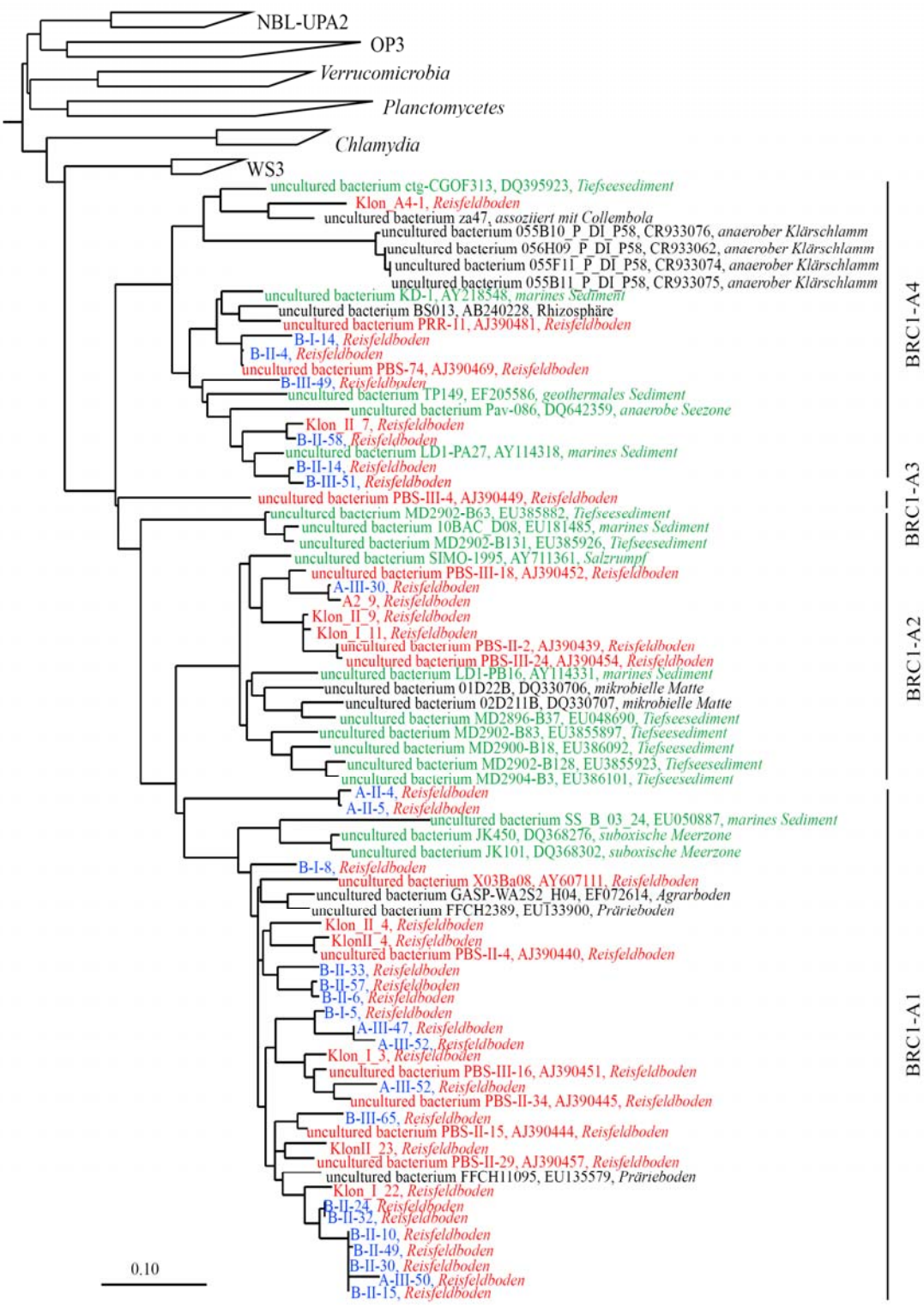

Abbildung 8: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den detektierten Umweltklonen dieser Arbeit (blau), vorheriger Studien des Reisfeldbodens (rot), mariner Standorte (grün) des BRC1 und Mitgliedern des PVC-Superphylums zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 409 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus konstruiert. Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

3.2 Extraktion von HMW-DNA aus Reisfeldboden

Bei der metagenomischen Analyse des Reisfeldbodens sollten Fosmid-Vektoren verwendet werden. Die Fosmid-DNA wurde in λ-Phagenköpfe verpackt, wodurch die Aufnahmekapazität durch die natürliche Größenselektion auf 34 bis 48 kbp beschränkt ist. Aus diesen Gründen war das erste Ziel, eine Methode zur Extraktion von HMW-DNA entsprechender Größe aus dem anoxischen Reisfeldboden zu entwickeln. Für die HMW-DNA-Isolierung wurden drei verschiedene Techniken getestet. Die direkte Lyse der Zellen in einer Boden-Zell-Suspension nach einem Protokoll von Ricke *et al*. (2005) führte zur Extraktion größenlimitierter DNA von nur etwa 15 kbp. Mit der Variation der Extraktionsparameter für die Zelllyse und die DNA-Extraktion, wie beispielsweise den Inkubationszeiten mit Detergenzien und Enzymen, der Reduktion der Zentrifugationsgeschwindigkeiten sowie -zeiten und der Verwendung verschiedener Aufreinigungskits, konnte die Größe der extrahierten DNA nicht erhöht werden. Die Pulsfeldgele der DNA-Extrakte demonstrierten, dass die isolierte DNA zu sehr geschert war, um Fosmid-Genbanken aufzubauen. Anschließend wurden die Zellen von den Bodenpartikeln durch mehrere Zentrifugationsschritte abgetrennt. Die isolierte DNA aus dem Zellmaterial hatte eine molekulare Größe von etwa 15 kbp. Zusätzlich wurde das Zellmaterial in LMP-Agarose eingebettet. Die Auftrennung der DNA aus den Agarosestücken mittels PFGE veranschaulichte, dass DNA im hochmolekularen Bereich isoliert wurde. Allerdings war die quantitative Ausbeute der HMW-DNA sehr gering. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Methode der Einbettung der Zellen mit einer drastischen Reduktion der Scherkräfte einhergeht und daher geeignet ist, um HMW-DNA in einer Größe von etwa 48 kbp zu extrahieren (Abbildung 9). Die Boden-Zell-Suspension wurde anschließend in Form von Agarosenudeln in LMP-Agarose eingebettet und die HMW-DNA nach dem Protokoll von Quaiser *et al*. (2002) isoliert. Der Aufschluss der Zellen und die Isolierung der DNA erfolgten durch Behandlung der Agarosenudeln mit zwei Extraktionspuffern. Für die Auftrennung der HMW-DNA wurden sechs Agarosenudeln auf ein zweiphasiges Pulsfeldgel geladen. Das Zwei-Phasengel bestand aus einer oberen Phase aus 1%iger PFGE-Agarose mit 2%igem Polyvinylpyrrolidon und einer unteren Phase, die nur 1%ige LMP-Agarose enthielt. Die Substanz Polyvinylpyrrolidon wurde eingesetzt, um Humin- und Fulvinsäuren abzutrennen, die während der DNA-Extraktion

koextrahiert werden. Die optimale gelelektrophoretische Auftrennung der HMW-DNA erfolgte mit einer Laufdauer von 24 h. Die Dokumentation der Pulsfeldgele zeigte, dass diese Methode die Isolierung von HMW-DNA bis zu einer Größe von 245 kbp ermöglichte (Abbildung 9). Anschließend wurde die HMW-DNA in dem Größenbereich von 145 bis 245 kbp aus dem Pulsfeldgel ohne vorherige Bestrahlung mit UV-Licht ausgeschnitten (Abbildung 10). Nach der Elution aus LMP-Agarose und den damit verbundenen Scherkräften während der Zentrifugation wurde HMW-DNA in einem Größenbereich von 35 bis 48 kbp extrahiert. Ein Nachteil dieser Extraktionsmethode war die relativ geringe Ausbeute an extrahierbarer HMW-DNA (~8 µg pro Pulsfeldgel). Für den Aufbau der Genbanken wurden daher die Eluate aus drei getrennten PFGE-Läufen vereint.

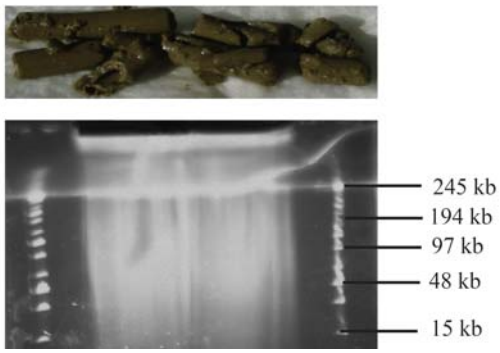

Abbildung 9: Einbettung der Boden-Zell-Suspension in LMP-Agarose in Form von Agarosenudeln (oben). Analytisches Pulsfeldgel zur HMW-DNA-Isolierung (unten). PFGE-Bedingungen: 6 V/cm, 1-15 s Puls, 24 h, 14°C (rechts und links: MidRange PFGE-Marker I; Mitte: aufgetrennte DNA aus den Agarosenudeln).

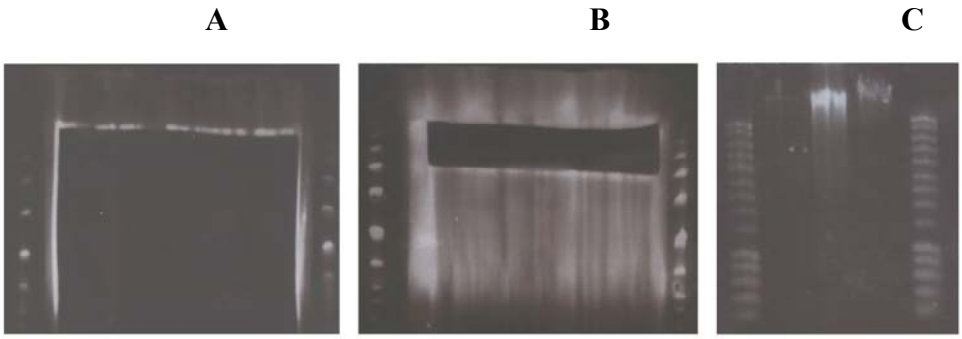

Abbildung 10: Auftrennung von HMW-DNA auf einem Zwei-Phasen-Pulsfeldgel. (A) Der Größenbereich von 145 bis 245 kbp wurde im aufgetrennten Marker unter der UV-Lampe eingeschnitten. (B) Die HMW-DNA des entsprechenden Größenbereichs wurde ausgeschnitten. (C) Die Quantifizierung der isolierten HMW-DNA erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel [links und rechts: Smart-Ladder (Eurogentec), T7-Marker (36 kbp, Epicentre), Mitte: HMW-DNA nach Reparatur der Enden].

3.3 Aufbau von Genbanken

Die isolierte HMW-DNA von etwa 45 kbp wurde in einen Fosmid-Vektor mit glatten Schnittstellen ligiert. Dazu musste die HMW-DNA modifiziert werden, um glatte und phosphorylierte Enden zu erhalten. Das dafür verwendete Enzymgemisch wurde mit drei verschiedenen Methoden von der an den Enden reparierten HMW-DNA entfernt. Die horizontale Gelelektrophorese der HMW-DNA auf einem 1%igen LMP-Agarosegel zeigte eine schlechte Auftrennung und eine unzureichende Größenselektion. Die Elimination des Enzymgemisches mittels PFGE, einer zweiten Größenselektion und der Elution führte zu erheblichen Verlusten der isolierten HMW-DNA. Das Enzymgemisch wurde schließlich mittels einer Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von der HMW-DNA abgetrennt. Die Konzentration der HMW-DNA wurde durch einen gelelektrophoretischen Vergleich mit dem T7-Marker auf ca. 300 ng/µl abgeschätzt, was eine Gesamtausbeute von ca. 25 µg HMW-DNA aus 50 g Boden bedeutete (Abbildung 10C). In die Ligation wurden 50 ng HMW-DNA und 500 ng Vektor-DNA eingesetzt, was einem molaren Insert:Vektor-Verhältnis von ca. 1:10 entsprach. Die Ligation wurde in Phagenpartikel verpackt und nach der Infektion von *E. coli*-Zellen wurden diese auf Agarplatten ausplattiert. Die Konstruktion der Fosmid-Bibliotheken erfolgte mit HMW-DNA-Extrakten aus Reisfeldmikrokosmen, die entweder für 10, 70 oder 140 Tage inkubiert wurden. Mehrmalige Ligationen führten zum Aufbau der Genbanken I-V mit einer Gesamtanzahl von etwa 61000 Fosmid-Klonen. Ingesamt wurden ungefähr 10000 Fosmid-Klone in Miktotiterplatten archiviert. Mehr als 50000 Genomfragmente liegen in Form von Agarplattenpoolen vor. Von den archivierten Agarplattenpoolen wurden bereits repräsentative Fosmid-Klone erneut identifiziert. Demzufolge stehen die aufgebauten Genbanken des gefluteten Reisfeldbodens für weitere Fragestellungen zur genetischen Diversität in diesen Standort zu Verfügung.

3.4 Analyse der Genbanken

3.4.1 PCR-basiertes Screening

Um Fosmid-Klone von Vertretern des BRC1 und OP3 zu erzielen, wurden die Genbanken I-V mit dem 16S rRNA-Gen-basierten PVC-Assay (PLA40f/1492r)

analysiert. Dafür wurden die gesamten Kolonien Test-positiver Duplikat-Agarplatten in Mikrotiterplatten überführt. Das Screening der Mikrotiterplatten nach einem festgelegten Schema führte zur Identifizierung des positiven Fosmid-Klons. Mit dem PCR-basierten Screening konnten in 61000 Fosmid-Klonen 24 Test-positive Fosmid-Klone nachgewiesen werden (Tabelle 4). Amplikons mit der erwarteten Größe von etwa 1450 bp wurden sequenziert. Der Abgleich mit öffentlichen Datenbanken (BlastN) zeigte, dass es sich um 16S rRNA-Gensequenzen handelte.

Tabelle 4: Zusammenfassung der generierten Genbanken.

Genbank	Gefluteter Reisfeldboden inkubiert für	Fosmid-Klone	Größe der Genbank (in Mbp)	Anzahl Test-positiver Fosmide
I-III	10 Tage	31000	1240	5
IV	70 Tage	24000	960	14
V	140 Tage	8000	320	5
		61000	**2440**	**24**

3.4.2 Phylogenetische Diversität der Test-positiven Fosmid-Klone

Die Genbanken I-III des für zehn Tage inkubierten Reisfeldbodens beinhalteten fünf Genomfragmente von Mitgliedern des PVC-Superphylums (Abbildung 11). Die phylogenetische Analyse demonstrierte, dass die 16S rRNA-Gensequenzen der zwei Fosmid-Klone (III39E5, III39E6) mit Umweltsequenzen des Reisfeldbodens, eines marinen Sediments und eines kontaminierten Aquifers der Unterlinie 5 der *Verrucomicrobia* verwandt waren (Doijka *et al*., 1998; Derakshani *et al*., 2001; Freitag *et al*., 2003). Das 16S rRNA-Gen des Fosmid-Klons III48C5 wies dagegen 92 bis 95% Sequenzähnlichkeit zu Umweltsequenzen des Reisfeldbodens, des gefluteten Bodens von Pappeln und dem Isolat Ellin514 der *Verrucomicrobia* Unterlinie 3 auf (Abbildung 12) (Noll *et al*., 2005; Graff *et al*., 2005; Sangwan *et al*., 2005).

In den Genbanken, die mit HMW-DNA eines für 70 (IV) und 140 Tage (V) inkubierten Reisfeldbodens aufgebaut wurden, konnten mit dem PVC-Assay 14 bzw. fünf Genomfragmente nachgewiesen werden. Die phylogenetische Diversität

dieser Test-positiven Genomfragmente war bedeutend höher als derjenigen, welche aus für 10 Tage inkubierten Reisfeldboden erzielt wurden (Abbildung 11).

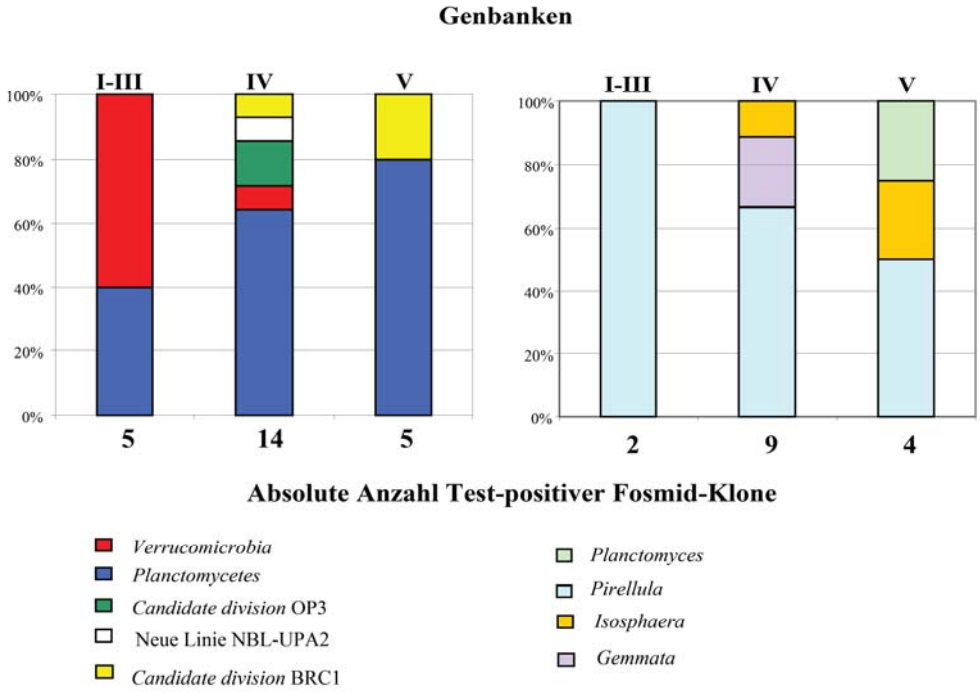

Abbildung 11: Grafische Darstellung der phylogenetischen Zuordnungen der 16S rRNA-Gensequenzen Test-positiver Fosmid-Klone in den Genbanken I-V nach der Analyse von 61000 Fosmid-Klonen. (links: Phylum-Level Zuordnungen aller Test-positiven Fosmid-Klone; rechts: Zuordnung der mit *Planctomycetes*-verwandten Genomfragmente zu den jeweiligen Gattungen).

Die Mehrheit der 16S rRNA-Gensequenzen (II423, III70F8, IV6F8, IV120C2, IV140A6, IV143C7, IV175A9, IV184F4, V88D5 und V103C3) wiesen 90 bis 96% Sequenzähnlichkeit zu Umweltklonsequenzen der Unterlinien Pir1 bis Pir4 der Gattung *Pirellula* auf, welche im anoxischen Reisfeldboden und in der Reiswurzelzone detektiert wurden (Derakshani *et al*., 2001). Die größte Anzahl *Pirellula*-ähnlicher Genomfragmente wurde in der Genbank IV nachgewiesen. Der Fosmid-Klon V73F8 gruppierte dagegen in die Gattung *Planctomyces.* Darüber hinaus waren die 16S rRNA-Gene von vier Genomfragmenten (IV56C6, IV215C6, IV269D6 und V15G3) mit den Gattungen *Gemmata* und *Isosphaera* verwandt (Abbildung 13). Zusätzlich wurde das 16S rRNA-Gen des Fosmid-Klons IV163C8 in die Unterlinie 5 der *Verrucomicrobia* eingeordnet. Im Gegensatz dazu war die

Anzahl der Genomfragmente, welche Mitgliedern der *Verrucomicrobia* zugeordnet wurden, in dem für 10 Tage inkubierten Reisfeldboden deutlich höher (Abbildung 11).

Insbesondere die Genbank des für 70 Tage inkubierten Reisfeldbodens enthielt Fosmid-Klone von Vertretern neuer Entwicklungslinien (Abbildung 14). Die Genomfragmente IV32F6 und IV180F6 wurden verschiedenen Unterlinien des OP3 zugeordnet, deren 16S rRNA-Gensequenzen 82,4% Ähnlichkeit aufwiesen (Abbildung 14). Die nächstverwandten Umweltsequenzen der Fosmid-Klone IV32F6 und IV180F6 entstammen anoxischen, marinen Standorten (Donachie *et al.*, 2004; Elshahed *et al.*, 2007; Brieé *et al.*, 2007; Percent *et al.*, 2008). Die in einer vorhergehenden Untersuchung des Reisfeldbodens detektierten Umweltsequenzen (PBS-87 und PBS-37) des OP3 waren nur entfernt mit den 16S rRNA-Gensequenzen der Genomfragmente (83% bzw. 78%) verwandt (Derakshani *et al.*, 2001). Das Genomfragment IV226A8 trug ein 16S rRNA-Gen, das NBL-UPA2 zugeordnet wurde (Abbildung 14). Der Datenbank-Abgleich der 16S rRNA-Gensequenz zeigte, dass dieser Entwicklungslinie bisher 21 Umweltsequenzen verschiedener anoxischer Standorte angehören, die Sequenzähnlichkeiten von 86 bis 96% aufweisen. Die Stammbaumanalysen veranschaulichten, dass die Vertreter des NBL-UPA2 sehr eng mit OP3 verwandt sind (Abbildung 14). Basierend auf den prozentualen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die 16S rRNA-Gensequenzen von NBL-UPA2 (86-98%) eindeutig von denen von OP3 (72-84%). Die Entwicklungslinien bilden zwei Cluster, die durch Bootstrap-Werte von maximal 65% unterstützt werden. Die 16S rRNA-Gensequenzen der Fosmid-Klone IV17E2 und V174F5 der Genbanken IV und V wiesen höchste Sequenzähnlichkeitswerte (96-97%) zu Umweltklonsequenzen der Unterlinie A1 und A4 des BRC1 auf, die in verschiedenen Studien des Reisfeldbodens detektiert wurden (Abbildung 14) (Ricke, Diplomarbeit; Derakshani *et al.*, 2001). Die Genomfragmente IV17E2 und V174F5 sind auf Basis des 16S rRNA-Gens mit einer Sequenzähnlichkeit von 82,1% nur entfernt miteinander verwandt.

Die Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV228A6 (OP3 bzw. NBL-UPA2) sowie die Fosmid-Klone IV17E2 und V174F5 (BRC1) wurden für eine vollständige Sequenzanalyse ausgewählt.

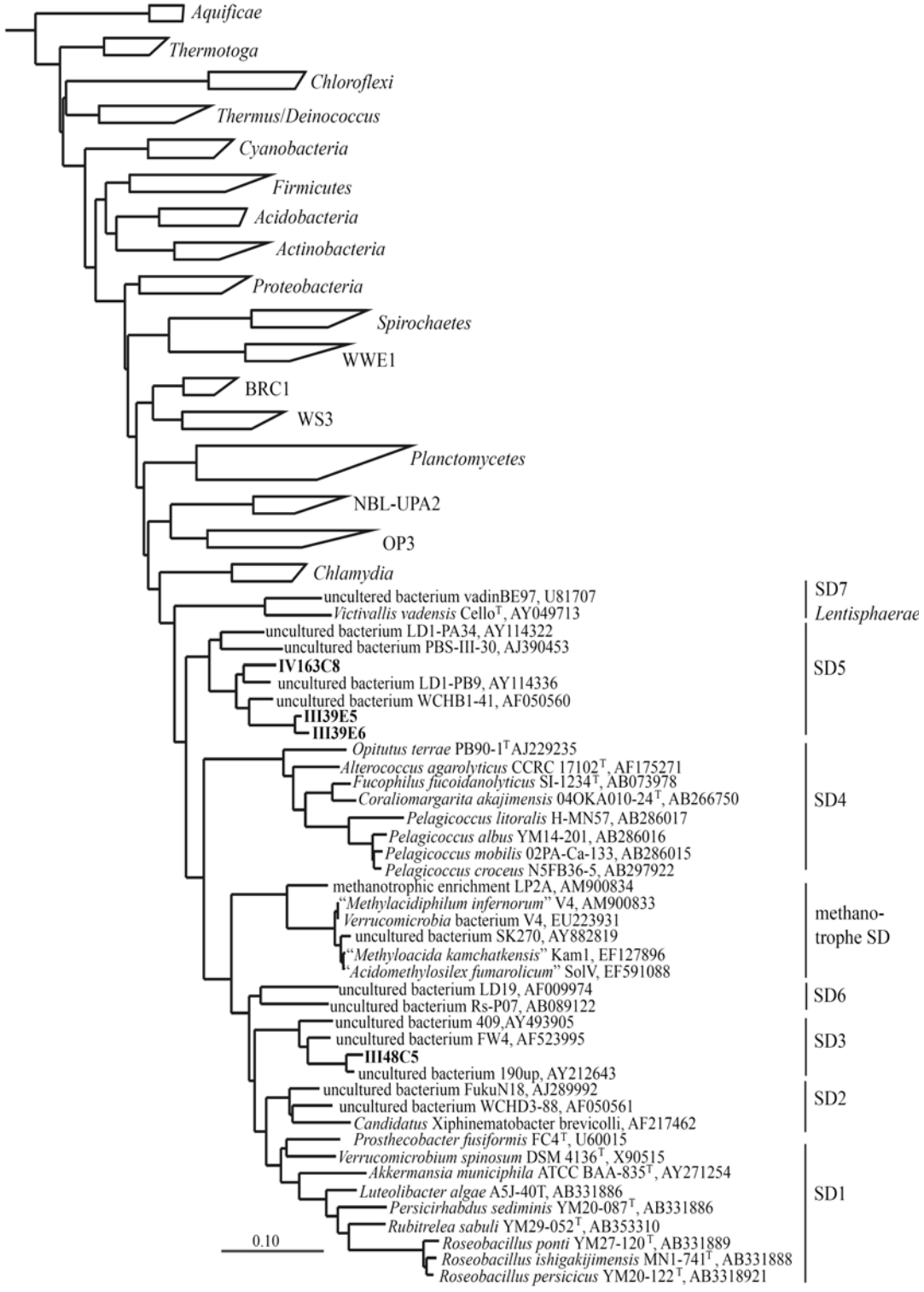

Abbildung 12: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Test-positiven Fosmid-Klonen und Mitgliedern der *Verrucomicrobia* zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 841 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus konstruiert. Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%. Abkürzung: Subdivision/Unterlinie (SD).

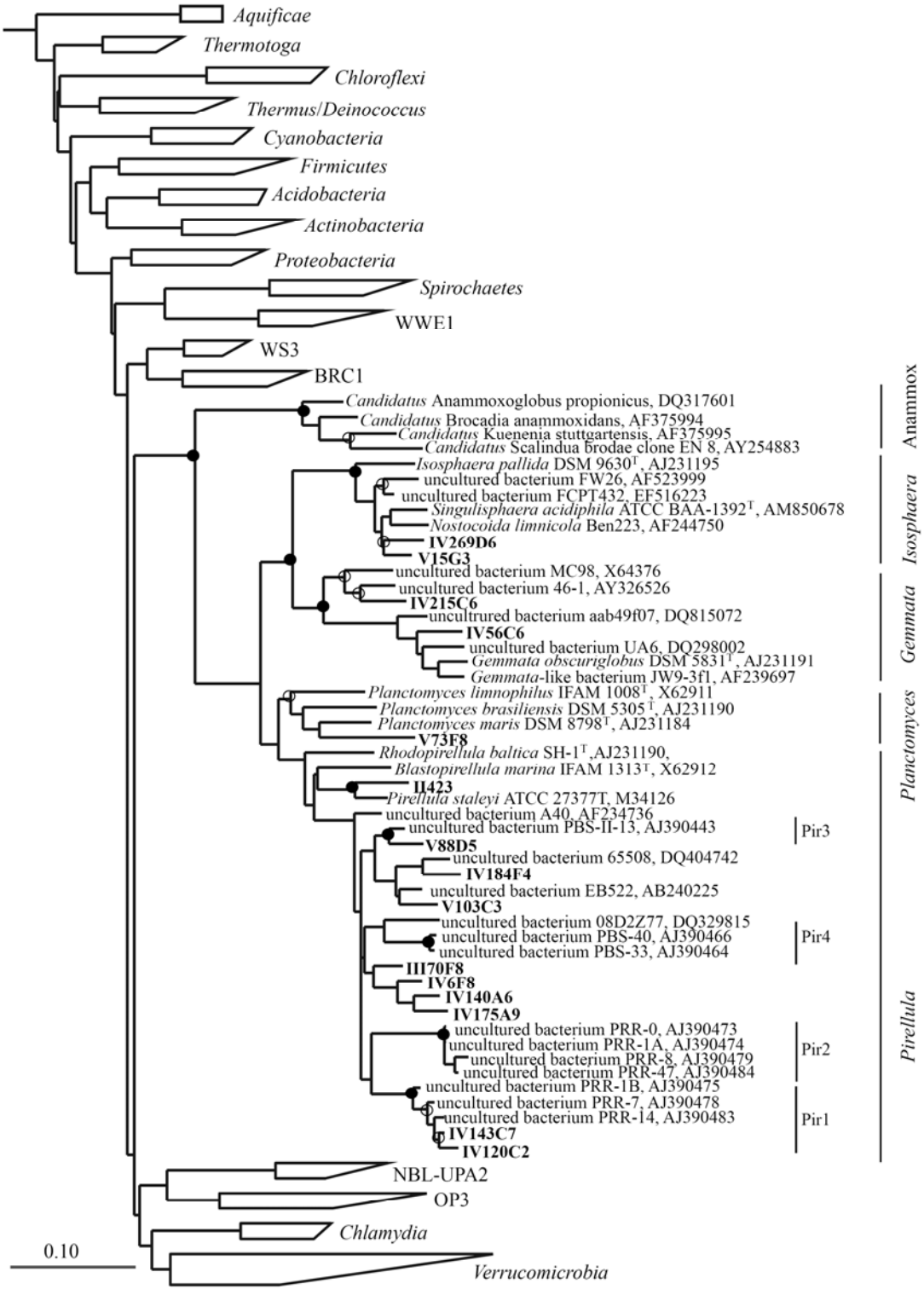

Abbildung 13: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Test-positiven Fosmid-Klonen und Mitgliedern der *Planctomycetes* zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 841 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus konstruiert. Die ausgefüllten Kreise repräsentieren Bootstrap-Werte von >90%. Die leeren Kreise weisen auf Bootstrap-Werte von >70% hin. Abkürzung: *Pirellula*-Cluster 1-4 (Pir1-Pir4). Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

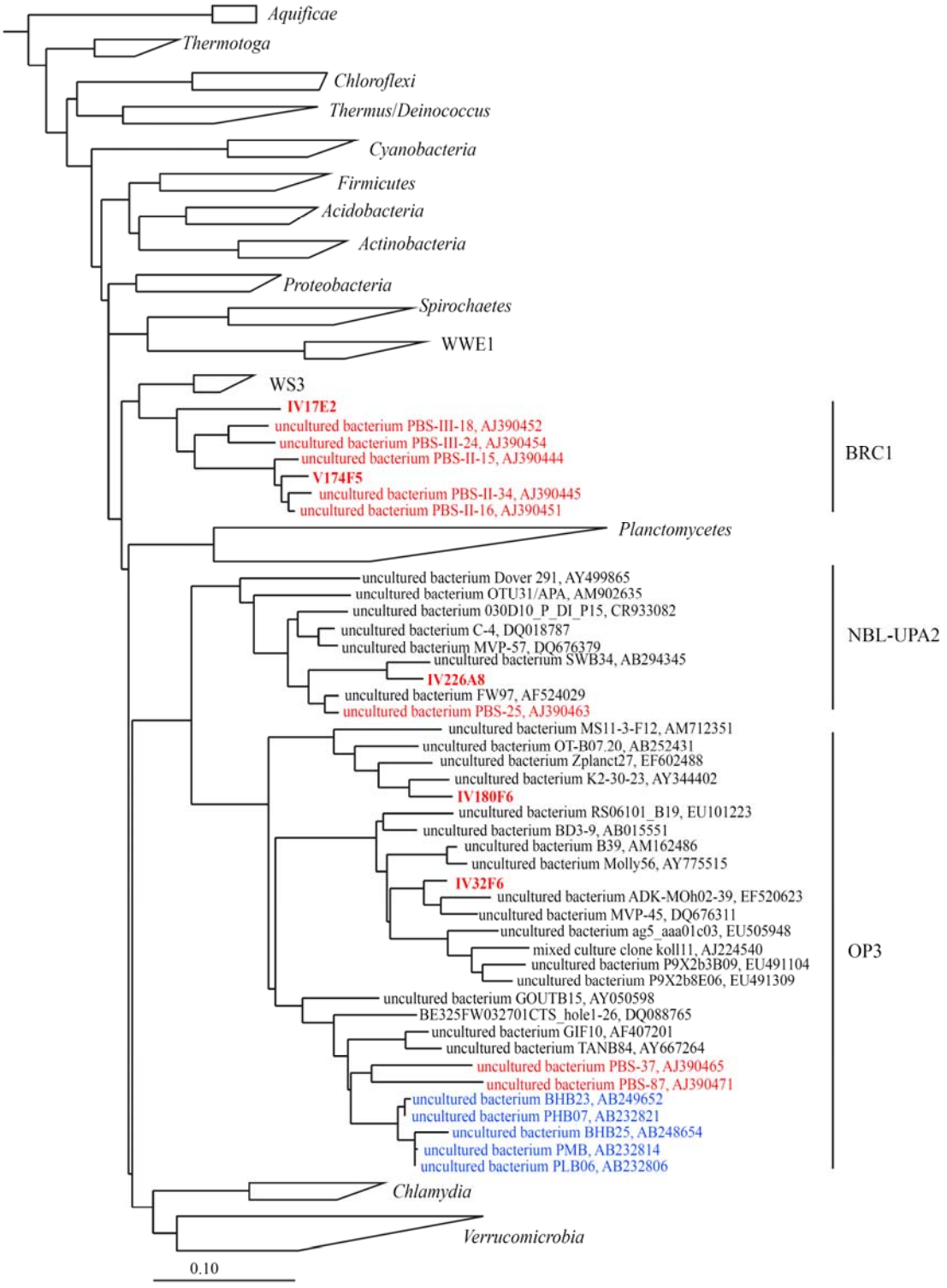

Abbildung 14: Phylogenie basierend auf dem 16S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Test-positiven Fosmid-Klonen (Fettdruck) und Umweltsequenzen des BRC1, OP3 und NBL-UPA2 zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 841 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus konstruiert. 16S rRNA-Gensequenzen aus dem Reisfeldboden (rot) und aus einem Propionat- und Butyrat- abbauenden Chemostaten (blau) sind hervorgehoben. Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

3.4.3 Größenbestimmung der Genomfragmente

Die Größenabschätzung mittels SbfI-Restriktionsanalyse und PFGE zeigte, dass die klonierte DNA in den Test-positiven Genomfragmenten in einem Größenbereich von etwa 28 bis 48 kbp lag (Tabelle 5). Die Insert-Größe der sequenzierten Fosmid-Klone war etwa 5 bis 10 kbp kleiner, als zuvor mittels Restriktionsanalyse/PFGE bestimmt. Daher besitzen die anderen Fosmid-Klone wahrscheinlich kleinere Inserts als mittels PFGE ermittelt.

Tabelle 5: Insertgröße und phylogenetische Zuordnung der Test-positiven Genomfragmente.

Fosmid-Klone	Phylogenetische Zuordnung	Insert-Größe (kbp) PFGE	Sequenzierung
II423	*Pirellula*	33	
III39E5	*Verrucomicrobium* 5	38	
III39E6	*Verrucomicrobium* 5	32	
III48C5	*Verrucomicrobium* 3	38	
III70F8	*Pirellula*	31,5	
IV6F8	*Pirellula*	38	
IV17E2 [1)]	**BRC1-A4**	**46,5**	
IV56C6	*Gemmata*	48	
IV32F6 [1)]	**OP3**	**41**	**36,6**
IV120C2	*Pirellula*	40	
IV140A6	*Pirellula*	39	
IV143C7	*Pirellula*	37	
IV163C8	*Verrucomicrobium* 5	28	
IV175A9	*Pirellula*	45	
IV180F6 [1)]	**OP3**	**48**	**33,2**
IV184F4	*Pirellula*	48	
IV215C6	*Gemmata*	33	
IV226A8 [1)]	**NBL-UPA2**	**40**	**34**
IV269D6	*Isosphaera*	33	
V15G3	*Isosphaera*	40	
V73F8	*Planctomyces*	33	
V88D5	*Pirellula*	33	
V103C3	*Pirellula*	33	
V174F5 [1)]	**BRC1-A1**	**43**	**37,5**

[1)] In Fettdruck sind die Fosmid-Klone hervorgehoben, deren 16S rRNA-Gene mit BRC1, OP3 und NBL-UPA2 verwandt sind.

3.5 Analyse sequenzierter Genomfragmente

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Sequenzanalyse der Genomfragmente IV17E2, IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5 dargestellt. Abgesehen von den 16S rRNA-Genen handelt es sich um die erste genomische Information von Vertretern des OP3, NBL-UPA2 und BRC1. Die vorhergesagten

funktionellen Gene werden in Übersichten dargestellt und die möglichen Charakteristika einzelner abgeleiteter Proteine beschrieben. Im Anschluss werden die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen auf Basis der 23S rRNA-Gene und die taxonomischen Zuordnungen der abgeleiteten Proteine vergleichend analysiert. Auf dem sequenzierten BRC1-Genomfragment IV17E2 konnte kein rRNA-Operon vorhergesagt werden. Das korrelierte nicht mit dem Nachweis eines 16S rRNA-Gens bei dem PCR-basierten Screening. Aus diesen Gründen wird die vergleichende Sequenzanalyse des Genomfragments IV17E2 in dieser Arbeit nicht dargestellt.

3.5.1 Das Genomfragment IV32F6 (OP3)

Der Fosmid-Klon IV32F6 trug ein Insert von 36584 bp, dessen GC-Gehalt bei 46% lag. Das rRNA-Operon bestand aus den Genen für 16S rRNA, tRNA-Ala, tRNA-Ile, 23S rRNA und 5S rRNA (Abbildung 15). Diese Struktur des rRNA-Operons ist für viele Mitglieder der Domäne *Bacteria* typisch (Chen *et al.*, 2000). Insgesamt wurden 31 Protein-kodierende Regionen ("*open reading frames*", ORFs) vorhergesagt, von denen 19 ORFs funktionell annotiert werden konnten. Für die ORFs 7, 9, 17, 19, 20 und 23 bis 28 wurden keine signifikanten Ähnlichkeiten zu kodierenden Sequenzen in öffentlichen Datenbanken ermittelt und repräsentieren demzufolge hypothetische Proteine (Abbildung 15, Tabelle 6).

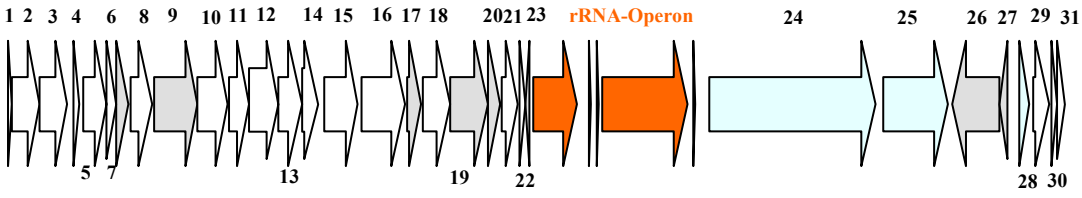

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Anordnung und der Orientierung der offenen Leserahmen auf dem Genomfragment IV32F6, welches OP3 zugeordnet wurde. Es besitzt eine Größe von 36584 bp. Das rRNA-Operon ist in rot und die Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, sind in grau hervorgehoben. Zusätzlich sind die Gene hellblau markiert, welche Sequenzähnlichkeiten mit Protein-kodierenden Genen des Fosmids b1dcf5.1.a06 (Nesbø *et al*., 2005) aufweisen.

Tabelle 6: Übersicht über die vorhergesagten Protein-kodierenden Gene auf dem Genomfragment IV32F6.

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus[6]		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
1	19-135	39 von	IPR001345	EC 5.4.2.1	*Methanospirillum hungatei* DSM 864	*Euryarchaeota*	9,00E-09	71%	Phosphoglycerat-Mutase 1 Familie	Glykolyse
2	138-1127	330	IPR010201	*hflK*	*Pelobacter carbinolicus* DSM 2380	δ-*Proteobacteria*	5,00E-78	50%	Band-7-Protein, Protein-Binding	
3	1130-2089	320	IPR010200	*hflC*	*Syntrophobacter fumaroxidans* DSM 10017	δ-*Proteobacteria*	1,00E-81	51%	Band-7-Protein, Protein-Binding	
4	2257-2475	73	IPR002059	*cspC*	*Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000	γ-*Proteobacteria*	3,00E-16	87%	Kälteschock-Protein, DNA-bindende Domäne	
5	2580-3437	286	IPR004498 Ec 2.1.1.	*prmA*	*Geobacter metallireduceas* GS-15	δ-*Proteobacteria*	5,00E-26	35%	Ribosomales Protein L11 Methyltransferase	Protein-Biosynthese
6	3437-3793	119	IPR000352	*prfA*	*Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136	*Verrucomicrobia*	2,00E-17	43%	Klasse I *peptide chain release factor* Freilassungsfaktor	Translokation
7	3789-4193	135							Hypothetisches Protein	
8	4269-4979	237	IPR001173	*wsaA* EC:2.4.1.	*Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1	α-*Proteobacteria*	7,00E-54	46%	Glykosyl-Transferase Familie 2	Zellwand-Biogenese
9	5082-6593	504							Hypothetisches Protein	
10	6600-7625	342	IPR003447		*Geobacter bemidjiensis* Bem	δ-*Proteobacteria*	1,00E-19	28%	FemAB-Operon Familie	Peptidoglykan
11	7632-8363	244	IPR013216	*smtA*	*Alteromonadales bacterium* TW-7	γ-*Proteobacteria*	1,00E-08	30%	Sam-abhängige Methyltransferase Familie 11	Metabolische Funktion
12	8363-9388	342	IPR003374	*apbE* ähnlich	*Halothermothrix orenii* H 168	*Firmicutes*	2,00E-41	35%	Membran-assoziertes Lipoprotein	Thiamin-Biosynthese
13	9388-10200	271	IPR000398	*thyA1* EC 2.1.1.45	*Methylobacillus flagellatus* KT	β-*Proteobacteria*	1,00E-93	60%	Thymidylat-Synthase	dNTP-Biosynthese
14	10200-10736	179	IPR012259	*folA* EC 1.5.1.3	*Ostreococcus tauri*	*Eukaryota*	8,00E-33	37%	Dihydrofolat-Reduktase	dNTP-Biosynthese
15	10969-12138	390	IPR001789 IPR001633		*Acidothermus cellulolyticus* 11B	*Actinobacteria*	3,00E-36	27%	Diguanylat-Cyclase/Phosphodiesterase (GGDEF &EAL Domänen), Antwort-Regulator (CheY-ähnlich)	Signaltransduktion
16	12262-13755	498	IPR003385	EC 2.4.1.25 *malQ*	Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*	*Planctomycetes*	5,00E-144	48%	Glykosidhydrolase Familie 77	Kohlenstoff-Metabolismus
17	13800-14330	177							Hypothetisches Protein	
18	14344-15309	322	IPR011912	*hldD* EC 5.1.3.20	*Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684	δ-*Proteobacteria*	1,00E-93	53%	ADP-L-Glycero-D-Mannoheptose-Epimerase	Lipopolysaccharid-Biosynthese
19	15332-16606	425							Hypothetisches Protein	
20	16616-17062	149							Hypothetisches Protein	
21	17119-17682	188	IPR001303 IPR004661 IPR004782	EC 5.1.3.4 *araD* *fucA*	*Pyrococcus abyssi* GE5	*Euryarchaeota*	1,00E-19	34%	Klasse II Aldolase/Adducin L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase L-Fucose-Phosphat-Aldolase	Kohlenstoff-Metabolismus

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus[6]		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
22	17705-17935	77	IPR003173 IPR009044	PC4	*Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB	δ-*Proteobacteria*	0.005	32%	P15 Transkriptions- Koaktivator	Transkription
23	18081-17953	43							Hypothetisches Protein	
rRNA	18219-19711	-							16S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	20100-20176	-							tRNA-Ile	rRNA
rRNA	20354-20427	-							tRNA-Ala	rRNA
rRNA	20573-23523	-							23S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	23716-23828	-							5S ribosomale RNA	rRNA
24	24312-30014	1901			ähnlich zu ORF1 des Fosmids b1dcf5.1.a06 (Nesbø *et al.* , 2005)				Hypothetisches Protein	
25	30341-32578	746			ähnlich zu ORF1 des Fosmids b1dcf5.1.a06 (Nesbø *et al* ., 2005)				Hypothetisches Protein	
26	34347-32728	540							Hypothetisches Protein	
27	34619-34347	91							Hypothetisches Protein	
28	34996-35385	132			ähnlich zu ORF7 des Fosmids b1dcf5.1.a06 (Nesbø *et al.* , 2005)				Hypothetisches Protein	
29	35491-36042	184	IPR007156	*lemA*	*Dehalococcoides ethenogenes* 195	*Chloroflexi*	1,00E-45	56%	Unbekannte Funktion	
30	36094-36303	70	IPR013406		*Chlorobium phaeobacteroides* BS1	*Chlorobi*	2,00E-05	37%	Addiktionsmodul	
31	36303-36584	94	IPR007712		*Geobacter uraniireducens* Rf4	δ-*Proteobacteria*	3,00E-15	44%	Plasmid-Stabilisierungssystem	

1) "open reading frame", offener Leserahmen.

2) Nukleotidbereich auf dem Genomfragment.

3) Länge des vermutlichen Proteins.

4) Eintrag in der InterPro-Datenbank (Datenbank für Proteinfamilien, Domänen, Wiederholungen und funktionelle Stellen).

5) Vermutliches Gen mit der entsprechenden EC-Nummer.

6) Organismus mit dem höchsten Ähnlichkeitswert (Identität)[7] und dem Erwartungswert[8], der bei der BlastP-Analyse ermittelt wurde.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von 12 Protein-kodierenden Genen wiesen in BlastP-Analysen die höchsten Übereinstimmungen zu korrespondierenden Proteinsequenzen der *Proteobacteria* auf, allein acht davon zu Mitgliedern der *Deltaproteobacteria*. Andere ORFs zeigten die höchsten prozentualen Ähnlichkeiten zu Homologen von Vertretern der *Firmicutes* (3), *Chlorobi* (1), *Chloroflexi* (1), *Planctomycetes* (1), *Euryarchaeota* (2) und *Eukarya* (1).

Auf dem Genomfragment IV32F6 sind Gene lokalisiert, die vermutlich für eine Dihydrofolat-Reduktase (ORF14), eine Thymidylat-Synthase (ORF13) und ein Membran-assoziertes ApbE-ähnliches Protein (ORF12) kodieren. Diese Enzyme sind an der dNTP-Synthese beteiligt. Die abgeleiteten Proteine der ORFs 8 und 18 wurden mit prozentualen Ähnlichkeiten von 46% bzw. 53% zu der nächstverwandten Proteinsequenz als eine Glycosyl-Transferase Familie 2.D (ORF8) für die Zellwandsynthese und eine ADP-L-Glycero-D-Manno-Heptose-6-Epimerase (HdlD, ORF18) identifiziert. Die HdlD katalysiert den letzten Schritt in der Herstellung der Baueinheit Mannoheptose für den inneren Kern von Lipopolysacchariden. Lipopolysaccharide bilden die äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Darüber hinaus kodieren die ORFs 2 und 3 vermutlich einen Membranproteinkomplex HflKC. Die HflC- und HflK-Proteine zeigen N-terminale Transmembranregionen, die mit der verbleibenden Domäne in den periplasmatischen Raum reichen (Kihara *et al*., 1996, 1998). Die Abbildung 16 zeigt die vermutliche Lokalisation der Transmembrandomänen des HflKC-Membranproteinkomplexes. Der HflKC-Komplex bildet mit der ATP-abhängigen, Membran-assozierten Protease FtsH einen Superkomplex. FtsH baut falsch gefaltete Membranproteine und kurzlebige Proteine proteolytisch ab (Saikawa *et al*., 2004). In Stammbaumanalysen gruppierten die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der potentiellen HflC- und HflK-Proteine des Genomfragments IV32F6 eng mit Homologen von Vertretern der *Deltaproteobacteria* sowie mit *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136^T und *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis (Abbildung 17). ORF6 kodiert vermutlich für einen Klasse I "*peptide chain release factor*" PrfA. Ferner wiesen die ORFs 24, 25 und 28 hohe prozentuale Sequenzähnlichkeiten (42%, 38% bzw. 52%) zu den Protein-kodierenden Regionen ORF1 und ORF7 auf dem Genomfragment b1dcf5.1.a06 auf. Dieses Genomfragment entstammt einer

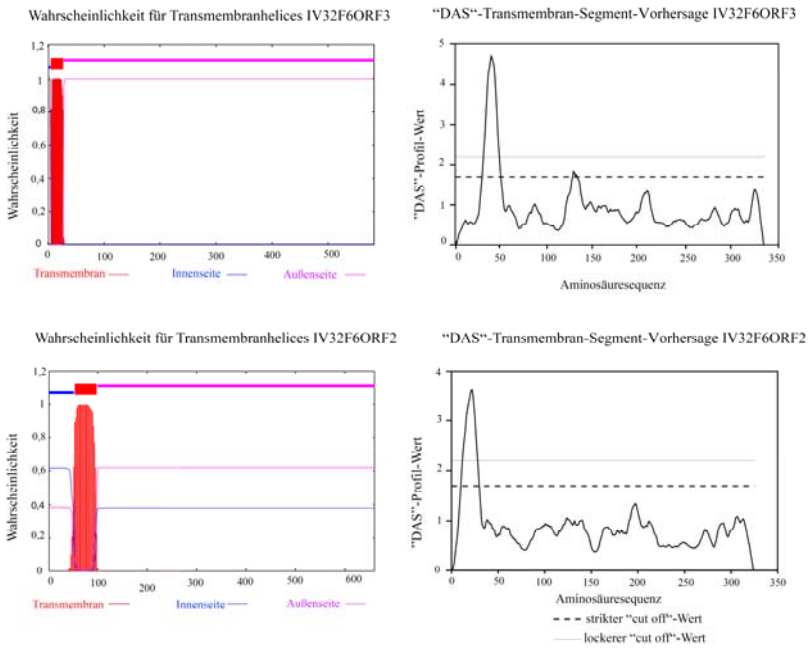

Abbildung 16: *In-silico*-Analyse der abgeleiteten Proteine HflC (oben) und HflK (unten), die den Membrankomplex HflKC bilden. Die Transmembrandomänen wurden mit dem TMHMM-Server v. 2.0 (links) und mit der DAS *transmembrane prediction*-Analyse (rechts) lokalisiert. Die Abszisse zeigt die Länge der Aminosäuresequenz und die Ordinate den Wahrscheinlichkeitswert. Überschreitet dieser einen Schwellenwert liegt, vermutlich innerhalb dieses Sequenzabschnittes eine alpha-helikale Transmembrandomäne vor.

Genbank eines marinen Sediments (Nesbø *et al*., 2005). Für diese abgeleiteten Proteine auf dem Genomfragment b1dcf5.1.a06 wurden homologe Domänenstrukturen einer Nukleosid-Diphosphat-Kinase, eines Fibronectin Typ III und einer "*PBS-Lyase-HEAT-like repeat*" vorhergesagt, was die Autoren zu Vermutungen über einen photosynthetischen Ursprung des dazu korrespondierenden Mikroorganismus führte (Nesbø *et al*., 2005). Die *PBS-Lyase-HEAT-like repeats* sind für die spezielle Anlagerung von Phycobillinen an die Apophycobillin-Untereinheiten der Phycobillisome (PBS) verantwortlich. Diese Lichtsammelkomplexe kommen in Cyanobakterien und roten Algen vor, die über eine oxygene Photosynthese Kohlenstoff assimilieren. Diese *PBS-Lyase-HEAT-like repeats* wurden gleichermaßen für kodierende Regionen in Genomen von Mitgliedern der *Archaea* und *Bacteria* vorhergesagt, wie zum Beispiel dem RC-I-Archaeon MRE50 (unkultiviert), *Methanospirillum hungatei* JF-1, *Escherichia coli* O9:H4 Stamm HS, *Planctomyces maris* DSM 8797^{T}, *Geobacter uraniireducens* Rf4

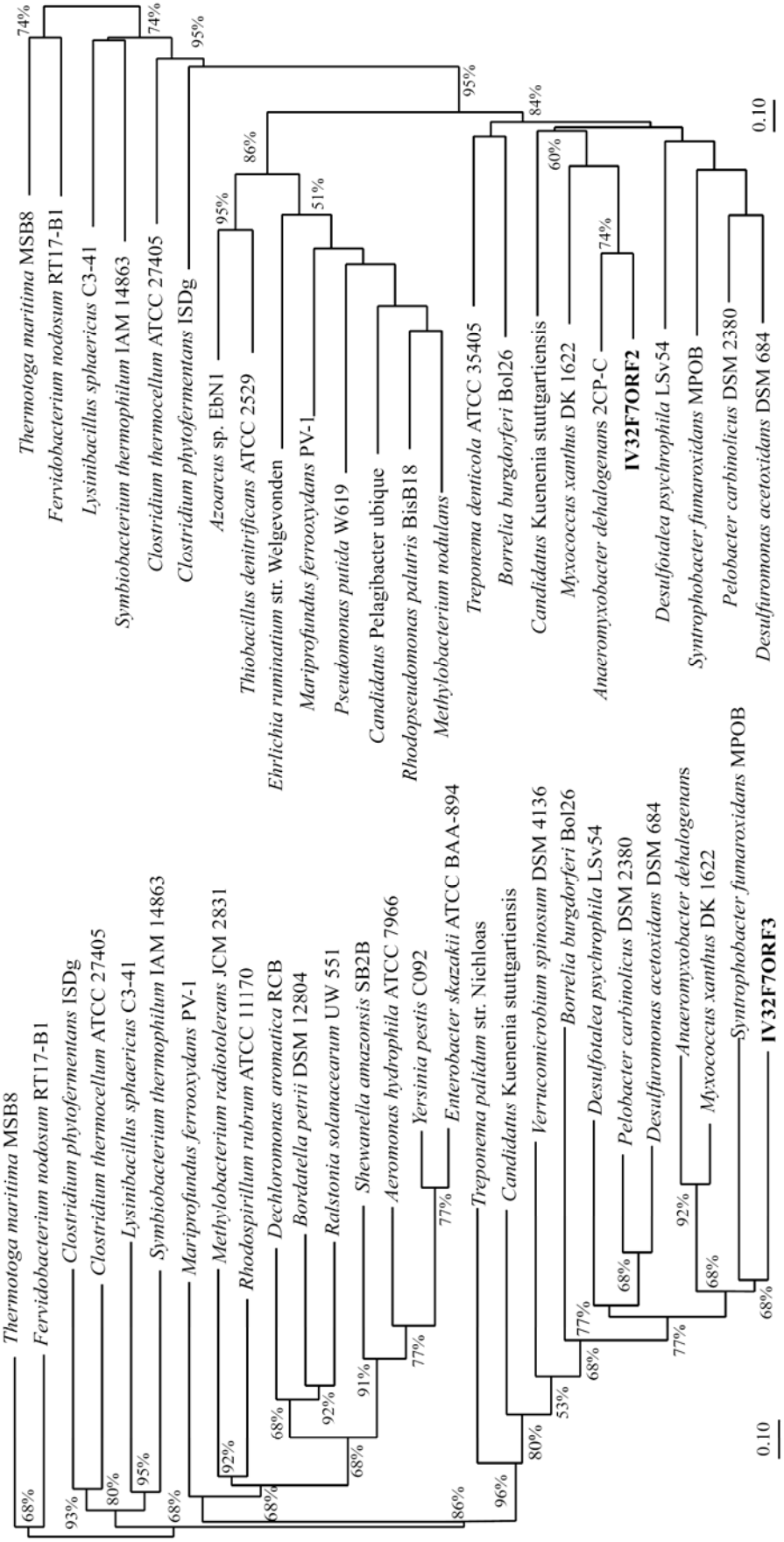

Abbildung 17: Maximum-Likelihood-Dendrogramme basierend auf den Regulierungsfaktoren HflC (links) und HflK (rechts). Die Position des vom Genomfragment IV32F6 (Fettdruck) abgeleiteten HflC- bzw. HflK-Proteins ist in Korrespondenz zu einer repräsentativen Auswahl bakterieller HflC- bzw. HflK-Varianten dargestellt. Der Maßstab zeigt einen Sequenzunterschied von 10%.

und *Lentisphaera araneosa* HTCC 2155. Für diese Organismen ist jedoch eine photosynthetische Lebensweise unbekannt. Neben einer Aldolase Klasse II (ORF21) wurde zusätzlich ein *malQ*-Gen (ORF16) identifiziert, das für eine Amylomaltase, ein essentielles Enzym des Maltose- und Maltodextrin-Metabolismus, kodiert. Die Substrate Maltose und Maltodextrin werden mittels der Aktivität dreier cytoplasmatischer Enzyme [Amylomaltase (MalQ), Maltodextrin-Phosphorylase (MalP), Maltodextrin-Glucosidase (MalZ)] zu Glukose und Glukose-1-Phosphat gespalten (Boos und Shuman, 1998).

3.5.2 Das Genomfragment IV180F6 (OP3)

Der Fosmid-Klon IV180F6 trug ein Insert von 33757 bp, dessen GC-Gehalt 49% war. Das rRNA-Operon zeigte eine typisch bakterielle Struktur einschließlich den tRNA-Genen (Alanin, Isoleucin). Auf dem Genomfragment konnten 30 Protein-kodierende Regionen identifiziert werden. Insgesamt wurden 12 ORFs funktionell annotiert (Abbildung 18, Tabelle 7). Die ORFs 8, 9, 23, 27 und 29 kodieren für hypothetische Proteine, die innerhalb der Domäne *Bacteria* konserviert sind. Fünf abgeleitete Aminosäuresequenzen wiesen in BlastP-Analysen die höchsten Übereinstimmungen mit dazu korrespondierenden Proteinsequenzen von Mitgliedern der *Proteobacteria* auf, davon allein vier zu den *Deltaproteobacteria*. Andere ORFs zeigten die höchste prozentuale Ähnlichkeit mit Vertretern der *Firmicutes* (3), *Chlorobi* (1), *Chloroflexi* (1), *Planctomycetes* (1), *Nitrospirae* (1), *Euryarchaeota* (4) und *Eukarya* (1).

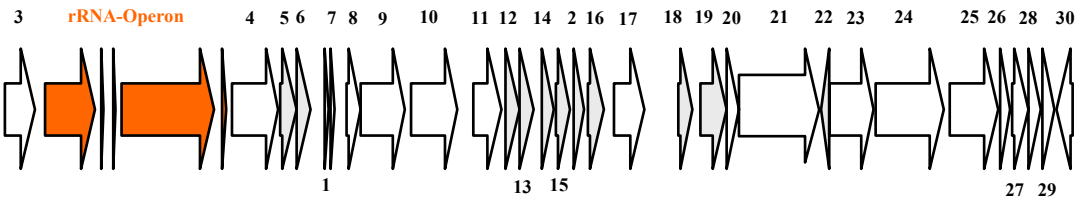

Abbildung 18: Schematische Darstellung der Anordnung und der Orientierung der offenen Leserahmen auf dem Genomfragment IV180F6, welches OP3 zugeordnet wurde. Es besitzt eine Größe von 33757 bp. Das rRNA-Operon ist in rot und die Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, sind in grau hervorgehoben.

Tabelle 7: Übersicht über die vorhergesagten Protein-kodierenden Gene auf dem Genomfragment IV180F6.

ORF[1)]	Lokus[2)]	Länge (aa)[3)]	INTERPRO[4)] Referenzen	Gen[5)]	BlastP-Ergebnis[6)] Organismus[6)]		E-Wert[7)]	Identität[8)]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
1	10252-10440	63							Hypothetisches Protein	
2	18112-18435	108	IPR009875						wahrscheinlich Typ IV Pilus für die Zusammensetzung PilZ	
3	285-1199	305	IPR011912	*hdlD* EC 5.1.3.20	*Hydrogenivirga s* p. 128-5-R1-1	*Aquifacae*	2,00E-79	49%	ADP-L-Glycero-D-Mannoheptose-Epimerase	Lipopolysaccharid-Biosynthese
rRNA	1490-3069	-							16S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	320-3362	-							tRNA-Ile	rRNA
rRNA	3655-3727	-							tRNA-Ala	rRNA
rRNA	3903-6818	-							23S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	7080-7194	-							5S ribosomale RNA	rRNA
4	7397-8854	563	IPR001940	EC 3.4.21.	*Oryza sativa japonica* cultivar-group	*Plant*	2,00E-100	42%	Peptidase S1C, HrtA/DegP2/Q/S	Proteolyse
5	8896-9378	161							Hypothetisches Protein	
6	9396-9848	151							Hypothetisches Protein	
7	10450-10569	40							Hypothetisches Protein	
8	11007-11429	141	IPR002804		*Methanosarcina barkeri* str. Fusaro	*Euryarchaeota*	3,00E-17	33%	Konserviertes hypothetisches Protein unbekannter Funktion DUF101	Unbekannt
9	11443-12831	463			*Geobacter metallireducens* GS-15	*δ-Proteobacteria*	1,00E-94	45%	Konserviertes hypothetisches Protein	Unbekannt
10	13016-14467	484	IPR001233		*Dehalococcoides ethenogenes* 195	*Chloroflexi*	2,00E-152	53%	Protein unbekannter Funktion UPF0027 Homolog zu *rctB* von *E. coli*	Unbekannt
11	14549-15817	423	IPR002317	*serS* EC 6.1.1.11	*Moorella thermoacetica* ATCC 39073	*Firmicutes*	7,00E-127	53%	Seryl-tRNA-Synthetase, Klasse IIa	Translation
12	15548-16376	143			*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 84-25	*ε-Proteobacteria*	2,40E+00	27%	Hypothetisches Protein	
13	16427-16816	130			*Blastopirellula marina* DSM 3645	*Planctomycetes*	0.016	29%	PilZ-Domäne bakterieller Signalproteine	
14	17070-17471	134							Hypothetisches Protein	
15	17537-18007	157							Hypothetisches Protein	
16	18456-19040	165							Hypothetisches Protein	
17	19364-20314	317	IPR007197		*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	*Firmicutes*	3,00E-55	37%	Radikalisches SAM-Domänenprotein	Eisen-Bindung
18	21360-21857	166							Hypothetisches Protein	
19	22062-22889	276							Hypothetisches Protein	
20	22923-23306	128	IPR011006	*cheY*	*Geobacter sulfurreducens* PCA	*δ-Proteobacteria*	3,00E-19	39%	Bakterieller Chemotaxis*resonse regulator*	Signaltransduktion

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
21	23306-25774	823		*envZ* EC 2.7.13.3	*Methanosarcina acetivorans* C2A	*Euryarchaeota*	2,00E-68	41%	Sensorüberträgungs-Histidin-Kinase	Signaltransduktion
22	26097-25849	83							Hypothetisches Protein	
23	26125-27531	469			*Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031	*Chlorobi*	3,00E-30	28%	Konserviertes hypothetisches Protein	
24	27570-29699	710	IPR003660 IPR004089		*Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684	δ-*Proteobacteria*	8,00E-132	41%	Methyl-akzeptierender Chemotaxis Sensorüberträger	Signaltransduktion
25	29895-31400	502	IPR003669	*thyX* EC 2.1.1.148	*Syntrophus aciditrophicus* SB	δ-*Proteobacteria*	1,00E-129	49%	FAD-abhängige Thymidylat-Synthase	dTNP-Biosynthese
26	31468-31800	111			*Acidobacteria bacterium* strain Ellin345	*Acidobacteria*	1,00E-06	38%	*Response regulator reveiver domain*	
27	31835-32368	178	IPR001226		*Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061	*Euryarchaeota*	5,00E-04	25%	Konserviertes hypothetisches Protein	
28	32385-32765	127							Hypothetisches Protein	
29	32822-33169	116							Konserviertes hypothetisches Protein	
30	33757-33248	170	IPR000352	*prfA*	*Geobacter uraniireducens* Rf4	δ-*Proteobacteria*	2,00E-16	52%	Klasse 1 *petide chain release factor*	Translokation

1) "open reading frame", offener Leserahmen.

2) Nukleotidbereich auf dem Genomfragment.

3) Länge des vermutlichen Proteins.

4) Eintrag in der InterPro-Datenbank (Datenbank für Proteinfamilien, Domänen, Wiederholungen und funktionelle Stellen).

5) Vermutliches Gen mit der entsprechenden EC-Nummer.

6) Organismus mit dem höchsten Ähnlichkeitswert (Identität)[7] und dem Erwartungswert[8], der bei der BlastP-Analyse ermittelt wurde.

Auf dem Genomfragment wurden Gene identifiziert, die vermutlich für eine ADP-L-Glycero-D-Manno-Heptose-6-Epimerase (HdlD) und einen Klasse I *peptide chain release factor* (PrfA) kodieren. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF25 wurde als eine FAD-abhängige Thymidylat-Synthase (ThyX) vorhergesagt, welche an der Biosynthese von dNTP beteiligt ist. ORF11 kodiert für ein SerS-Protein (53% Ähnlichkeit zur Referenzsequenz), welche aufgrund von Sequenzhomologien zu Threonin-, Prolin- und Tyrosin-tRNA-Synthetasen in die Klasse IIa der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen eingeordnet werden. Zusätzlich konnten die abgeleiteten Proteine der ORFs 20, 21 und 24 als vermutliche Bestandteile eines Zwei-Komponenten-Systems für die Signaltransduktion der bakteriellen Chemotaxis identifiziert werden. Dieses System ermöglicht es Mikroorganismen auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. In einem chemischen Gradienten bewegen sie sich gerichtet in Regionen mit hohen Substratkonzentrationen und entfernen sich von schädigenden Substanzen. Das Zwei-Komponenten-System besteht im wesentlichem aus einer dimeren Histidin-Protein-Kinase (ORF21) und einem "*response regulator*" (ORF20) (Wadhams und Armitage, 2004). Die Histidin-Kinase hat eine Sensordomäne, die die Cytoplasmamembran durch Transmembranhelices zweimal umfasst und im Periplasma die extrazellulären Stimuli erkennt (Abbildung 19). Die Histidin-Kinase-Domäne katalysiert die Auto-Phosphorylierung des Histidinrests und die Übertragung einer Phosphatgruppe auf den Aspartatrest der Empfängerdomäne des

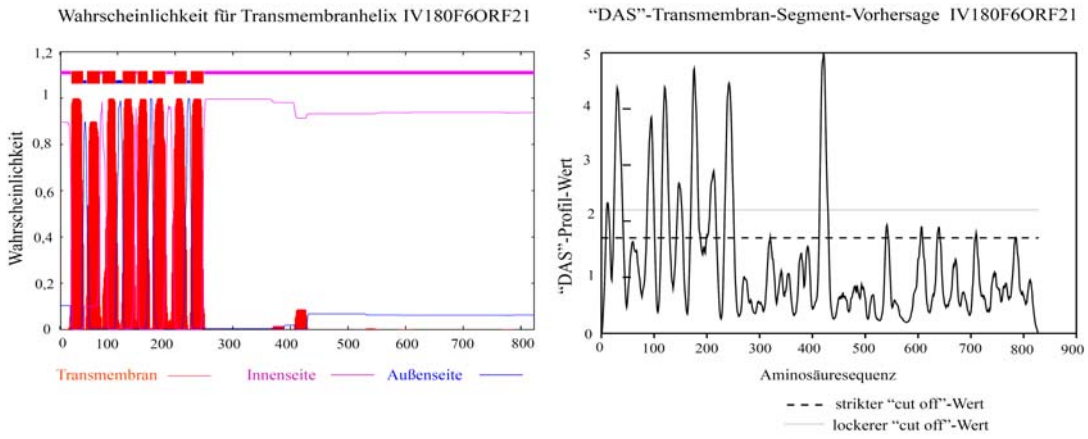

Abbildung 19: Die Darstellung der Transmembranhelices unter Verwendung des TMHMM-Servers (rechts) und DAS (links) der Histidin-Kinase, welche durch das ORF21 auf dem Genomfragment IV180F6 kodiert wird.

response regulator. Mit der Phosphorylierung des *response regulator* wird eine zelluläre Reaktion auf den Stimulus ausgelöst (West und Stock, 2001) (Abbildung 20).

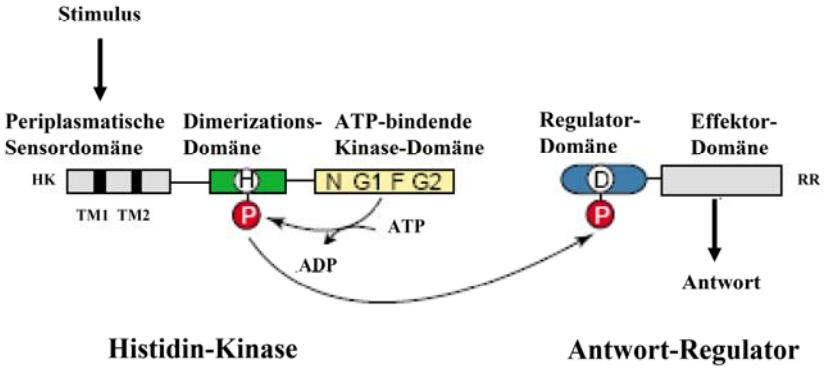

Abbildung 20: Schematische Darstellung eines typischen Zwei-Komponenten-Phosphattransfer-Systems (West und Stock, 2001).

3.5.3 Das Genomfragment IV226A8 (NBL-UPA2)

Der Fosmid-Klon IV226A8 enthielt ein Insert von 34992 bp mit einem GC-Gehalt von 42%. Das rRNA-Operon zeigte eine typische bakterielle Struktur mit der Abfolge 16S rRNA, 23S rRNA und 5S rRNA sowie die tRNA-Genen Alanin und Isoleucin (Abbildung 21, Tabelle 8). Auf dem Genomfragment IV226A8 waren 29 Protein-kodierende Regionen lokalisiert, wobei 25 ORFs funktionell zugeordnet werden konnten. Eine sehr hohe Anzahl der abgeleiteten Proteinsequenzen (16) wurden taxonomisch Mitgliedern der *Proteobacteria* zugeordnet. Insgesamt zeigten 10 ORFs in BlastP-Analysen die höchste Übereinstimmung mit dazu korrespondierenden Proteinsequenzen von Vertretern der *Deltaproteobacteria*. Andere ORFs wiesen höchste prozentuale Ähnlichkeiten zu Homologen von Mitgliedern der *Actinobacteria* (1), *Acidobacteria* (1), *Chloroflexi* (1), *Cyanobacteria* (2), *Planctomycetes* (1), *Spirochaetes* (2) und *Euryarchaeota* (1) auf.

Auf einer ca. 8-kbp Region des Genomfragments IV226A8 wurden neun ORFs identifiziert, die vermutlich für Untereinheiten des NADH-Dehydrogenase Komplexes I kodieren (Proteine NuoA bis NuoI). Der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase) Komplex I katalysiert die Übertragung von Elektronen von NADH zu Ubichinon. Gleichzeitig wird ein Protonenpotential

Tabelle 8: Übersicht über die vorhergesagten Protein-kodierenden Gene auf dem Genomfragment IV226A8.

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus[6]		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
1	34992-33988	335			*Roseiflexus castenholzii* DSM 13941	*Chloroflexi*	6,00E-38	31%	konserviertes hypothetisches Protein mit PT Wiederholung	
2	12-506	165	IPR001440	TPR_1	*Aquifex aeolicus* VF5	*Aquificae*	2,00E-35	49%	konserviertes hypothetisches Protein mit Tetratricopeptid-Wiederholungsdomäne	
3	602-949	116	IPR000440	*nuoA* EC 1.6.5.3	*Leptospirillum* sp. Group II UBA	*Nitrospirae*	9,00E-17	40%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit A	Elektronentransport
4	997-1461	155	IPR014659 IPR006137	*nuoB* EC 1.6.5.3	*Myxococcus xanthus* DK 1622	δ-*Proteobacteria*	2,00E-62	66%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit B	Elektronentransport
5	1532-1999	156	IPR010218	*nuoC*	uncultured *Nitrospinaceae* bacterium	δ-*Proteobacteria*	2,00E-43	54%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit C	Elektronentransport
6	2004-3350	449	IPR010219	*nuoD*	*Myxococcus xanthus* DK 1622]	δ-*Proteobacteria*	1,00E-115	47%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit D	Elektronentransport
7	3350-3832	161	IPR002023	*nuoE*	*Sinorhizobium meliloti*	α-*Proteobacteria*	3,00E-29	39%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit E	Elektronentransport
8	3852-5120	423	IPR011537	*nuoF*	*Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C	δ-*Proteobacteria*	1,00E-128	55%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit F	Elektronentransport
9	5170-6762	531	IPR010228	*nuoG*	*Myxococcus xanthus* DK 1622	δ-*Proteobacteria*	3,00E-103	39%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit G	Elektronentransport
10	6768-7889	375	IPR001694	*nuoH*	uncultured *Nitrospinaceae* bacterium	δ-*Proteobacteria*	4,00E-85	49%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit H	Elektronentransport
11	8626-8446	178	IPR010226	*nuoI*	*Myxococcus xanthus* DK 1622		2,00E-34	44%	NADH-Dehydrogenase Komplex I Untereinheit I	Elektronentransport
12	9626-11457	944			*Nitrosospira multiformis* ATCC 25196	β-*Proteobacteria*	8,00E-148	40%	Diguanylat-Cyclase/ Phosphodiesterase (GGDEF & EAL)	Elektronentransport Signaltransduktion
13	11538-12923	462	IPR005677	*fumC* EC 4.2.1.2	*Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis L550	*Spirochaetes*	2,00E-176	66%	Klasse II Fumarasen	Fumarat-Metabolismus
14	14460-12923	506	IPR000523		*Geobacter sulfurreducens* PCA	δ-*Proteobacteria*	2,00E-145	49%	Magnesium-Chelatase ChII Untereinheit	Photosynthese Chlorophyll-Biosynthese
15	14677-15078	134	IPR003832		*Alkaliphilus metalliredigens* QYMF	*Firmicutes*	1,00E-27	48%	Saure Phosphatase/Vanadium-abhängige Haloperoxidase ähnlich	Unbekannt
16	15084-15884	267	IPR005490		Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*	*Planctomyetes*	3,00E-41	40%	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG Domänenprotein	
17	15890-16885	322	IPR001095	*accA* EC 6.4.1.2	*Geobacter metallireducens* GS-15	δ-*Proteobacteria*	2,00E-99	58%	Acetyl-CoA-Carboxylase	Fettsäure-Metabolismus

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
18	17100-16903	66							Hypothetisches Protein	
19	17305-17853	183							Hypothetisches Protein	
20	17846-18079	78	IPR000551 IPR011797 IPR010211		*Salinispora arenicola* CNS205	*Actinobacteria*	2,00E-09	37%	Bakterielles Regulator-Protein, MerR-Familie	Transkription
21	18115-18891	259	IPR012845		*Acidothermus cellulolyticus* 11B	*Actinobacteria*	8,00E-60	48%	RNA-Polymerase Sigma-Faktor, FliA/WhiG	Transkription
22	19022-19288	89							Hypothetisches Protein	
23	20622-19360	421			*Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1	*Thermotogales*	2,00E-78	41%	Konserviertes hypothetisches Protein	
24	21272-30631	214	IPR003660		*Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684	*δ-Proteobacteria*	5,00E-06	27%	Histidin-Kinase, HAMP-Region	Signaltransduktion Zwei-Komponentensystem
rRNA	21480-23035	-							16S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	23507-23579	-							tRNA-Ile	rRNA
rRNA	23730-23802	-							tRNA-Ala	rRNA
rRNA	24053-27222	-							23S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	27407-27520	-							5S ribosomale RNA	rRNA
25	27661-28965	435			*Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406	*Bacteriodetes*	2,00E-16	23%	Hypothetisches Protein	
26	29054-30730	559	IPR007890 IPR000160		*Methylobacterium chloromethanicum* CM4	*α-Proteobacteria*	4,00E-33	43%	CHASE2 &GGDEF Domänen	Signaltransduktion
27	31611-30769	261	IPR001761		*Sphingomonas wittichii* RW1	*α-Proteobacteria*	7,00E-31	33%	Periplasmatisches Bindeprotein/LacI Transkriptionsregulator	Signaltransduktion
28	31721-33007	429	IPR001087		*Trichodesmium erythraeum* IMS101	*Cyanobacteria*	3,00E-15	31%	SGNH_Hydrolase oder GDSL_Hydrolase	Lipid-Metabolismus
29	33018-33988	331	IPR001173		*Pyrococcus furiosus* DSM 3638	*Euryarchaeota*	2,00E-22	28%	Glykosyl-Transferase Familie 2	

1) "open reading frame", offener Leserahmen.

2) Nukleotidbereich auf dem Genomfragment.

3) Länge des vermutlichen Proteins.

4) Eintrag in der InterPro-Datenbank (Datenbank für Proteinfamilien, Domänen, Wiederholungen und funktionelle Stellen).

5) Vermutliches Gen mit der entsprechenden EC-Nummer.

6) Organismus mit dem höchsten Ähnlichkeitswert (Identität)[7] und dem Erwartungswert[8], der bei der BlastP-Analyse ermittelt wurde.

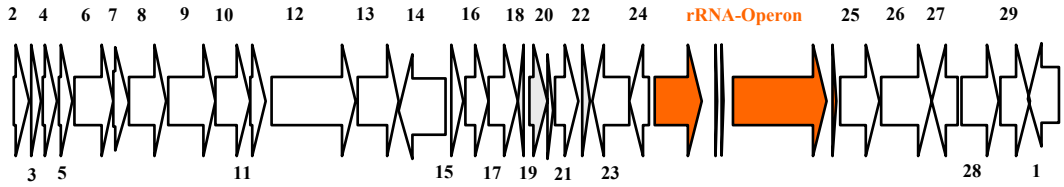

Abbildung 21: Schematische Darstellung der Anordnung und der Orientierung der offenen Leserahmen auf dem Genomfragment IV226A8, welches NBL-UPA2 zugeordnet wurde. Es besitzt eine Größe von 34992 bp. Das rRNA-Operon ist in rot und die Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, sind in grau hervorgehoben.

über die Cytoplasmamembran aufgebaut, welches die ATP-Synthese mittels ATPase antreibt. Die NADH-Dehydrogenase entspricht in ihrem Aufbau und der Funktion dem mitochondrialen Komplex I und wird von 13 Strukturgenen (*nuoA-N*) kodiert. Der NADH-Dehydrogenase-Komplex besteht aus drei verschiedenen Subkomplexen, dem peripheren (NuoEFG), dem verbindenden (NuoBCDI) und dem Membran-Subkomplex (NuoAHJN), die wiederum aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind (Leif *et al*., 1995; Braun *et al*., 1998; Falk-Krzesinski und Wolfe, 1998). Das periphere Fragment besitzt die NADH-Dehydrogenaseaktivität und oxidiert NADH zu NAD^+. Das Membranfragment katalysiert die Reduktion von Ubichinon oder Menachinon zu Ubichinol oder Menachinol (Friedrich, 1998, Abbildung 22). Gene, welche vermutlich für den peripheren, den verbindenden Subkomplex und für zwei Untereinheiten des Membrankomplexes (NuoA und NuoH) der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase kodieren, wurden auf dem Genomfragment vorhergesagt. Die Gene *nuoJ* bis *nuoN* konnten auf dem Genomfragment nicht identifiziert werden. Die abgeleiteten Proteine NuoB bis NuoD sowie NuoF bis NuoI wiesen in BlastP-Analysen höchste prozentuale Ähnlichkeit zu korrespondierenden Proteinsequenzen der Gattungen *Anaeromyxobacter* und *Myxococcus* (*Deltaproteobacteria*) auf. Die abgeleiteten Proteinsequenzen der kodierenden Gene für NuoA und NuoE besitzen Homologe in Mitgliedern der *Nitrospirae* bzw. *Alphaproteobacteria*. Die Lokalisation der identifizierten *nuo*-Gene auf den sequenzierten Genomen von Vertretern der *Deltaproteobacteria* ist nicht einheitlich. So liegen die Protein-kodierenden Gene *nuoA* bis *nuoN* zum Beispiel auf den Genomen von *Anaeromyxobacter* spp. und in dem Stamm *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380^T in einem gemeinsamen Operon

vor. Im Gegensatz dazu sind die Gene *nuoA* bis *nuoN* auf den Genomen von *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB, *Myxococcus xanthus* DK 1622 und *Geobacter metallireducens* GS-15 nicht in einem Operon organisiert, sondern sind nur teilweise als Fusionsproteine hintereinander geschaltet.

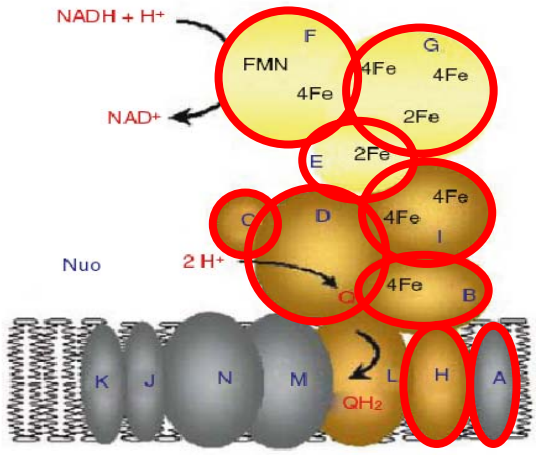

Abbildung 22: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Nuo) von *Escherichia coli*. Die großen Buchstaben zeigen die Untereinheiten des Enzyms. Die rot umrandeten Untereinheiten sind solche, dessen Gene auf dem Genomfragment IV226A8 identifiziert wurden. Abkürzungen: 4Fe: [4Fe-4S] Cluster; 2Fe: [2Fe-2S] Cluster; FMN: Flavinmononukleotid; FAD, Flavindinukleotid; Q: Ubichinon oder Menachinon (nach Hedderich und Whitman, 2006).

Außerdem wurde auf dem Genomfragment ein *fumC*-Gen (ORF13) vorhergesagt. Das Fumarase C-Enzym katalysiert die reversible Hydratisierung von Fumarat zu L-Malat im Citrat-Zyklus. ORF17 kodiert vermutlich für die Funktion einer Acetyl-CoA-Carboxylase. Dieses Enzym katalysiert die erste und die Geschwindigkeit bestimmende Reaktion in der Fettsäure-Biosynthese. Die Reaktion umfasst zwei Teilreaktionen. Zuerst wird Biotin mittels Bicarbonat carboxyliert und in der zweiten Reaktion wird die CO_2-Gruppe von Carboxybiotin auf Acetyl-CoA übertragen. Es entsteht Malonyl-CoA. Das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase besteht aus vier Untereinheiten (AccA-AccD). Die relative genomische Lokalisation der vier Protein-kodierenden Gene ist je nach bakteriellem Taxon unterschiedlich. So liegen zum Beispiel bei Mitgliedern der *Planctomycetes* (*Rhodopirellula baltica* SH-1, *Gemmata obscuriglobus* UQM 2246 und *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis) sowie bei *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136^T die Gene *accA*

und *accD* über das Genom verteilt vor. Dagegen sind die kodierenden-Gene für AccC und AccB nebeneinander lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind die vier Gene bei den Arten *Clostridium acetobutylicum* ATCC824^T, *Clostridium kluyveri* DSM 555^T und *Bacillus subtilis* sp. subtilis Stamm 168 in einem Operon organisiert. In BlastP-Analysen wies die abgeleitete AccA-Aminosäuresequenz des Genomfragments IV226A8 höchste Übereinstimmung mit den dazu korrespondierenden Proteinsequenzen von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* auf. Die Stammbaumanalysen zeigten dagegen, dass die AccA-Aminosäuresequenz des Genomfragments IV226A8 keine spezifische Verwandtschaft mit bekannten AccA-Varianten von ausgewählten Mitgliedern der Domäne *Bacteria* aufweist (Abbildung 23). Zusätzlich wurde eine Glykosyl-Transferase der Klasse 2 (ORF29) vorhergesagt, die unter Bildung glykosidischer Bindungen den Transfer von Zuckerresten eines aktivierten Donormoleküls auf ein Rezeptormolekül katalysiert. Glykosyl-Transferasen der Klasse 2 sind an sehr diversen Reaktionen beteiligt, unter anderem am Aufbau der Zellwand.

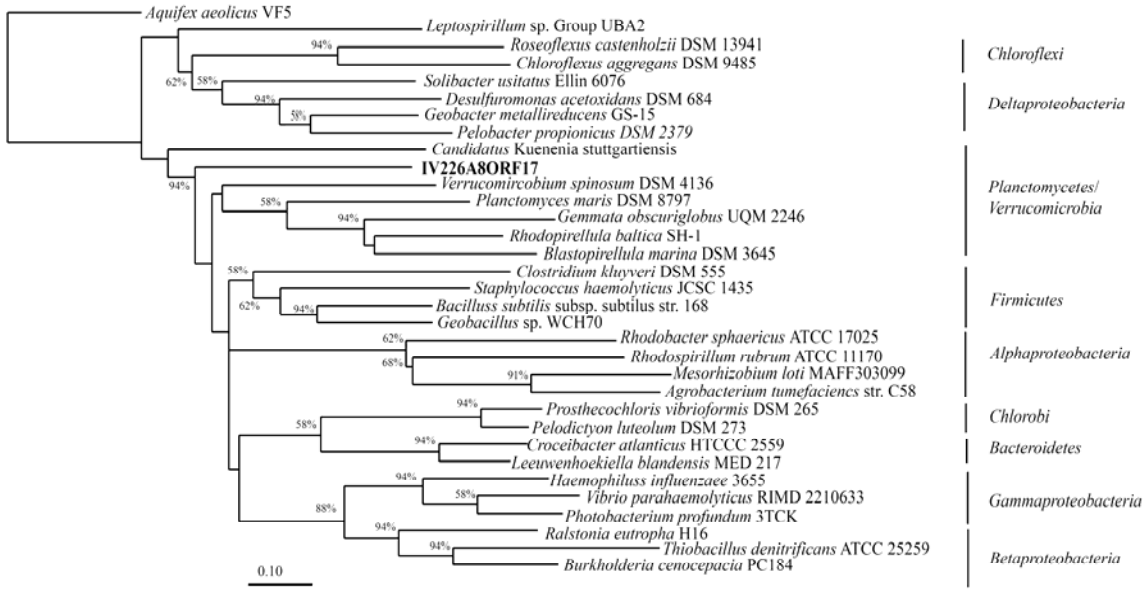

Abbildung 23: Maximum-Likelihood-Dendrogramm basierend auf der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccA). Die Position des vom Genomfragment IV226A8 (Fettdruck) abgeleiteten AccA-Proteins ist in Korrespondenz zu einer repräsentativen Auswahl bakterieller AccA-Varianten dargestellt. Der Maßstab zeigt einen Sequenzunterschied von 10%.

3.5.4 Das Genomfragment V174F5 (BRC1)

Der Fosmid-Klon V174F5 wies ein Insert von 37515 bp auf, dessen GC-Gehalt 60% betrug. Das rRNA-Operon zeigte die typisch bakterielle Struktur mit der Genabfolge 16S rRNA, 23S rRNA und 5S rRNA. Es wurden hingegen keine tRNA-Gene identifiziert. Auf dem Genomfragment V174F5 wurden 20 ORFs identifiziert (Tabelle 9, Abbildung 24). Insgesamt konnten 10 ORFs funktionell annotiert werden, wobei sieben ORFs vermutlich für hypothetische Proteine kodieren, die in der Domäne *Bacteria* konserviert sind. Die Mehrzahl der abgeleiteten Proteinsequenzen (25%) zeigte in BlastP-Analysen höchste Übereinstimmungen mit dazu korrespondierenden Proteinsequenzen von Mitgliedern der *Planctomycetes*. Andere ORFs wurden Vertretern der *Bacteroidetes* (3), *Chlorobi* (1), *Proteobacteria* (2), *Cyanobacteria* (3) und *Euryarchaeota* (1) zugeordnet.

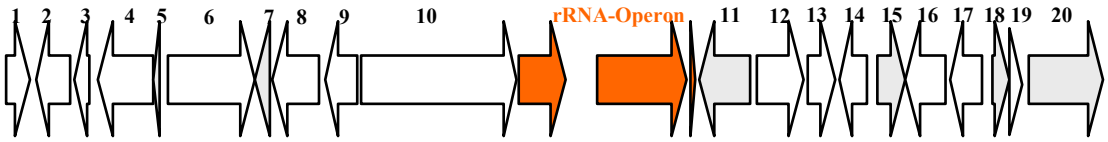

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Anordnung und der Orientierung der offenen Leserahmen auf dem Genomfragment V175F5, welches BRC1 zugeordnet wurde. Es besitzt eine Größe von 37515 bp. Das rRNA-Operon ist in rot und die Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, sind in grau hervorgehoben.

ORF3 kodiert vermutlich für eine mit GCN5-verwandte N-Acetyltransferase (GNAT). GNATs katalysieren den Transfer der Acetyl-Gruppen des Acetyl-Coenzym A (AcCoA) auf ein primäres Amin. Diese Superfamilie beinhaltet viele nicht verwandte Klassen von Enzymen (~10000), die eine einheitliche hochkonservierte Strukturfaltung zeigen (Dyda *et al.*, 2000; Vetting *et al.*, 2005). Darüber hinaus kodiert ORF19 vermutlich für eine Histon-N-Acetyltransferase (HAT). HATs sind Mitglieder der GNAT-Superfamilie und sind an der Acetylierung von Histonen an spezifischen Lysin-Resten beteiligt (Carrozza *et al.*, 2003). Dieser Prozess ist für die Aktivierung der Transkription und der DNA-Replikation notwendig (Vetting *et al.*, 2005). Außerdem wurde die abgeleitete

Tabelle 9: Übersicht über die vorhergesagten Protein-kodierenden Gene auf dem Genomfragment V174F5.

ORF[1]	Lokus[2]	Länge (aa)[3]	INTERPRO[4] Referenzen	Gen[5]	BlastP-Ergebnis[6] Organismus[6]		E-Wert[7]	Identität[8]	Vorhergesagte Funktion	Stoffwechselweg
1	1335-2072	246	IPR005132		*Anabaena variabilis* ATCC 2941	*Cyanobacteria*	3,00E-21	57%	Lipoprotein A Präkursor	
2	3447-2299	383			*Pyrococcus furiosus* DSM 3638	*Euryarchaeota*			Konserviertes hypothetisches Protein	
3	4099-3551	183	IPR000182						GCN5-verwandte N-Acetyltransferase Domäne	
4	6165-4348	606	IPR003696	EC 2.1.3	*Crocosphaera watsonii* WH 8501	*Cyanobacteria*	0,00E+00	57%	Carbamoyltransferase	
5	6387-6181	69							Hypothetisches Protein	
6	6682-9522	947			*Lentisphaera araneosa* HTCC2155	*Lentisphaerae*	7,00E-59	30%	Nicht charakterisiertes Protein	
7	10018-9569	150							Hypothetisches Protein	
8	11630-10113	506	IPR005671	*leuA* EC 2.3.3.13	*Beggiatoa* sp. PS	*γ-Proteobacteria*	3,00E-154	52%	α-Isopropylmalat-Synthase	Aminosäure-Biosynthese
9	12896-11835	354	IPR006219	*aroG* EC 2.5.1.54	*Planctomyces maris* DSM 8797	*Planctomycetes*	3,00E-125	64%	3-Deoxy-D-Arabino-7-Phosphoheptulonat-Synthetase	Aminosäure-Biosynthese
10	13061-18208	1716	IPR006101	*lacZ*	*Bacteroides thetaiotaomicron*	*Bacteroidetes*	6,00E-20	23%	Glykosid-Hydrolase Familie 2, Beta-Galactosidase	Kohlenstoff-Metabolismus
rRNA	18871-20397	-							16S ribosomale RNA	rRNA
rRNA		-							tRNA-Ile	rRNA
rRNA		-							tRNA-Ala	rRNA
rRNA	20832-23759	-							23S ribosomale RNA	rRNA
rRNA	23949-24069	-							5S ribosomale RNA	rRNA
11	25918-24230	563			*Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5	*δ-Proteobacteria*	6,00E-31	26%	nicht charakterisierter Proteinpräkursor	
12	26142-27620	493			*Blastopirellula marina* DSM 3645	*Planctomycetes*	3,00E-101	41%	Wahrscheinlich: NADH-abhängige Dyhydrogenase	
13	27759-28679	307	IPR001719		*Planctomyces maris* DSM 8797	*Planctomycetes*	8,00E-61	42%	Vorhergesagtes nicht charakterisiertes Protein	DNA-Reparatur
14	29778-28822	319	IPR002569	*msrA*	*Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031	*Chlorobi*	e-106	61%	Methioninsulphoxid-Reduktase A	Protein-Metabolismus
15	30113-31003	297		EC 1.8.4.11					Hypothetisches Protein	
16	32333-31023	437	IPR011047	EC 1.1.99.8	*Planctomyces maris* DSM 8797	*Planctomycetes*	1,00E-99	46%	Quinonprotein-Alkohol-Dehydrogenase-ähnlich	
17	32536-32457	360	IPR007160		*Solibacter usitatus* Ellin 6076	*Acidobacteria*	1,00E-51	35%	Protein unbekannter Funktion DUF362	
18	33900-34451	184			*Shewanella amazonensis* SB2B	*γ-Proteobacteria*			Konserviertes hypothetisches Protein	
19	34451-34909	153	IPR005910	EC 2.3.1.	*Rhodopirellula baltica* SH 1	*Planctomycetes*	7,00E-22	43%	Histon-Acetyltransferase ELP3	Metabolismus
20	35053-37515	821			*Planctomyces maris* DSM 8797	*Planctomycetes*	2,00E-140	36%	Konserviertes hypothetisches Protein	

1) "open reading frame", offener Leserahmen.

2) Nukleotidbereich auf dem Genomfragment.

3) Länge des vermutlichen Proteins.

4) Eintrag in der InterPro-Datenbank (Datenbank für Proteinfamilien, Domänen, Wiederholungen und funktionelle Stellen).

5) Vermutliches Gen mit der entsprechenden EC-Nummer.

6) Organismus mit dem höchsten Ähnlichkeitswert (Identität)[7] und dem Erwartungswert [8], der bei der BlastP-Analyse ermittelt wurde.

Aminosäuresequenz des ORFs 8 mit 52% Sequenzähnlichkeit als eine α- Isopropylmalat-Synthase (LeuA) annotiert. Leucin wird in *Bacteria*, *Archaea* und *Eukaryota* aus 2-Oxoisovalerat mittels der Aktivität von vier Enzymen [α-Isopropylmalat-Synthase (LeuA), 2-Isopropylmalat-Isomerase (LeuCD), 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (LeuB) und α-Ketoisocaproat-Transaminase (IlvE)] synthetisiert (Fondi *et al*., 2007; Abbildung 25).

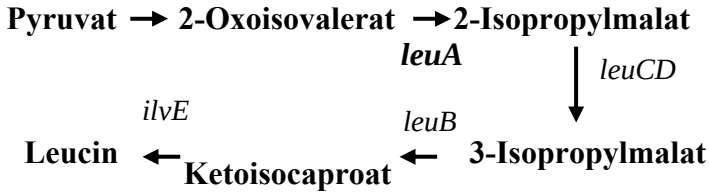

Abbildung 25: Biosyntheseweg von Leucin in *Bacteria*, *Archaea* und *Eukaryota* (nach Pátek *et al.*, 1994; Fondi *et al.*, 2007).

ORF9 kodiert vermutlich eine 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthetase (DAHP, *aroG*). Die DAHP-Synthetase katalysiert die erste Reaktion des Shikimat-Weges für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Bakterien, Pilzen und Pflanzen. Das aus der Glykolyse kommende Phosphoenolpyruvat und das aus dem Pentosephosphatweg stammende Erythrose-4-Phosphat werden zu DAHP kondensiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *aroG* auf dem Genomfragment V174F5 gruppierte im Dendrogramm nächst mit AroG-Varianten von Vertretern der Phyla *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* (Abbildung 26). Darüber hinaus wurde für ORF16 ein Chinohämoprotein-Alkohol-Dehydrogenase-ähnliches Protein (ADH) vorhergesagt. ADH-Enzyme besitzen Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ) als prosthetische Gruppe und katalysieren die Dehydrogenierung von primären oder sekundären Hydroxy-Gruppen in Alkoholen oder Zuckern. PQQ-abhängige ADHs wurden im Gegensatz zu ADHs bisher nur in einigen Bakterien der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaproteobacteria* nachgewiesen (Toyama *et al.*, 2004). Die BlastP-Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von ORF16 zeigte 46% Sequenzähnlichkeit zu PQQ-abhängigen ADHs von Vertretern der *Planctomycetes* (*P. maris* DSM 8797^T, *R. baltica* SH-1, *B. marina* DSM 3645^T) und *V. spinosum* DSM 4136^T. Für die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORFs 10 wurde die

Funktion einer β-D-Galactosidase der Glykosid-Hydrolase Familie 2 vorhergesagt. Die Glykosid-Hydrolasen sind eine weit verbreitete Gruppe an Enzymen, die glykosidische Bindungen zwischen zwei oder mehreren Kohlenhydraten hydrolytisch spalten. Beispielsweise hydrolisieren die β-D-Galactosidasen (ORF10) die nicht-terminalen β-D-Galactose-Reste von β-D-Galactosiden. Außerdem wurde für die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF14 die Funktion einer Methioninsulfoxid-Reduktase A (MsrA) vorhergesagt. In fast allen Organismen wurden Homologe von MsrA und MsrB (Methioninsulfoxid-Reduktase B) identifiziert. Die bei oxidativen Stress gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) reagieren mit Bestandteilen der Zellen und führen zu Veränderungen der Struktur oder Inaktivierung von Proteinen. Methionin ist für ROS am sensibelsten und wird durch deren Einwirkung in Methioninsulfoxid umgewandelt. Die geschädigten Methionin-Reste werden durch die Aktivität der Methioninsulphoxid-Reduktasen A und B repariert (Weissbach *et al*., 2005; Ezraty *et al*., 2005).

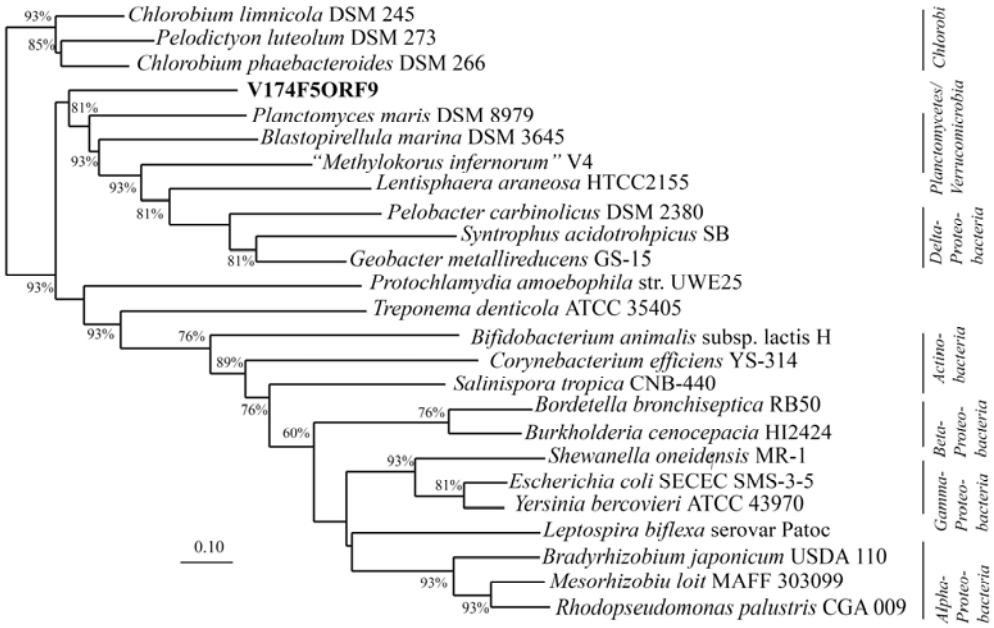

Abbildung 26: Maximum-Likelihood-Dendrogramm basierend auf der 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthetase (AroG). Die Position des vom Genomfragment V174F5 (Fettdruck) abgeleiteten AroG-Proteins ist in Korrespondenz zu einer repräsentativen Auswahl bakterieller AroG-Varianten dargestellt. Der Maßstab zeigt einen Sequenzunterschied von 10%.

3.5.5 23S rRNA-Gen-basierte Phylogenie

Die 23S rRNA-Gene der vier Genomfragmente IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5 wurden einer detaillierten Sequenzanalyse unterzogen. Das 23S rRNA- (und 5S rRNA-) Gen des Genomfragments IV32F6 wies 85,3% (bzw. 80%) Sequenzähnlichkeit zu einem Genomfragment b1dcf5.1.a06 auf, welches aus einem marinen Sediment im Hafen von Baltimore (USA) erzielt wurde (Nesbø *et al*., 2005). Auf Basis einer 23S rRNA-Gen-basierten Analyse der Genbanken des marinen Sediments war Nesbø und Mitarbeitern (2005) eine phylogenetische Zuordnung des Genomfragments b1dcf5.1.a06 nicht möglich. Die Bestrebungen, die 16S rRNA-Gensequenz zu erhalten, blieben ohne Erfolg. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stammbaumanalysen zeigten hingegen, dass das Genomfragment b1dcf5.1.a06 mit den Genomfragmenten des inkubierten Reisfeldbodens gruppiert und damit phylogenetisch dem OP3 zugeordnet werden kann (Abbildung 27). Das 23S rRNA-Gen des Genomfragments IV180F6 wies 80,5% bzw. 79% Sequenzähnlichkeit zu den Genomfragmenten b1dcf5.1.a06 und IV32F6 auf und gruppierte gleichermaßen in OP3. Mit 74,9% Sequenzähnlichkeit zu dem Genomfragment IV32F6, 79% zu IV180F6 und 77,4% zu dem Genomfragment b1dcf5.1.a06 gruppierte das 23S rRNA-Gen des Genomfragments IV226A8 nächst zu den OP3-Genomfragmenten. Die einheitlichen 16S rRNA- und 23S rRNA-Phylogenien erlauben die Schlussfolgerung, dass die Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV226A8 (diese Arbeit) sowie das Genomfragment b1dcf5.1.a06 (Nesbø *et al*., 2005) von Populationen des OP3 abgeleitet sind. In der vergleichenden Sequenzanalyse der 23S rRNA-Gene zeigten WS3 und BRC1 eine geringere Verwandtschaft zueinander als in den 16S rRNA-basierten Phylogenien. Der Ursprung von BRC1 und WS3 in den 23S rRNA Gen-basierten Phylogenien war von der Auswahl der Referenzsequenzen abhängig und damit war die phylogenetische Zuordnung der 23S rRNA-Gene nicht stabil. Die 23S rRNA-Gene der Genomfragmente von BRC1 und WS3 gruppierten jedoch in der Mehrheit der phylogenetischen Verrechnungsmethoden mit Mitgliedern des PVC-Superphylums.

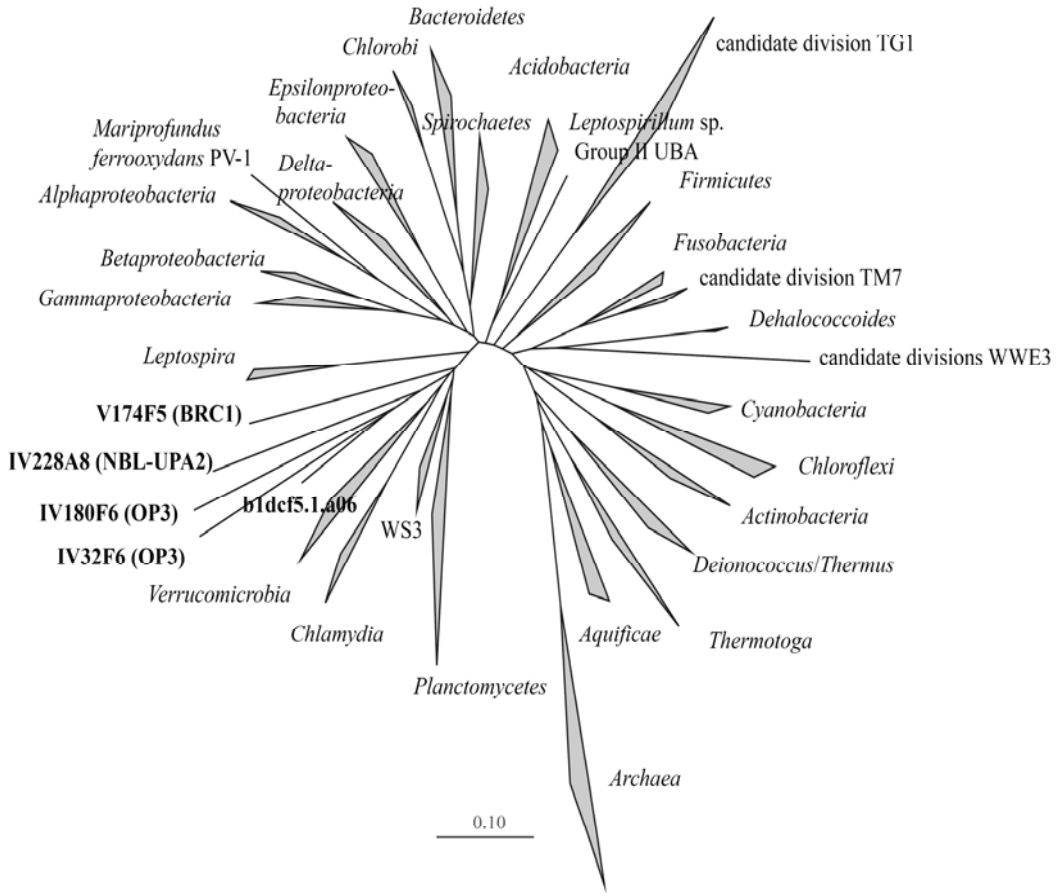

Abbildung 27: Phylogenie basierend auf dem 23S rRNA-Gen, das die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den sequenzierten Fosmid-Klonen (Fettdruck) und ausgewählten Mitgliedern der bakteriellen Phyla zeigt. Der Stammbaum basiert auf der Verrechnung von 545 Nukleotidpositionen und wurde mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus konstruiert. Der Maßstab repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

3.5.6 Taxonomische Zuordnung vorhergesagter Gene

Die taxonomische Zuordnung erfolgte auf der Basis der vier höchsten Übereinstimmungen in BlastP-Analysen, wenn mindestens zwei Ergebnisse eine identische taxonomische Gruppierung zeigten und der Erwartungswert (E-Wert) niedriger als e^{-10} war. Der E-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit dem der Treffer in der Datenbank zufällig ist. Je niedriger der E-Wert, umso signifikanter ist der Treffer. Die taxonomischen Zuordnungen der ORFs auf den vier Genomfragmente IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5 ergaben in der Summe ein sehr unerwartetes Ergebnis (Abbildung 28).

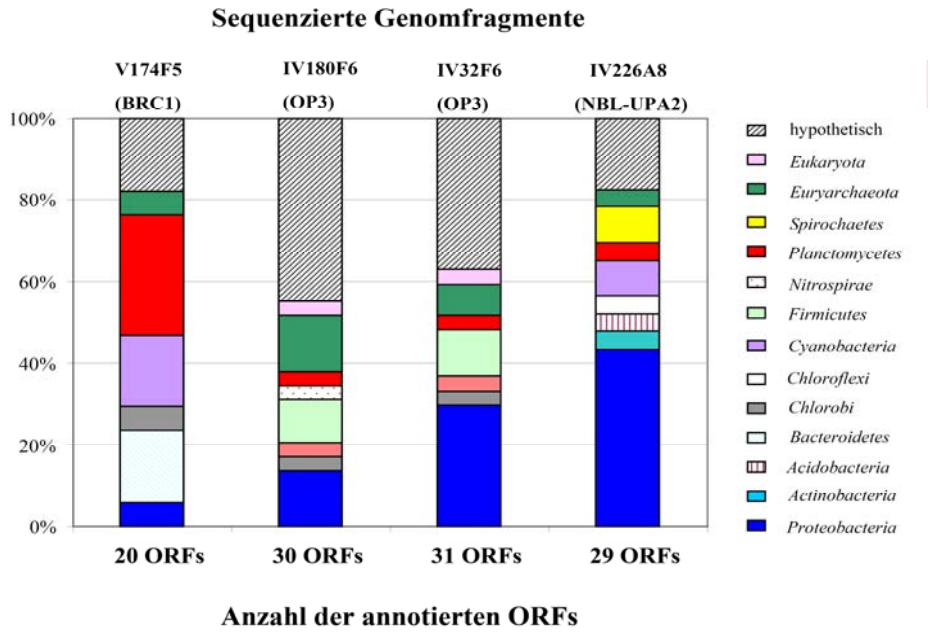

Abbildung 28: Taxonomische Zuordnung der annotierten ORFs auf den sequenzierten Genomfragmenten IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5.

Die vergleichenden 16S rRNA- und 23S rRNA-Gensequenzanalysen deuteten an, dass die Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV226A8 Populationen des OP3 repräsentieren könnten (Abbildungen 14 und 27). Eine sehr hohe Anzahl abgeleiteter Proteinsequenzen auf diesen Genomfragmenten wiesen in BlastP-Analysen höchste Übereinstimmungen mit Homologen von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* auf (Tabelle 10, Abbildung 28). Dabei wurde eine engere phylogenetische Verwandtschaft des OP3 mit den *Proteobacteria*, im Speziellen mit den *Deltaproteobacteria*, in den 16S rRNA- und 23S rRNA-basierten Phylogenien nicht beobachtet (Abbildungen 14, 27). Darüber hinaus zeigten die abgeleiteten Proteine wiederholt hohe prozentuale Sequenzähnlichkeiten mit korrespondierenden Proteinsequenzen spezifischer Taxa der *Deltaproteobacteria*, insbesondere mit Mitgliedern der Ordnungen *Myxococcales*, *Syntrophobacterales* und *Desulfuromonadales*. Im Gegensatz dazu wiesen fünf abgeleitete Aminosäuresequenzen des BRC1-Genomfragments V174F5 (25%) hohe prozentuale Ähnlichkeiten zu korrespondierenden Proteinsequenzen von Vertretern der *Planctomycetes* auf und nur ein einziges ORF gruppierte mit den *Deltaproteobacteria*.

Tabelle 10: Taxonomische Zuordnung der auf den sequenzierten Genomfragmenten annotierten ORFs.

	V174F5 (BRC1)		IV180F6 (OP3)		IV32F6 (OP3)		IV226A8 (NBL-UPA2)	
Ergebnis (BlastP)	ORF (20 ORFs)	E- Wert [1), 2)]	ORF (30 ORFs)	E- Wert [1), 2)]	ORF (31 ORFs)	E- Wert [1), 2)]	ORF (29 ORFs)	E- Wert [1), 2)]
Alphaproteobacteria	0		0		1	-	4	+
Betaproteobacteria	0		1	-	1	+	1	+
Gammaproteobacteria	1	+	0		2	1^{+}; 1^{-}	1	+
Deltaproteobacteria	**1**	**+**	**4**	**3^{+}; 1^{-}**	**8**	**7^{+}; 1^{-}**	**10**	**++**
Proteobacteria	2		5		12		16	
Actinobacteria	0		0		0		1	+
Acidobacteria	0		0		0		1	+
Bacteroidetes	3	+	0		0		0	
Chlorobi	1	+	1	+	1	-	0	
Chloroflexi	0		1	+	1	+	1	+
Cyanobacteria	3	2^{+};1^{-}	0		0		2	+
Firmicutes	0		3	+	3	+	0	
Nitrospirae	0		1	+	0		0	
Planctomycetes	**5**	**+**	**1**	**-**	**1**	**+**	**1**	**+**
Spirochaetes	0		0		0		2	+
Euryarchaeota	1	+	4	3^{+}; 1^{-}	2	1^{+}; 1^{-}	1	+
Eukaryota	0		1	+	1	+	0	
Hypothetisch	3		13		10		4	

[1)] "+" = signifikant, E-Wert < e^{-10}.

[2)] "-" =nicht signifikant, E-Wert > e^{-10}.

3.6 Anreicherungskulturen aus geflutetem Reisfeldboden

3.6.1 Strategie der Anreicherung

In einer vorherigen Studie wurden mögliche Anreicherungsbedingungen für Bakterien des BRC1 evaluiert (Derakshani, Dissertation). Dazu wurde ein Süßwassermedium für fermentative Mikroorganismen verwendet. Verschiedene Kohlenstoffquellen, die die wichtigsten Zwischenprodukte des anaeroben Abbaus organischen Materials im Reisfeldboden repräsentieren, wurden getestet. Die Anreicherungskulturen mit Pektin, einem Gemisch aus Zuckern und organischen Säuren plus Ethanol wurden im Format von Verdünnungsreihen mit Reisfeldboden inokuliert, welcher für 90 Tage inkubiert worden war. Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung wurden mittels 16S rRNA-Gen-basierter MPN-PCR und T-RFLP-Analyse über die Dauer der Inkubation verfolgt (Derakshani, Dissertation). Dafür wurden die PCR-Assays spezifisch für 16S rRNA-Gene der *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* (Primerpaar PLA40f/1492r) sowie spezifisch für 16S rRNA-Gene von Mitgliedern des BRC1 Unterlinie A1 (Primerpaar BRC1-A1-109f/1492r) verwendet. Eine Anreicherung von Vertretern des BRC1 konnte nach 90 Tagen Inkubation in den angereicherten Konsortien mit Pektin, vor allem aber mit organischen Säuren plus Ethanol bis zur 6. Verdünnungsstufe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Vertreter des BRC1 gezielt mit einem Süßwassermedium angereichert werden können, welchem Pektin oder organische Säuren plus Ethanol als Kohlenstoffquellen hinzugefügt wird.

Die Analyse der Zusammensetzung der angereicherten Konsortien eines Butyrat- und Propionat-abbauenden Chemostaten zeigte, dass Mikroorganismen des OP3 in allen Verdünnungsstufen mit Propionat und nur in hohen Verdünnungsstufen mit Butyrat nachweisbar waren (Tang *et al*., 2007; Shigimatsu *et al*., 2006). Die Ergebnisse deuteten an, dass Mikroorganismen des OP3 unter methanogenen Bedingungen möglicherweise am Abbau von Propionat und/oder Butyrat beteiligt sind.

Aufgrund dieser Befunde wurde in dieser Arbeit die biologischen Anreicherung in einem anaeroben Süßwassermedium durchgeführt, dem entweder 30 mM Propionat, 30 mM Butyrat oder 30 mM eines Substratgemisches (jeweils 5 mM Pyruvat, Fumarat, Lactat, Acetat, Ethanol) als Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurde. Als Inokulum wurde ein für 69 Tage inkubierter Reisfeldboden verwendet, da aus

einem entsprechend lang inkubierten Reisfeldmikrokosmus ein Genomfragment des BRC1 erzielt worden war (Genbank IV). *Methanobacterium formicicum* DSM 1535^T wurde den Anreicherungskulturen als potentiell syntropher Partner zugegeben.

3.6.2 Charakterisierung der ersten Anreicherungsstufe

Die erste Serie an Anreicherungskulturen wurde für 151 Tage auf Methanproduktion, Umsetzung des zugefügten Substrats, Auftreten von Intermediaten und Veränderungen in der Zusammensetzung der angereicherten Konsortien untersucht (Abbildung 29). Primärer Aktivitätsmarker war die Methanproduktion, welche in einem zweiwöchigen Abstand überprüft wurde. Probenahmen für weitergehende Analysen erfolgten nur dann, wenn Methanproduktion nachgewiesen wurde. Die angereicherten Konsortien mit Butyrat und Propionat als Kohlenstoffquellen werden im Folgenden kurz charakterisiert, da die molekularbiologischen Untersuchungen keine Hinweise auf eine Anreicherung der Zielgruppen ergaben. 16S rRNA-Gene von Mitgliedern des BRC1 wurden hingegen in den angereicherten Konsortien der Verdünnungsstufen 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} wie auch in den Kontrollen mit Substratgemisch wiederholt zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten nachgewiesen. Allerdings veränderte sich die Zusammensetzung der bakteriellen Komponente im Verlauf der Inkubation zugunsten anderer Organismengruppen, so dass BRC1-Vertreter molekularbiologisch nicht mehr nachweisbar waren.

Als Kontrollen sind Anreicherungsansätze definiert, bei denen dem Süßwassermedium das Substratgemisch aber nicht der potentiell syntrophe Partnerorganismus hinzugefügt wurde. Die Kontrollen wurden mit unverdünntem aufgeschlämmtem Reisfeldboden angeimpft. Vom aufgeschlämmten Reisfeldboden wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-8} hergestellt. Anreicherungskulturen wurden anschließend mit den 10^{-3} bis 10^{-8}-Verdünnungen angeimpft.

Die Detektion von Mitgliedern der *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* mittels des PLA40f/1492r-Assays war negativ, auch nach Optimierung der PCR-Reaktion unter Verwendung eines 12-Puffer-Systems und unterschiedlichen Polymerasen. Die Experimente mit dem Substratgemisch und der jeweiligen Kontrolle, aber ohne den potentiell syntrophen methanogenen Partnerorganismus, zeigten das Potential einer Anreicherung bisher nicht kultivierter *Archaea*-Gruppen.

Aus diesen Gründen wurde die Aktivität und Zusammensetzung der angereicherten methanogenen Konsortien im Detail analysiert.

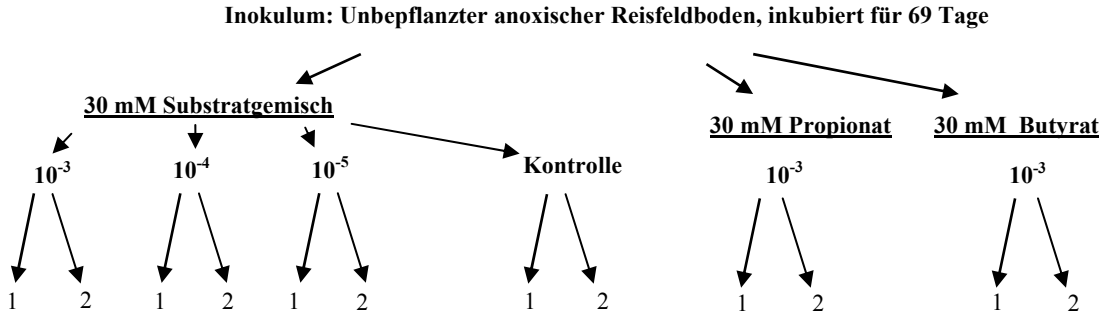

Abbildung 29: Schematischer Überblick über die erste Anreicherungsphase. Dargestellt sind die Verdünnungsstufen und die Kontrollen, in welchen eine Methanproduktion nachweisbar war. Das Substratgemisch bestand aus Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat und Ethanol. Als Kontrolle ist eine Anreicherungskultur mit dem Substratgemisch, aber ohne den potentiell syntrophen methanogenen Partnerorganismus, bezeichnet. Die Parallelen der Anreicherungskulturen werden mit 1 und 2 benannt.

Die theoretische Zuordnung relevanter 16S rRNA- und *mcrA*-T-RFs erfolgte auf Basis vorheriger Studien des Reisfeldbodens. Die Korrelation der T-RFs, die in diesen angereicherten Konsortien nachgewiesen wurden, mit den vermutlich dazu korrespondierenden taxonomischen Gruppen sind in Tabelle 11 aufgelistet (Vergleich Seite 90). Die Veränderungen in der Zusammensetzung der angereicherten Konsortien wurden aufgrund des hohen Probenaufkommens ausschließlich mittels T-RFLP-Analyse verfolgt.

3.6.2.1 Anreicherungen mit Propionat und Butyrat

Prozessorientierte Messungen: In den 10^{-3}-Verdünnungsstufen waren nach 92 Tagen Inkubation <0,5 µmol/l Methan nachweisbar. In den Anreicherungen wurden Propionat und Butyrat sehr langsam umgesetzt (Daten nicht gezeigt). Geringe Acetat-Konzentrationen (~2 mM) wurden in der Inkubationsperiode von 106 bis 151 Tagen nachgewiesen.

Molekularbiologische Analysen: Die bakteriellen T-RFLP-Muster zeigten eine geringe Diversität und nur geringfügige Unterschiede zwischen den auf Butyrat und Propionat angereicherten Konsortien. T-RFs mit einer Länge von 80, 303 und 485 bp

dominierten (Daten nicht gezeigt). Im Abgleich mit Daten früherer Studien wurde geschlussfolgert, dass diese T-RFs *Clostridia*, *Syntrophomonas* bzw. *Rhodocyclaceae* zugeordnet werden können. Die archaeelle Komponente zeigte ein charakteristisches 88 bp T-RF. Der zugegebene potentiell syntrophe Partner *M. formicicum* DSM 1535^T gehört zu den *Methanobacteriales*, deren Mitglieder durch ein 88 bp T-RF charakterisiert sind.

3.6.2.2 Anreicherungskulturen mit Substratgemisch

Verdünnungsstufen mit methanogenem Partner

Prozessorientierte Messungen: Nach 151 Tagen Inkubation waren in den Parallelansätzen der 10^{-3}-Verdünnungen etwa 15 µmol/l Methan nachweisbar. Die Ausgangssubstrate Pyruvat, Lactat und Fumarat waren nach 28 Tagen vollständig umgesetzt. Bis zum Ende der Inkubationsperiode wurden etwa 30 mM Acetat nachgewiesen. Folglich wurde Acetat als Zwischenprodukt gebildet, da das Substratgemisch des Mediums nur 5 mM Acetat enthielt. Die Propionat-Konzentrationen blieben über den gesamten Verlauf der Inkubation relativ konstant bei 3 mM. Ethanol wurde bis zu einer Inkubationsperiode von 95 Tagen neu gebildet, während es nach 120 Tagen nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 30). In den 10^{-4}- und 10^{-5}-Verdünnungen waren nach 62 bzw. 106 Tagen sehr geringe Mengen Methan nachweisbar (~0,1 µmol/l). Fumarat und Pyruvat wurden in den höheren Verdünnungsstufen langsam umgesetzt. Eine Besonderheit der 10^{-4}- und 10^{-5}-Verdünnungsstufen war die Bildung von etwa 2-20 mM des Zwischenprodukts Formiat im Inkubationszeitraum von 90 bis 151 Tagen. In den angereicherten Konsortien dieser beiden Verdünnungsstufen wurden etwa 5 mM Propionat und 10 mM Acetat über den gesamten Inkubationsraum von 151 Tagen nachgewiesen (Abbildung 30).

Molekularbiologische Analysen: Die mikrobielle Diversität war in den angereicherten Konsortien der 10^{-4}- und 10^{-5}-Verdünnungen am geringsten und änderte sich im Verlauf der Inkubation nur geringfügig. Beispielsweise wies die bakterielle Komponente in der 10^{-3}-Verdünnung Parallele 1 im Verlauf der Inkubation ein dominierendes 288 bp T-RF auf. Die relative Abundanz

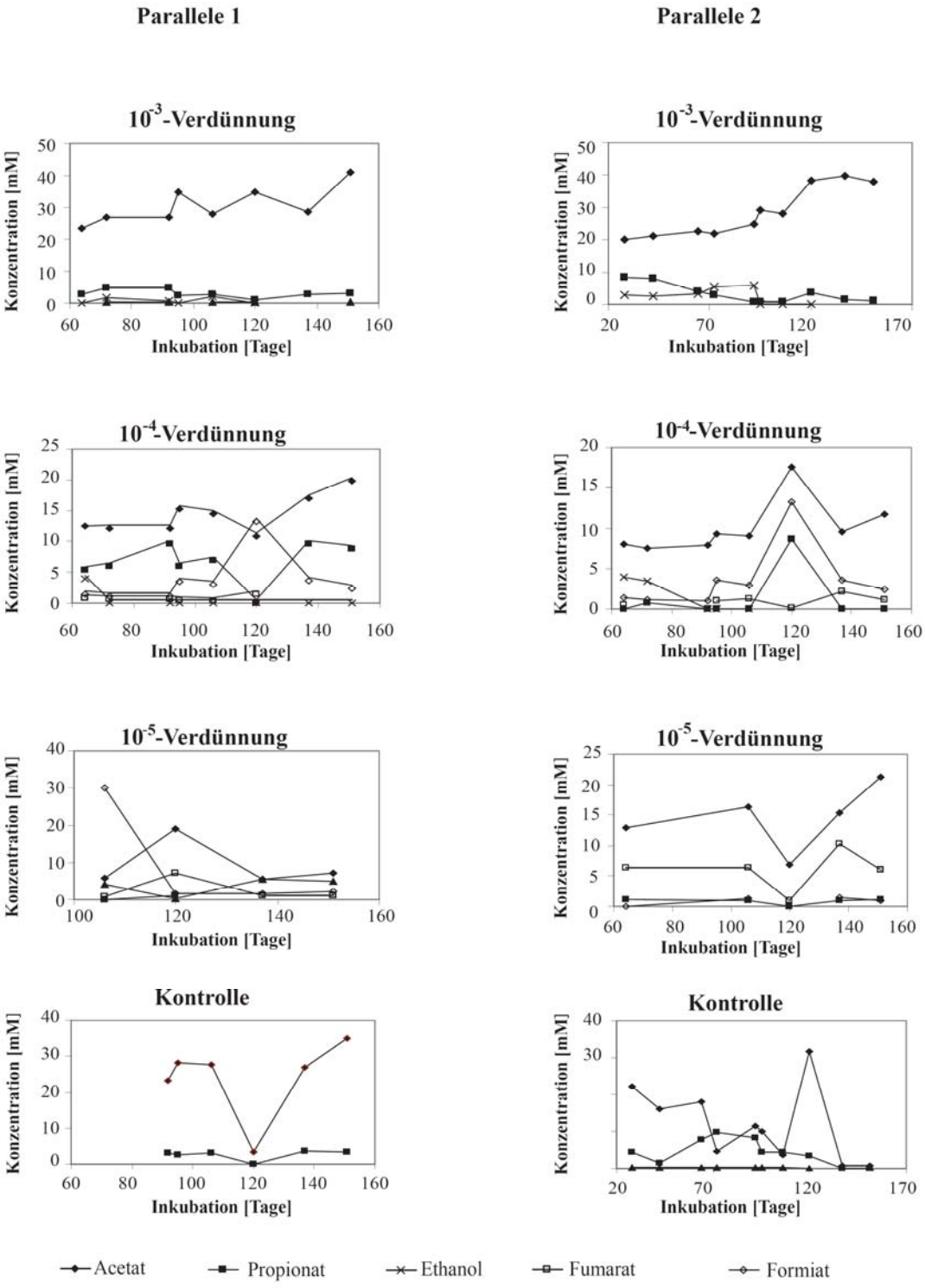

Abbildung 30: HPLC-Analyse der Substratumsetzungen (organische Säuren und Alkohole) in den ersten Anreichungskulturen.

charakteristischer T-RFs mit einer Länge von 80 und 134 bp war geringer (Abbildung 31). In vorherigen Untersuchungen des Reisfeldbodens konnten die 80 bp und 288 bp T-RFs *Clostridia*-verwandten Populationen zugeordnet werden (Scheid *et al.*, 2004; Erkel *et al.*, 2005). Außerdem wurde die archaeelle Komponente in der 10^{-3}-Verdünnung Parallele 1 nach 130, 151 und 158 Tagen Inkubation untersucht. Die archaeellen T-RFLP-Profile zeigten ein dominantes T-RF einer Länge von 379 bp, das in einer vorherigen Studie dem Rice Cluster III (RC-III) zugeordnet worden war (Kemnitz *et al.*, 2004). Der relative Anteil der Vertreter der *Methanobacteriales*, die wie der zugegebene potentiell syntrophe Partner *M. formicicum* DSM 1535^{T} ein charakteristisches T-RF von 88 bp besitzen, war in den angereicherten Konsortien sehr gering. Zusätzlich wurden die T-RFLP-Muster des Gens für die Methyl-Coenzym M-Reduktase (*mcrA*) untersucht. Die Diversität der *mcrA*-Gene der methanogenen Gemeinschaft war nach 158 Tagen Inkubation deutlich höher als nach der 16S rRNA-Gen-basierten T-RFLP-Analyse erwartet worden war (Abbildung 31).

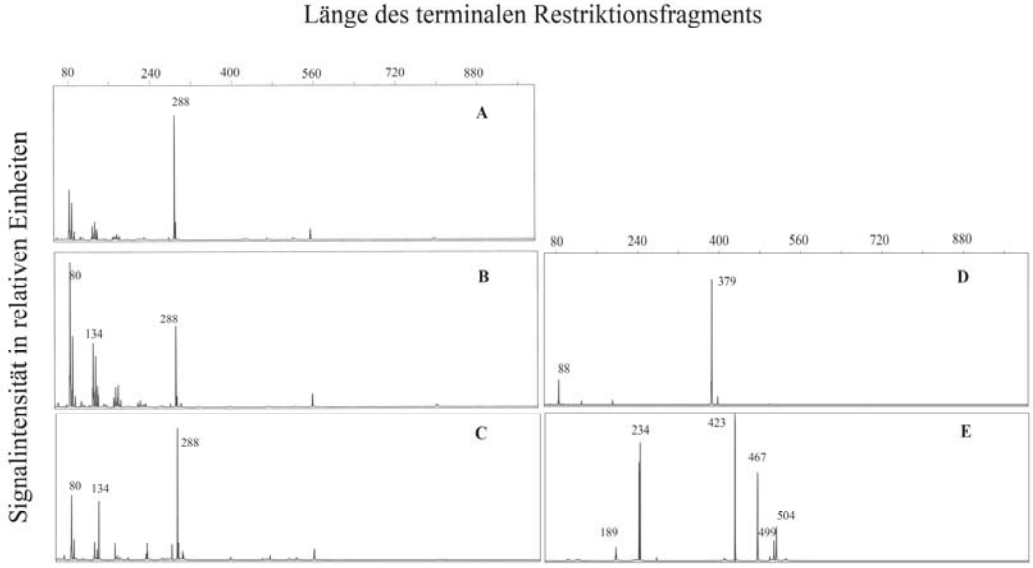

Abbildung 31: T-RFLP-Analyse der angereicherten Konsortien in der 10^{-3}-Verdünnungsstufe (Parallele 1). Die Profile zeigen die Veränderungen der bakteriellen Komponente nach (A) 74 Tagen, (B) 120 Tagen und (C) 158 Tagen Inkubation. Die archaeelle Komponente (D) und die Zusammensetzung der *mcrA*-Gene (E) wurden nach 158 Tagen Inkubation analysiert.

T-RFs (234 und 423 bp) charakteristisch für *mcrA*-Gene des RC-I bzw. von *Methanosarcina* spp. dominierten, während *mcrA*-Fragmente der *Methanobacteriaceae* und bisher nicht identifizierter Reisfeldbodenklone (467, 499 und 504 bp) weniger abundant waren (Lueders *et al*., 2000, 2001; Chin *et al*., 1999a, 2004; Ramakrishnan *et al*., 2001). In Korrespondenz zu der sehr niedrigen Methan-Produktion konnten in den 10^{-4}- und 10^{-5}-Verdünnungsstufen keine 16S rRNA-Gene der *Archaea* oder *mcrA* amplifiziert werden.

Kontrollen

Prozessorientierte Messungen: In den angereicherten Konsortien ohne den methanogenen Partnerorganismus wurden in Parallele 2 bis zum Ende der Inkubationsperiode von 151 Tagen etwa 2,3 mmol/l Methan detektiert, während in Parallele 1 nur etwa 43 µmol/l Methan nachweisbar war. Fumarat, Pyruvat, Lactat und Ethanol waren nach 28 Tagen Inkubation in den Parallelen 1 und 2 vollständig umgesetzt. Die angereicherten Konsortien produzierten Acetat und Propionat in den ersten 20 Tagen der Inkubation in einem Verhältnis von etwa 1:5. Bis zum Ende der Inkubationsperiode von 151 Tagen waren Acetat und Propionat fast vollständig umgesetzt (Abbildung 30).

Molekularbiologische Analysen: Die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft änderte sich in den Kontrollen im Verlauf der Inkubation nur geringfügig (Daten nicht gezeigt). Die bakteriellen T-RFLP-Muster deuteten auf eine sehr ähnliche Zusammensetzung in den Parallelen 1 und 2 hin, die sich aber in der relativen Abundanz charakteristischer T-RFs unterschieden (Abbildung 32). Beide angereicherten Konsortien (Parallelen 1 und 2) wurden von T-RFs mit einer Länge von 80 und 126 bp dominiert, welche charakteristisch für 16S rRNA-Gene von Mitgliedern der *Clostridia* bzw. von *Bacillus*/*Geobacter* sind (Erkel *et al*., 2005; Noll *et al*., 2005). Die phylogenetischen Gruppen mit einem charakteristischen T-RF von 288 bp konnten nur in Parallele 1 nachgewiesen werden, während in Parallele 2 eine abundante Organismengruppe mit einem 142 bp T-RF vorkommt. Die Zusammensetzung der archaeellen Komponenten unterschied sich zwischen den Parallelen deutlich, was möglicherweise die sehr unterschiedlichen Methan-Produktionen erklärt (Abbildung 32). Beide Parallelen wurden von einem T-RF mit einer Länge von 184 bp dominiert, das wahrscheinlich Mitgliedern der

Methanosarcinaceae zugeordnet werden kann (Lueders *et al.*, 2000). Die relative Abundanz des T-RFs der RC-I (391 bp) war in den angereicherten Konsortien der Parallele 2 jedoch deutlich höher als in denjenigen der Parallele 1. Außerdem unterschieden sich die beiden angereicherten Konsortien durch den Nachweis von 227 und 379 bp T-RFs in Parallele 1 und des spezifischen Auftretens eines 794 bp T-RFs in Parallele 2 (Abbildung 32).

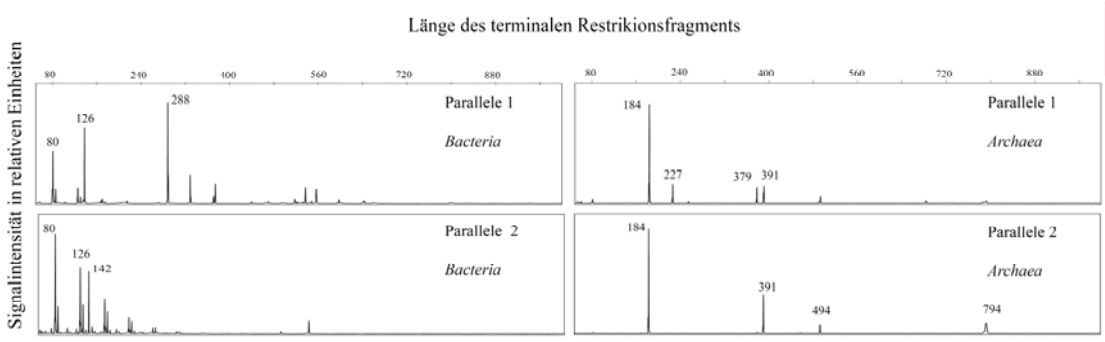

Abbildung 32: T-RFLP-Analyse der bakteriellen (links) und archaeellen (rechts) Komponente in den angereicherten Konsortien der Kontrolle (Parallelen 1 und 2) nach 151 Tagen Inkubation.

3.6.3 Charakterisierung der zweiten Anreicherungsstufe

Aliquots der 10^{-3}- und 10^{-4}- Verdünnungen sowie der Kontrollen der ersten Anreicherungen wurden nach 92 Tagen in frisches Medium überimpft. Als Substrat diente erneut ein Gemisch bestehend aus Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat und Ethanol in einer Endkonzentration von 30 mM (jedes einzelne 5 mM). Die zweite Anreicherungsstufe wurde wieder in zwei Parallelen durchgeführt. Diejenigen Parallelen, die von den angereicherten Konsortien der Parallele 1 überimpft wurden, werden mit 1/1 und 1/2 bezeichnet, während die angereicherten Konsortien der Parallele 2 nach der Überimpfung mit 2/1 und 2/2 benannt sind (Abbildung 33). Substratverwertung und Methanproduktion sowie Änderungen in der Zusammensetzung der angereicherten Konsortien wurden regelmäßig (alle drei bis vier Tage) über einen Zeitraum von 68 Tagen analysiert. Mitglieder des BRC1 wurden über die gesamte Anreicherungsperiode nicht nachgewiesen. Die Amplifikation der 16S rRNA-Gene mit dem PLA40f/1492r-PCR-Assay blieb in der

Kontrolle, den 10^{-3}- und 10^{-4}-Verdünnungen wie auch zuvor bei den ersten Anreicherungen ohne Erfolg.

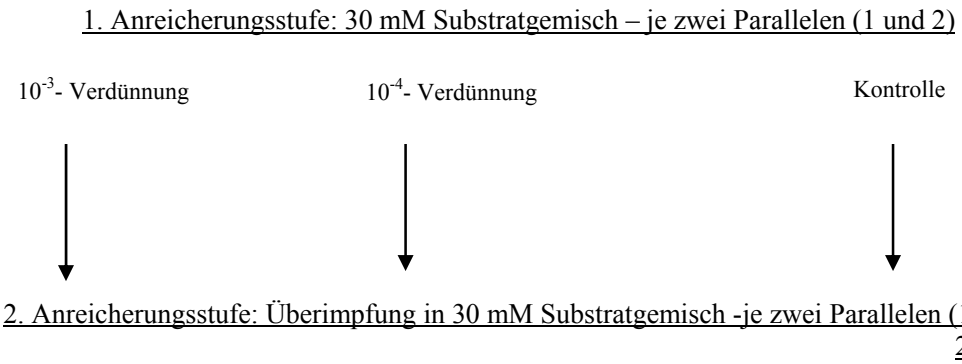

Abbildung 33: Schematischer Überblick über die zweite Anreicherungsstufe. Dargestellt sind die Verdünnungsstufen und die Kontrolle der ersten Anreicherungsstufe, von denen überimpft wurde. Das Substratgemisch bestand aus Fumarat, Pyruvat, Lactat, Acetat und Ethanol. Der Kontrolle wurde das Substratgemisch aber kein methanogener Partnerorganismus hinzugefügt. Die Kulturen der zweiten Anreicherungsstufe beimpft aus Parallele 1 werden mit 1/1 und 1/2 und diejenigen der Parallele 2 mit 2/1 und 2/2 bezeichnet.

Verdünnungsstufen mit methanogenem Partner

Prozessorientierte Messungen: In den Parallelen (1/1, 1/2, 2/1 und 2/2) der 10^{-3}-Verdünnung wurden nach einer Inkubationsperiode von 70 Tagen etwa ~0,2 µmol/l Methan nachgewiesen. Die angereicherten Konsortien der 10^{-4}-Verdünnungen produzierten kein Methan.

Molekularbiologische Analysen: Eine Sukzession in der Zusammensetzung der bakteriellen Komponente wurde innerhalb der Inkubationsperiode von 68 Tagen nicht beobachtet. Die Zusammensetzung der angereicherten Konsortien unterschieden sich in den Kulturen 1/1 und 2/1, die von den ersten Anreicherungsparallelen 1 und 2 überimpft wurden. Die bakteriellen Komponenten zeigten charakteristische T-RFs von 81, 126, 288, 428, 470 und 518 bp (Abbildung 34). Die T-RFs mit einer Länge von 81, 288 und 518 bp wurden in vorhergehenden Analysen *Clostridia*-verwandten Arten zugeordnet (Erkel *et al*., 2005; Noll *et al*., 2005; Müller, persönliche Mitteilung). Die 428 und 470 bp T-RFs könnten 16S rRNA-Gensequenzen der *Rhodocyclaceae* bzw. *Actinobacteria* repräsentieren (Noll *et al*., 2005; Lu *et al*., 2006; Müller, persönliche Mitteilung). Die archaeellen

Komponenten in den 10^{-3}-Verdünnungen wurden von einem 88 bp T-RF dominiert, welches für Mitglieder der *Methanobacteriales* charakteristisch ist (Daten nicht gezeigt).

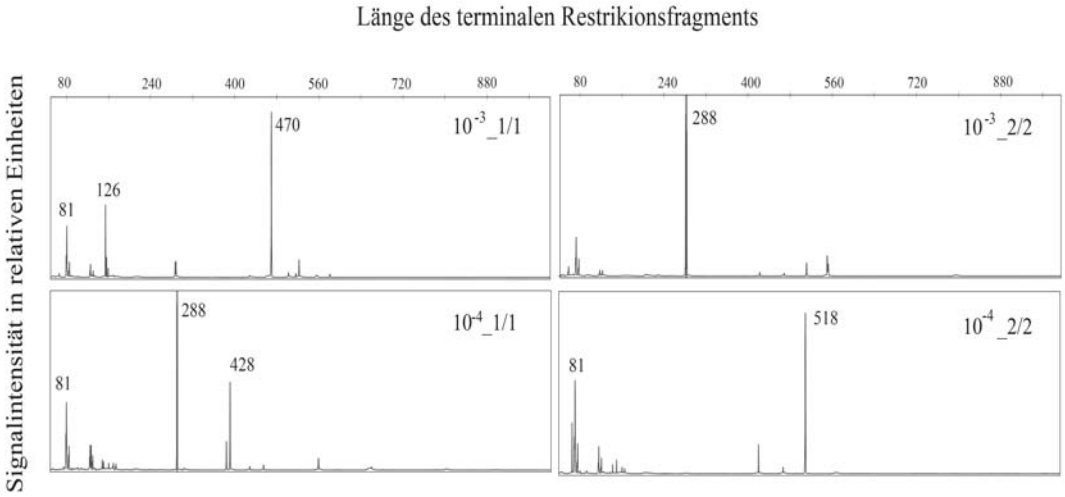

Abbildung 34: T-RFLP-Analyse der bakteriellen Komponente in den angereicherten Konsortien der 10^{-3}- (Parallelen 1/1 und 2/2) und 10^{-4}-Verdünnungen (Parallelen 1/1 und 2/2) nach 40 Tagen Inkubation.

Kontrollen

Prozessorientierte Messungen: In den angereicherten Konsortien der zweiten Parallele (1/1 und 1/2) war nach einer Inkubationsperiode von 70 Tagen wesentlich weniger Methan nachweisbar (~5 µmol/l) als in den Parallelen 2/1 und 2/2 (~280 µmol/l). Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen waren in den Parallelen (1/1, 1/2, 2/1 und 2/2) Fumarat, Pyruvat und Lactat vollständig umgesetzt, während über einen Zeitraum von 70 Tagen relativ konstante Mengen von 20-25 mM Acetat und 5 mM Propionat nachweisbar waren (Abbildung 35).

Molekularbiologische Analysen: Die bakterielle Zusammensetzung der angereicherten Konsortien änderte sich im Verlauf der Inkubation nicht. Charakteristisch für die bakteriellen Komponenten der Parallelen (1/1, 1/2, 2/1 und 2/2) war ein 288 bp T-RF, welches auf Mitglieder der *Clostridia* hinweisen könnte (Daten nicht gezeigt). Nach 29 Tagen Inkubation wurde die archaelle Komponente in der Parallelen 2/2 von Vertretern des RC-I (391 bp) dominiert. Mitglieder der

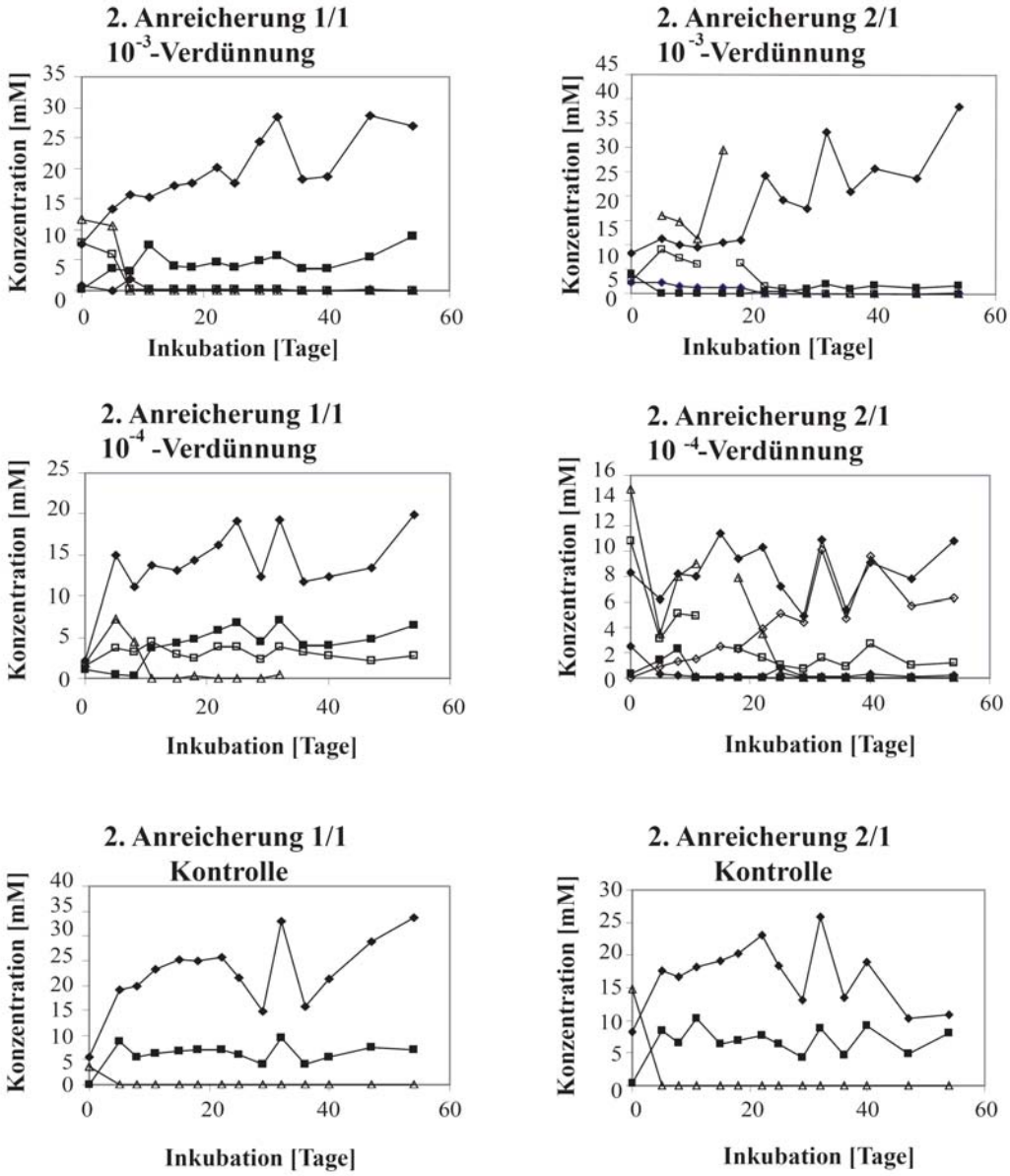

Abbildung 35: HPLC-Analyse der Substratumsetzungen (organische Säuren und Alkohole) der zweiten Anreichungsstufe und dem Substratgemisch als Kohlenstoffquelle. Die Parallelen der angereicherten Konsortien zeigten ein nahezu identisches Muster, weshalb die Ergebnisse einer Parallele als repräsentative HPLC-Analyse dargestellt sind.

Methanosarcinaceae waren zu diesem Inkubationszeitpunkt nur in geringer Abundanz nachweisbar, nahmen aber im Verlauf der Inkubation in ihrem relativen Anteil zu. Charakteristisch für *Methanosarcinaceae* war ein 184 bp T-RF. Am Ende der Inkubation wurde die archaelle Komponente der Parallele 2/2 von 16S rRNA-Genen mit charakteristischen T-RFs von 789 und 794 bp dominiert (Abbildung 36). Bei der *in-silico* T-RF-Analyse mittels TRF-CUT wurden diese 789 und 794 bp

T-RF-Schnittstellen beispielsweise bei Mitgliedern der *Methanococcales*, *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium* ermittelt (Ricke *et al*., 2005). Die T- RFLP-Analyse des *mcrA*-Gens in Parallele 2/2 zeigte, dass T-RFs mit einer Länge von 423 bp (*Methanosarcinaceae*) und 234 bp (RC-I) dominierten. Mit geringer Abundanz wurden Mitglieder der *Methanobacteriaceae* bzw. nicht identifizierte Methanogene (504 bp) nachgewiesen.

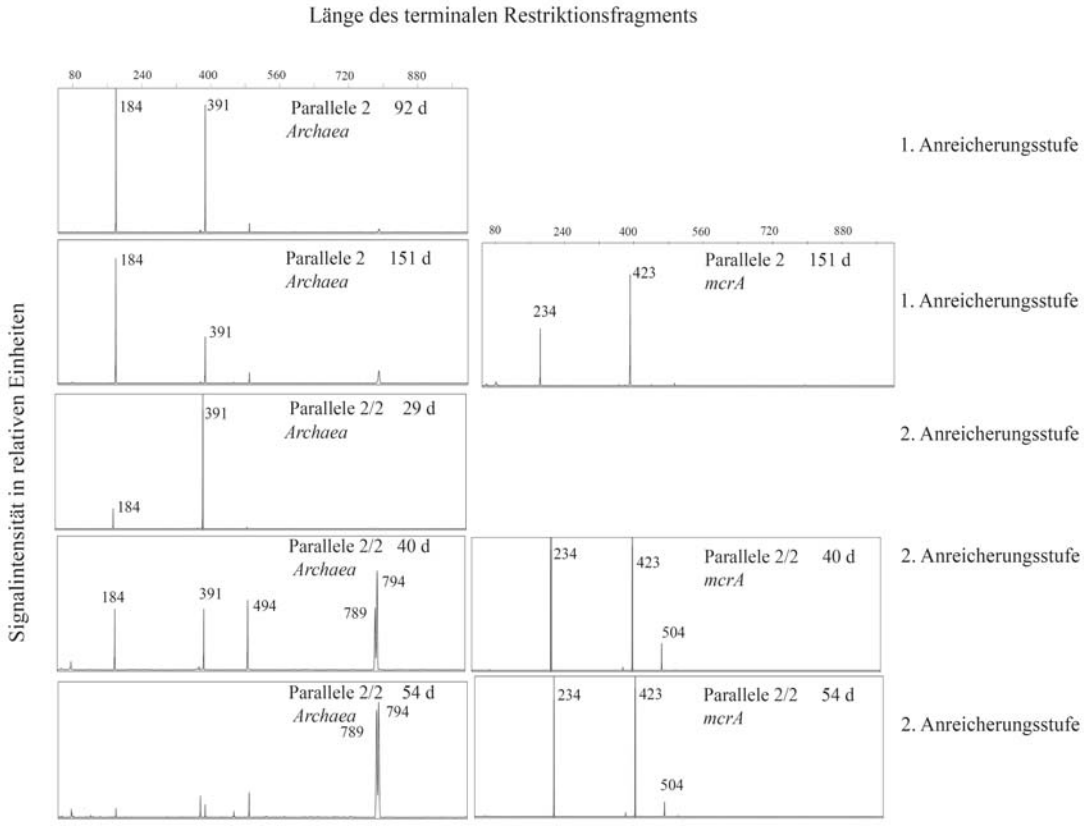

Abbildung 36: Veränderungen der archaeellen Komponente über die Dauer der Inkubation basierend auf dem 16S rRNA-Gen (links) und *mcrA*-Gen (rechts). Die T-RFLP-Analysen repräsentieren die angereicherten Konsortien in den Kontrollen der ersten Anreicherungsstufe (Parallele 2) und der zweiten Anreicherungsstufe (Parallele 2/2).

3.6.4 Selektive Anreicherungsexperimente

Die bisher durchgeführten Kultivierungsansätze waren in Hinblick auf eine Anreicherung von Vertretern des BRC1 und OP3 erfolglos. Bei der Analyse der mit dem Substratgemisch angereicherten Konsortien wurde aber ein relativ hoher Anteil an den archaeellen Entwicklungslinien RC-I (*Methanocellales*) und RC-III

nachgewiesen (Abbildungen 31, 32, 36). Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob der Anreicherungsstatus dieser bisher wenig charakterisierten *Euryarchaeota*-Gruppen erhöht werden kann (Abbildung 37).

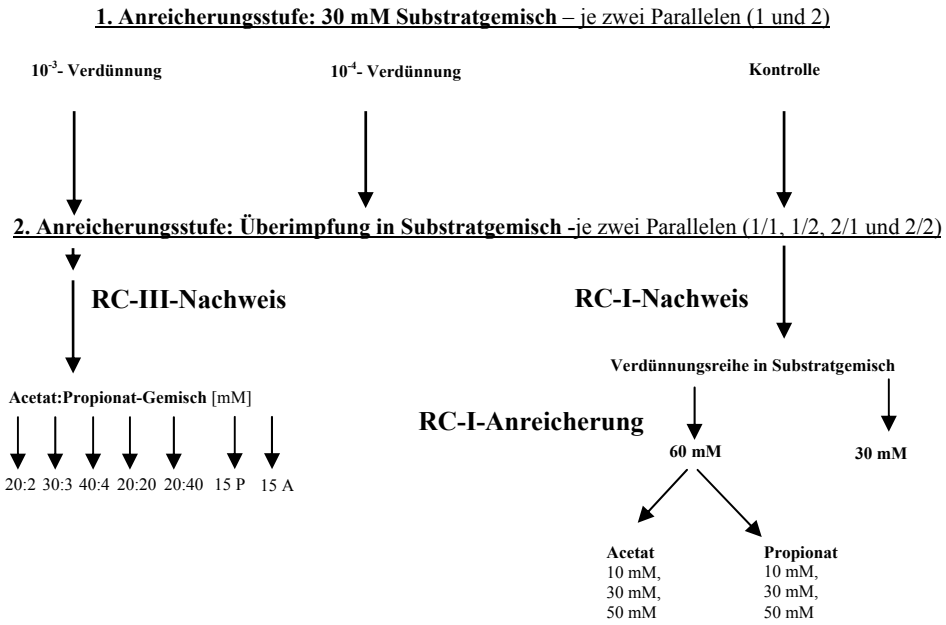

Abbildung 37: Schematische Darstellung der angereicherten Konsortien mit dem Substratgemisch als Kohlenstoffquelle und die daraus entwickelten Strategien zur selektiven Anreicherung von RC-I- und RC-III-*Archaea*.

3.6.4.1 Versuch der Anreicherung neuer RC-I-*Archaea*

Die T-RFLP-Analysen der archaellen Komponenten der Kontrollen der ersten und zweiten Anreicherungsstufen (Parallelen 2 und Parallele 2/2) zeigten, dass Mitglieder der RC-I mit einem charakteristischen T-RF von 391 bp einen relativ hohen Anteil ausmachten (Abbildungen 32 und 36). Die T-RFLP-Profile des *mcrA*-Gens bestätigten die Ergebnisse der 16S rRNA-Gen-basierten Analysen. Es wurde daher eine 10^{-1} bis 10^{-8} Verdünnungsreihe des angereicherten Konsortiums der Parallele 2/2 hergestellt und die Aliquots der Verdünnungen in Süßwassermedium mit 30 mM bzw. 60 mM überimpft (Abbildung 37).

Prozessorientierte Messungen: Nach 9-wöchiger Inkubation konnte in den Ansätzen mit 30 mM Substratgemisch keine Methanbildung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren in den angereicherten Konsortien der 10^{-1}- bis 10^{-4}-Verdünnungen mit höherer Substratkonzentration nach 13 Tagen Methan (~400-800 µmol/l) nachweisbar.

Molekularbiologische Analysen: Die Komplexität der T-RFLP-Muster verringerte sich mit Inkubationszeit und über die Verdünnungsstufen gegenüber der Ausgangskultur (Daten nicht gezeigt). Die bakterielle Komponente wurde von einer phylogenetischen Gruppe mit einem charakteristischen 288 bp T-RF dominiert, welches vermutlich Mitglieder der *Clostridia* repräsentiert (Scheid *et al*., 2004). In der 10^{-1}-Verdünnung, vor allem aber in der 10^{-2}-Verdünnung, der angereicherten Konsortien mit 60 mM Substratgemisch war die Abundanz der Mitglieder von RC-I deutlich erhöht (Abbildung 38). Mitglieder der *Methanosarcinaceae* (184 bp T-RF) wurden bis zum Ende der Inkubation in der 10^{-1}-Verdünnung detektiert. Hingegen erhöhte sich der relative Anteil eines 123 bp T-RFs nach 42 Tagen Inkubation deutlich. Die phylogenetische Zuordnung dieses T-RFs ist durch vorherige Studien des Reisfeldbodens nicht dokumentiert. Die *in-silico* T-RF-Analyse mittels TRF-CUT konnte diesem 123 bp T-RF keine phylogenetische Gruppe zuordnen (Ricke *et al.*, 2005). Die T-RFLP-Analyse des *mcrA*-Gens bestätigte eine relative Anreicherung von RC-I (Nachweis eines 234 bp T-RF, Daten nicht gezeigt). In denjenigen Konsortien, die eine relative Anreicherung des RC-I aufwiesen, wurden nach 35 Tagen Inkubation etwa 45 mM Acetat und 15 mM Propionat nachgewiesen. *Methanocella paludicola* DSM 17711^{T}, das erste taxonomisch beschriebene Isolat des RC-I, wurde aus dem Reisfeldboden mit 20 mM Propionat angereichert (Sakai *et al*., 2008). Aliquots der angereicherten Konsortien der zwei Verdünnungsstufen (10^{-1} und 10^{-2}) wurden daher nach 42 Tagen Inkubation in frisches Medium mit Acetat oder Propionat (je 10, 30 und 50 mM) überimpft.

3.6.4.2 Versuch der Anreicherung von RC-III-*Archaea*

Charakteristisch für die 10^{-3}-Verdünnung (Parallele 1) der ersten Anreicherungsstufe war nach 158 Tagen Inkubation ein 379 bp T-RF, welches vermutlich Mitgliedern des RC-III zugeordnet werden kann (Abbildung 31, Kemnitz *et al*., 2004, 2005). RC-III ist bisher ausschließlich molekularbiologisch über Umweltsequenzen des 16S rRNA-Gens definiert. Reinkulturen existieren nicht. In Korrespondenz zur Dominanz eines 379 bp T-RFs wurden nach einer Inkubationsperiode von 137 bzw. 151 Tagen etwa 30 mM Acetat und 3 mM Propionat bzw. 40 mM Acetat und 4 mM Propionat nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden Aliquots dieses angereicherten Konsortiums in frisches Medium mit Acetat und Propionat als

Kohlenstoffquellen in zwei Parallelen angeimpft. Verschiedene Mischungsverhältnisse dieser beiden Substrate wurden getestet (Abbildung 37).

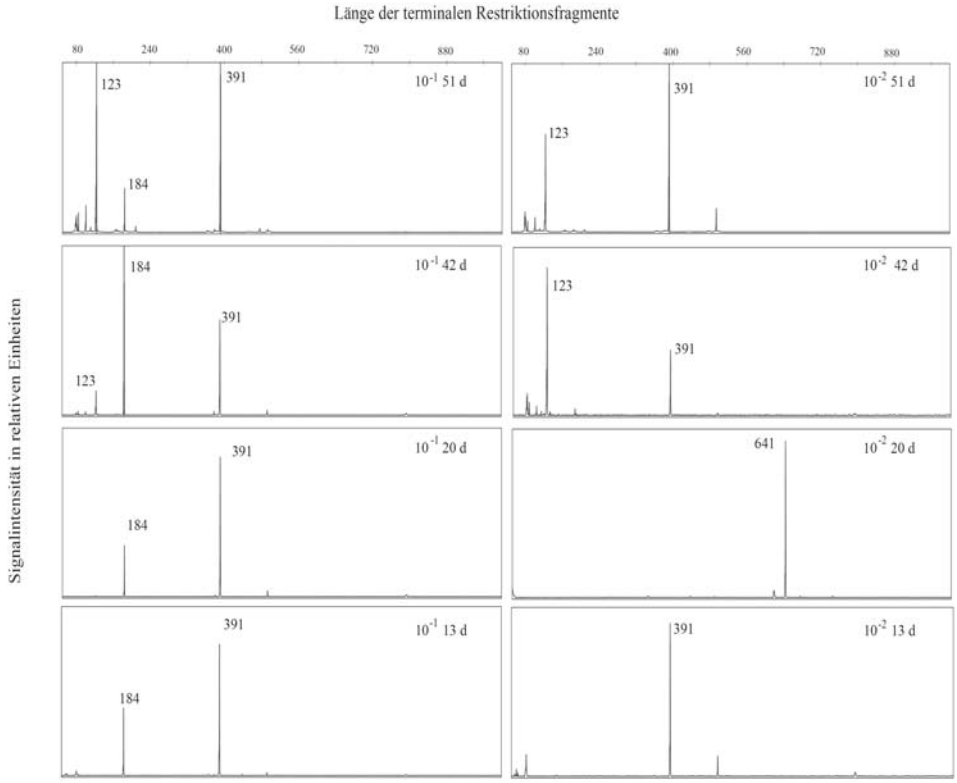

Abbildung 38: T-RFLP-Analyse der archaeellen Komponente in den RC-I-Konsortien, welche mit 60 mM Substratgemisch angereichert wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse für die 10^{-1}- (links) und 10^{-2}- (rechts) Verdünnungen, welche die Veränderungen in der relativen Zusammensetzung über die Dauer der Inkubation von 51 Tagen zeigt.

Tabelle 11: Theoretische Zuordnung relevanter T-RFs der archaeellen und bakteriellen Komponente (16S rRNA-Gen) sowie der methanogenen Population (*mcrA*-Gen).

Bacteria

T-RF	Taxon	Referenz
81	*Clostridia*-Verwandte	Erkel *et al*., 2005
119	*Chloroflexi*	Noll *et al*., 2005
126	*Bacillus*/*Geobacter*	Noll *et al*., 2005
134		
142	*Desulfosporosinus* spp.	Lueders *et al*., 2004
288	*Clostridia*-Verwandte	Scheid *et al*., 2004
303	*Syntrophomonas* sp.	Lueders *et al*., 2004
291	*Clostridia*-Verwandte	Scheid *et al*., 2004
391		
428	*Rhodocyclaceae*	Lu *et al*., 2006
470	*Actinobacteria*	Noll *et al*., 2005
485	*Rhodocyclaceae*	Luedemann *et al*., 2000
518	*Clostridia*-Verwandte	Scheid *et al*., 2004
528	*Dehalococcoides/Clostridia*	Noll *et al*., 2005; Lu *et al.*, 2006

Archaea

T-RF	Taxon	Referenz
82	*Methanomicrobiaceae*	
88	*Methanobacteriales*	alle T-RFs aus
123		Lueders *et al*., 2000, 2001;
184	*Methanosarcinaceae* (RC-VI)	Ramakrishnan *et al.*, 2001;
226		Chin *et al.*, 1999, 2004;
381	RC-III	Kemnitz *et al*., 2004, 2005;
391	RC-I (*Methanomicrobiaceae*)	
494	*Crenarchaeota* 1.3	
789		
794	*Methanobacteriales*	

mcrA

T-RF	Taxon	Referenz
189		
234	RC-I (*Methanocellales*)	alle T-RFs aus
423	*Methanosarcina* spp.	Lueders *et al*., 2000, 2001;
467	*Methanobacteriaceae*	Ramakrishnan *et al.*, 2001;
499	*Methanobacteriaceae*, nicht identifiziertes Reisfeldboden *mcrA*	Chin *et al.*, 1999, 2004;
504	*Methanobacteriaceae*, nicht identifiziertes Cluster	

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Metagenom-Genbanken des Reisfeldbodens aufgebaut, die in Zukunft für verschiedene Fragestellungen zur genetischen Diversität in diesem Standort zur Verfügung stehen. Primäres Ziel war es, erste Einblicke in die Genome von Vertretern der neuen bakteriellen Entwicklungslinien BRC1 und OP3 zu erzielen. Dafür wurden die Genbanken auf Fosmid-Klone mit 16S rRNA-Genen untersucht, die die Signaturnukleotide PLA40f von Mitgliedern des PVC-Superphylums besitzen. Die phylogenetische Verteilung der 24 Test-positiven Genomfragmente wird im Zusammenhang mit unseren Kenntnissen über die ubiquitäre Bedeutung der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* sowie des OP3, BRC1 und NBL-UPA2 diskutiert. Fünf Genomfragmente der Zielgruppen OP3, BRC1 und NBL-UPA2 wurden nach vollständiger Sequenzierung vergleichend analysiert. Auf einem sequenzierten BRC1-Genomfragment konnte kein rRNA-Operon lokalisiert werden. Für die vergleichende Genomanalyse wurde es nicht hinzugezogen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben keine konkreten Hinweise auf physiologische Eigenschaften, die eine zielgerichtete Anreicherungs-strategie ermöglicht hätten. Es wurden aber Enzymfunktionen vorhergesagt, die Rückschlüsse auf bestimmte phänotypische Eigenschaften zulassen. Neben den 16S und 23S rRNA-basierten Phylogenien wird der GC-Gehalt und die Struktur der rRNA-Operons der vier analysierten Genomfagmente mit denen von komplett sequenzierten Genomen der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* sowie mit Genomfragmenten des WS3 und der *Poribacteria* vergleichend diskutiert. Es steht dabei die Frage im Mittelpunkt, ob OP3, BRC1 und WS3 dem PVC-Superphylum zuzuordnen sind.

In dieser Arbeit wurden außerdem Kultivierungsexperimente durchgeführt, mit dem ursprünglichen Ziel Mitglieder des OP3 und BRC1 biologisch anzureichern, um effizientere Metagenom-Analysen durchführen zu können. Hinsichtlich der Zusammensetzung der angereicherten Konsortien wurde die Zielsetzung im Verlauf der Kultivierungsexperimente zugunsten einer Anreicherung von RC-I-(*Methanocellales*) und RC-III-*Archaea* geändert.

4.1 Analyse der Genbanken

4.1.1 Charakterisierung der Genbanken

Für die Konstruktion von Fosmid-Genbanken aus dem anoxischen Reisfeldboden wurde eine Methode zur reproduzierbaren Extraktion von HMW-DNA etabliert. Mit dieser konnte etwa 25 µg HMW-DNA einer durchschnittlichen Größe von etwa 45 kbp aus 50 g Reisfeldboden isoliert werden. Genbanken, die insgesamt 61000 Fosmid-Klone beinhalteten, wurden mit HMW-DNA aus für 10, 70 und 140 Tage inkubiertem Reisfeldboden generiert. Die durchschnittliche Insert-Größe der Test-positiven Fosmid-Klone lag bei 38,5 kbp. Es kann daher abgeschätzt werden, dass die Genbanken etwa 2,4 Gbp an genomischer Information enthielten. Unter der vereinfachten Annahme, dass ein prokaryotisches Genom eine durchschnittliche Größe von ca. 5 Mbp hat, korrespondieren 2,4 Gbp zu etwa 480 vollständigen Genomen. Die theoretischen Abschätzungen basieren auf der durchschnittlichen Genomgröße der bisher sequenzierten Mitglieder der *Planctomycetes* (5) und *Verrucomicrobia* (7), deren Größen in einem Bereich von ungefähr 2,2 bis 9,7 Mbp liegen (NCBI-Genomes, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Andere Studien beziehen sich gewöhnlich auf einen Durchschnittswert aller prokaryotischen Genome von 4 Mbp (Raes *et al.*, 2007b; Liles *et al.*, 2003).

Vorausgesetzt, dass die Fosmid-Genbanken die *in-situ* Zusammensetzung der gesamten Mikrobiota im anoxischen Reisfeldboden korrekt widerspiegeln, würden ungefähr $1{,}3 \times 10^5$ Fosmid-Klone benötigt, um theoretisch die Genome der 1000 numerisch bedeutendsten Genotypen in Genbanken abzulegen. Bei einer herkömmlichen sechsfachen Abdeckung würde das mit der Analyse von etwa $7{,}8 \times 10^5$ Fosmid-Klonen korrelieren (Rondon *et al.*, 2000). Jedoch wird die tatsächliche Anzahl an notwendigen Fosmid-Klonen deutlich höher sein, da die Mikroorganismen mit unterschiedlicher Abundanz im Reisfeldboden vorliegen. Im Vergleich dazu zeigten die Analysen von Reassoziationskinetiken der gesamten genomischen DNA eines Waldbodens bzw. eines landwirtschaftlich genutzten Bodens, dass die mikrobielle Gemeinschaft dieser Standorte schätzungsweise 6000 bis 8000 verschiedene bakterielle Genome umfasst (Torsvik *et al.*, 1998).

4.1.2 Phylogenetische Verteilung Test-positiver Genomfragmente

In den Genbanken konnten mittels PCR-basierter Analyse 24 Fosmid-Klone nachgewiesen werden, die ein PVC-verwandtes 16S rRNA-Gen tragen. Die Anzahl der rRNA-Genkopien im Genom von Bakterien korrespondiert zu deren ökologischen Strategien (Klappenbach *et al*., 2000). Für die langsam wachsenden Mitglieder der *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* wurden ein bis zwei rRNA-Genkopien pro Genom identifiziert (http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/search.php; NCBI-Genomes, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Entsprechend den formulierten Annahmen (Abschnitt 4.1.1) müssen theoretisch 130 bzw. 65 [1 bzw. 2 rRNA-Genkopie(n) pro Genom] Fosmid-Klone gescreent werden, um ein Genomfragment mit 16S rRNA-Gen zu detektieren. Das bedeutet, dass ungefähr 470-940 Genomfragmente in den 61000 Fosmid-Klonen der Genbanken I-V ein 16S rRNA-Gen tragen. Die tatsächliche Anzahl ist wahrscheinlich deutlich höher, da die Genome vieler Bakterien multiple rRNA-Genkopien besitzen, so wie beispielsweise *Bacillus* spp. und *Clostridium* spp. mit bis zu 14 Genkopien (http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/search.php.)

Mit dem PVC-Assay wurden in den Genbanken I-V theoretisch 24 verschiedene Genome nachgewiesen. Gemäß der Annahme, dass die Genbanken I-V ungefähr 480 vollständige Genome beinhalten, stellen die Genome von Mitgliedern des PVC-Superphylums schätzungsweise 5% der genetischen Information in den Genbanken dar. Für anoxischen Reisfeldboden wurde mittels Verdünnungsreihenkultivierung eine Gesamtzahl von 10^9 Zellen pro Gramm Boden Trockengewicht bestimmt (Hengstmann *et al.*, 1999). Unter der Voraussetzung, dass die Genbanken die *in-situ* Zusammensetzung der gesamten Mikrobiota relativ gut widerspiegeln, würden die Mitglieder des PVC-Superphylums folglich etwa 5×10^7 Zellen der Gesamtpopulation im Reisfeldboden repräsentieren.

Mit höchster Frequenz wurden Genomfragmente mit 16S rRNA-Genen (10) der Gattung *Pirellula* (*Planctomycetes*) nachgewiesen. Die in Stammsammlungen hinterlegten Kulturen der Gattung *Pirellula* wurden aus aquatischen Standorten isoliert und repräsentieren fakultativ anaerobe Mikroorganismen (Ward *et al.*, 2006). Der Nachweis einer sehr hohen Anzahl von *Pirellula* spp. in verschiedenen anoxischen marinen Sedimenten, in einer anoxischen Abwasseranlage, in Biofilmen kontaminierter Flüsse und im Boden führte zu der Annahme, dass strikt anaerobe Vertreter dieser Gattung existieren (Gray und Herwig, 1996; Miskin *et al.*, 1999;

Chouari *et al.*, 2003; Brümmer *et al.*, 2004; Musat *et al.*, 2006; Buckley *et al.*, 2006). Die Detektion von *Pirellula*-verwandten 16S rRNA-Genen im anoxischen Reisfeldboden ist ein weiteres Indiz dafür, dass strikt anaerobe Vertreter dieser Gattung vorhanden sein müssen, welche aber bisher nicht durch Reinkulturen dokumentiert sind (Derakshani *et al.*, 2001). In molekularbiologischen Studien zur phylogenetischen Diversität der Vertreter des Phylums *Planctomycetes* wurden in der Vergangenheit nur wenige 16S rRNA-Gensequenzen erzielt, die den Gattungen *Gemmata* und *Isosphaera* zugeordnet wurden (Ward *et al*., 1995; Wang *et al*., 2002; Chouari *et al*., 2005). Diese Beobachtungen bestätigen sich gleichermaßen in dieser Arbeit, da nur je zwei Genomfragmente von Vertretern dieser Gattungen identifiziert wurden. In einer vorhergehenden Studie wurden diese Zielgruppen mit dem gruppenspezifischen PVC-Assay im Reisfeldboden nicht nachgewiesen (Derakshani *et al.*, 2001).

In den Genbanken wurden vier Genomfragmente mit 16S rRNA-Genen von Vertretern der *Verrucomicrobia* identifiziert. Davon ausgehend macht die genetische Information der *Verrucomicrobia* in den Genbanken etwa 1% aus, was im anoxischen Reisfeldboden *in-situ* mit einer Populationsgröße von 10^7 Zellen pro Gramm Boden Trockengewicht korreliert. Das steht im Widerspruch zu der mittels Verdünnungsreihenkultivierung bestimmten Dominanz von Mitgliedern der *Verrucomicrobia* (10^8 Zellen in einer Gesamtzellzahl von 10^9 pro Gramm Trockengewicht) in inkubiertem Reisfeldboden (Chin *et al*., 1999; Hengstmann *et al.*, 1999). Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenahmen des Vercelli-Reisfeldbodens sein, welche für die Analyse der gesamten Mikrobiota von Hengstmann *et al.* (1999) und in dieser Arbeit verwendet wurden. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Genbanken die *in-situ* Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Reisfeldboden nicht korrekt widerspiegeln oder der relative Anteil der *Verrucomicrobia* an der Gesamtzellzahl im Reisfeldboden mittels Kultivierung stark überschätzt wurde.

Die Genbanken enthielten fünf Genomfragmente, die Mitgliedern des BRC1, OP3 und NBL-UPA2 zugeordnet wurden. Dies entspricht in Analogie zu den *Verrucomicrobia* mit etwa 1% der genetischen Information in den Genbanken und mit einer Populationsgröße von 10^7 Zellen pro Gramm Reisfeldboden Trockengewicht. In einer quantitativen Analyse wurde die Anzahl der 16S rRNA-Gene des BRC1 im anoxischen Reisfeldboden mittels MPN-PCR mit einem

spezifischen Assays auf $3{,}4\times10^7$ pro Gramm Boden Trockengewicht geschätzt (Derakshani, Dissertation). Vorausgesetzt, dass Vertreter des BRC1 eine oder nur wenige 16S rRNA-Genkopien pro Genom besitzen, würde das mit einem Anteil von 1% an der Gesamtzellzahl im Reisfeldboden korrelieren. Im Rahmen der Metagenom-Analyse wurden zwei Genomfragmente mit 16S rRNA-Genen von Mitgliedern des BRC1 nachgewiesen. In Korrespondenz zu den formulierten Annahmen würde das mit einer Abundanz von 0,4% und mit einer BRC1-Population von ungefähr $0{,}4\times10^7$ Zellen im inkubierten Reisfeldboden korrelieren. Diese Größenordnung stimmt relativ gut mit dem mittels MPN-PCR abgeschätzten relativen Anteil der Mitglieder des BRC1 an der gesamten Mikrobiota im anoxischen Reisfeldboden überein (Derakshani, Dissertation).

4.1.3 16S rRNA-Signaturnukleotide

16S rRNA-Gensequenzen des OP3 und BRC1 wurden außerdem aus einer hypersalinen mikrobiellen Matte, einem anoxischen Süßwasserteich und der anoxischen Zone des karibischen Meeres erzielt. Die PCR-Amplifikation dieser Umweltsequenzen erfolgte mit für *Bacteria* als universell betrachteten Primer-Systemen, wie beispielsweise den Primern 27f/1492r (Madrid *et al.*, 2001; Ley *et al.*, 2006; Briée *et al.*, 2007). Entsprechend zeigen die 16S rRNA-Gensequenzen der Genomfragmente IV32F6, IV226A8 und V174F5 keine Fehlpaarungen in den Zielsequenzen der Primer 27f und 1492r. Das Genomfragment IV180F6 zeigt hingegen in *E. coli*-Position 18 eine Basenfehlpaarung zum Primer 27f. Möglicherweise wird diese Variante des 16S rRNA-Gens daher mit etwas geringer Effizienz in 27f/1492r-basierten Umweltanalysen amplifiziert.

In vergleichbaren Umweltanalysen des Reisfeldbodens wurden jedoch keine 16S rRNA-Gene von Mitgliedern des OP3 und BRC1 nachgewiesen (Hengstmann *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 1999b; Luedemann *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2001; Scheid *et al.*, 2004; Noll *et al.*, 2005). In der Summe dieser Studien wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Komponente im anoxischen Reisfeldboden anhand von ungefähr 400 16S rRNA-Gensequenzen analysiert. Das bestätigt die geringe Abundanz von BRC1 und OP3 im Reisfeldboden und impliziert, dass bei Umweltanalysen mit für die *Bacteria* als universell betrachteten Primer-Systemen

eine höhere Stichprobenzahl für den Nachweis von Mitgliedern dieser neuen Entwicklungslinien erforderlich wäre.

Die 16S rRNA-Gensequenzen der vier Genomfragmente IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5 besitzen keine Abweichungen in den Signaturnukleotiden PL40f und PLA46f, welche für das PVC-Superphylum charakteristisch sind. Basenfehlpaarungen liegen hingegen bei den Planctomyceten-spezifischen 16S rRNA-Signaturen PLA886f und PLA58f vor (Neef *et al.*, 1998; Gade *et al.*, 2004; Kirkpatrick *et al.*, 2006). Folglich wäre ein Nachweis von BRC1 und OP3 über die dazu korrespondierenden Primer vermutlich weniger erfolgreich gewesen.

4.1.4 Struktur der rRNA-Operons

Die OP3 zugeordneten Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV226A8 tragen ein vollständiges rRNA-Operon mit der Genabfolge 16S rRNA, 23S rRNA und 5S rRNA. In der intergenischen Region zwischen den 16S und 23S rRNA-Genen sind tRNA-Gene für Alanin und Isoleucin lokalisiert. Diese Struktur des rRNA-Operons ist typisch für die meisten prokaryotischen Genome (Gürtler und Stanisich, 1996; Chen *et al.*, 2000). Das rRNA-Operon des Genomfragments V174F5 besitzt ebenfalls die typische Abfolge der 16S, 23S und 5S rRNA-Gene, aber keine tRNA-Gene in der intergenischen Region. Mitglieder der *Planctomycetes* (*Planctomyces limnophilus* IFAM 1008, *Pirellula marina* IFAM 1313, *Rhodopirellula baltica* SH-1 und *Gemmata obscuriglobus* IFAM 1439) sowie ein poribakterielles Genomfragment besitzen eine geteilte Organisation, bei der die 16S und 23S rRNA-Gene getrennt lokalisiert sind (Liesack *et al.*, 1989; Menke *et al.*, 1991; Gloeckner *et al.*, 2003; Fieseler *et al*., 2006). Eine typisch bakterielle Struktur des rRNA-Operons wurde hingegen für *Isosphaera* spp. und für die als *candidate species* bezeichneten Anammox-Bakterien der *Planctomycetes* Brocadia anammoxidans und Kuenenia stuttgartiensis nachgewiesen (Schmid *et al.*, 2001). Die Vertreter des Phylums *Verrucomicrobia* (*Verrucomicrobium spinosum* IFAM 1439, *Candidatus* Methylacidiphilum infernorum V4, *Opitutae terrae* PB90-1^{T} und *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835^{T}) tragen gleichermaßen ein rRNA-Operon mit typisch bakterieller Struktur (Menke *et al*., 1991). Die Lokalisation des 23S rRNA-Gens in direkter Nachbarschaft zum 5S rRNA-Gen und die erfolgreiche Amplifikation eines 16S-23S rRNA-Genfragments einschließlich der intergenischen Region für zwei

WS3-Genomfragmente lassen vermuten, dass die rRNA-Operons der dazu korrespondierenden Mikroorganismen eine typisch bakterielle Struktur besitzen (Nesbø *et al.*, 2005). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Mitglieder des PVC-Superphylums keine einheitliche Organisation des rRNA-Operons aufweisen. Mikroorganismen des OP3, BRC1 und WS3 sind hinsichtlich dieses Merkmals von Vertretern der Gattungen *Planctomyces* und *Pirellula* eindeutig zu differenzieren, zeigen aber Übereinstimmungen mit den Anammox-Bakterien des Phylums *Planctomycetes* und Mitgliedern der *Verrucomicrobia*.

4.1.5 23S rRNA-basierte Phylogenie

Alle berechneten 23S rRNA-Stammbäume führen zu einer stabilen monophyletischen Gruppierung der *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Lentisphaerae* und *Verrucomicrobia* als Mitglieder des PVC-Superphylums (Ward *et al*., 2000; Griffiths und Gupta, 2007; Pilhofer *et al.*, 2008). Die 23S rRNA-Gene der Genomfragmente IV32F6, IV180F6, IV226A8 und b1dcf5.1.a06 (marines Sediment) gruppieren unabhängig von der Verrechnungsmethode zusammen und bilden eine neue, bisher nicht durch Reinkulturen repräsentierte Hauptentwicklungslinie des PVC-Superphylums. Folglich bestätigen die 23S rRNA-Phylogenien die Zugehörigkeit des OP3 zum PVC-Superphylum, die bereits auf Basis der vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalyse postuliert wurde (Wagner und Horn, 2006). Die Lokalisation des BRC1-Genomfragments V174F5 war hingegen in den 23S rRNA-Stammbäumen nicht stabil und primär abhängig von der Auswahl der verwendeten Referenzsequenzen. Ein Grund dafür ist vermutlich, dass für die Berechnung dieser Stammbäume nur eine einzige 23S rRNA-Sequenz des BRC1 zur Verfügung stand. Im Gegensatz dazu waren vier unterschiedliche 23S rRNA-Gensequenzen von OP3 verfügbar, was bereits zu einer stabilen und reproduzierbaren Lokalisation dieser Entwicklungslinie im 23S rRNA-Stammbaum führte. Allerdings gruppierte das BRC1-Genomfragment in der Mehrzahl der berechneten Maximum-Likelihood-Stammbäume mit Mitgliedern des PVC-Superphylums.

Die Topologien der 16S rRNA- und der 23S rRNA-Phylogenien bestätigen den monophyletischen Ursprung des PVC-Superphylums und erlauben außerdem die Annahme, dass neben OP3 auch BRC1 und WS3 diesem Superphylum zuzuordnen sind.

4.2 Charakterisierung der sequenzierten Genomfragmente

4.2.1 GC-Gehalt

Vergleichende Analysen metagenomischer Datensätze unterschiedlicher Habitate ließen allgemeine Charakteristika erkennen, die die Sequenzinformationen des Metagenoms mit den Eigenschaften der mikrobiellen Gemeinschaft des Standortes verknüpfen (Harrington *et al.*, 2007; Raes *et al.*, 2007a; McHardy *et al.*, 2007). Metagenom-Analysen eines Agrarbodens zeigten beispielsweise, dass die Genome relativ groß sind, langsam evolvieren und einen hohen GC-Gehalt (~60%) aufweisen. Andererseits scheinen Prokaryoten in marinen Ökosystemen (Sargasso See, "Ocean Sampling Project") schneller zu evolvieren. So besitzen diese Mikroorganismen kleinere Genome mit niedrigem GC-Gehalt (~30-40%) (Raes *et al.* 2007a, 2007b; Foerster *et al.*, 2005, 2006). Entsprechend weisen marine Metagenome einen geringeren GC-Gehalt (~34%) auf als die Metagnome von Böden (~61%) (Foerster *et al.*, 2005). Die Parameter, die den GC-Gehalt einer gesamten Mikrobiota eines Standortes konstant in einem dauerhaften Gleichgewicht halten, während sich die GC-Gehalte individueller prokaryotischer Genome relativ schnell an veränderte Umweltfaktoren anpassen, konnten bisher nicht definiert werden (Naya *et al.*, 2002; Musto *et al.*, 2004, 2006; Foerstner *et al.*, 2005, 2006).

Der GC-Gehalt zwischen den Mitgliedern des PVC-Superphylums variiert stark und umfasst einen unteren Bereich (40%), den mittleren Bereich (40-55%) und die obere Spektrumsgrenze (>55%). Die niedrigsten GC-Gehalte innerhalb des PVC-Superphylums besitzen die Vertreter der *Chlamydiae*, *Lentisphaerae* und *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis. Die GC-Gehalte der Mitglieder der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und eines poribakteriellen Genomfragments liegen im mittleren Bereich, während diejenigen von *Gemmata obscuriglobus* und von zwei WS3-Genomfragmenten der oberen Bandbreite zuzuordnen sind. Entsprechend besitzen die OP3- und BRC1-Genomfragmente GC-Gehalte, die das Spektrum des PVC-Superphylums widerspiegeln (Tabelle 12).

Bohlin *et al*. (2008) sowie Bentley und Parkhill (2004) zeigten mittels vergleichender Genomanalyse von 402 bzw. 149 Prokaryoten, dass zwischen dem GC-Gehalt und der Größe eines Genoms eine allgemeine Korrelation besteht. Entsprechend kann spekuliert werden, dass die von den drei OP3-Genomfragmenten repräsentierten Bakterien ein kleineres Genom besitzen als diejenigen, welche zu

dem BRC1-Genomfragment korrespondieren. Die Genomgrößen würden im Bereich von 3 bzw. 4 Mbp liegen.

Tabelle 12: Charakteristika der Genomfragmente einschließlich GC-Gehalt.

Phylogenetische Zuordnung	OP3				BRC1
Genomfragment	**IV32F6**	**IV180F6**	**IV226A8**	**"Nesbø"**	**V174F5**
Anzahl ORFs	31	30	29	21	20
Abgeleitete Proteine mit vorhergesagter Funktion	21 (68%)	17 (57%)	25 (86%)	16 (76%)	10 (81%)
Homologe in den *Proteobacteria*	12 (38%)	5 (17%)	16 (55%)	2 (9,5%)	2 (10%)
Davon *Deltaproteobacteria*	8 (26%)	4 (13%)	10 (34%)	2 (9,5%)	1 (5%)
Homologe in den *Planctomycetes*	1 (3,2%)	1 (3,3%)	1 (3,4%)	1 (4,8%)	5 (25%)
GC-Gehalt	46%	49%	42%	46%	60%

4.2.2 Vergleichende Analyse ausgewählter Sequenzinformationen

Auf den OP3-Genomfragmenten wurden etwa dreißig ORFs und auf dem BRC1-Genomfragment zwanzig ORFs identifiziert (Tabelle 12). Ein Anteil von 57-86% der offenen Leserahmen konnte bekannten Funktionen in der Signaltransduktion, dem Elektronentransport, dem Kohlenstoff-Metabolismus, der Aminosäure-Biosynthese und der DNA-Reparatur zugeordnet werden. Hypothetische Proteine stellen einen Anteil von etwa 19-43% der offenen Leserahmen dar (Tabelle 12). Die Anzahl an funktionell annotierbaren ORFs ist wahrscheinlich von den genomischen Regionen abhängig, welche vergleichend analysiert werden. Entsprechend stimmt dieser Anteil (57-86%) der vier Genomfragmente relativ gut mit den Größenordnungen der Metagenom-Datensätze eines Agrarbodens (52%), eines Walgerippes auf dem Ozeanboden (66%) sowie mit Genomfragmenten aus Böden und marinen Standorten (54-100%) überein (Quaiser *et al*., 2002, 2003; Fieseler *et al*., 2006; Moreira *et al*., 2006; Harrington *et al*., 2007).

Die Annotation der Genomfragmente erzielte nur wenige Hinweise auf einen möglichen Phänotyp der Zielorganismen und keine Informationen, die die Formulierung von gezielten Anreicherungsstrategien ermöglichen würde. Im

Folgenden wird die Diskussion auf ausgewählte Aspekte der vergleichenden Sequenzanalyse der Genomfragmente IV32F6 und IV180F6 fokussiert.

Auf den OP3-Genomfragmenten IV32F6 und IV180F6 wurden zwei Gene vorhergesagt, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen für die gleiche Funktion kodieren. Darunter ist ein Gen, dass auf dem Genomfragment IV32F6 stromaufwärts und auf dem Genomfragment IV180F6 stromabwärts des rRNA-Operons lokalisiert ist und als ein Klasse I *peptide chain release factor* annotiert wurde. Die Klasse I und II *peptide chain release factor* erkennen die Stop-Codons während der Translation und beenden damit die Protein-Biosynthese. Außerdem wurde auf beiden Genomfragmenten ein ORF stromaufwärts der rRNA-Operons identifiziert, welches für die ADP-L-Glycero-D-Mannoheptose-Epimerase (HdlD) kodiert. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese einer Baueinheit Mannoheptose, welches ein wichtiger Bestandteil des inneren Kerns von Lipopolysacchariden ist. Lipopolysaccharide kommen in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien vor. Das erlaubt die Annahme, dass die Mikroorganismen des OP3 eine klassische Gram-negative Zellwand besitzen, wie sie typischerweise für *Proteobacteria* bekannt ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Mitglieder der *Chlamydiae* und *Planctomycetes* weder eine Peptidoglykanschicht noch Lipopolysaccharide besitzen, kann OP3 in diesem Merkmal eindeutig unterschieden werden (König *et al*., 1984; Liesack *et al.*, 1986; Fox *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 2006). Allerdings wurden einzigartige Lipid A-Varianten in Mitgliedern der Gattungen *Planctomyces* und *Pirellula* nachgewiesen (Kerger *et al.*, 1990). Lipid A ist ein Bestandteil der Lipopolysaccharide klassischer Gram-negativer Zellwände und verankert diese in der äußeren Membran. Die Vorhersage von Genen für die Biosynthese des Lipids A in *Rhodopirellula baltica* SH-1 führte zu der Vermutung, dass sich dessen Zellwand aus einer klassischen Gram-negativen Zellwand entwickelte (Gloeckner *et al*., 2003). Vertreter der *Verrucomicrobia* besitzen hingegen eine Gram-negative Zellwandstruktur (Hedlund *et al.*, 1997). Aus diesen Befunden kann geschlussfolgert werden, dass OP3 und *Verrucomicrobia* in diesem Merkmal Gemeinsamkeiten aufweisen, die sie von anderen PVC-Mitgliedern unterscheiden.

Die aus den annotierten *hdlD*-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen 53% (IV32F6; E-Wert: $3e^{-92}$, hoch signifikant) bzw. 49% (IV180F6; E-Wert: $2e^{-79}$, hoch signifikant) Ähnlichkeit zu Homologen von *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684^{T} bzw. *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1 auf, die den *Deltaproteobacteria* bzw.

Aquificae zuzuordnen sind (Abbildung 39). Das Dendrogramm der abgeleiteten Aminosäuresequenz von HdlD-Varianten repräsentativer Mitglieder der Domäne *Bacteria* ist konsistent mit der 16S rRNA-basierten Phylogenie (Abbildung 39). Das trifft hingegen nicht auf die *hdlD*-Gene der Genomfragmente IV32F6 und IV180F6 zu. Die Genomfragmente repräsentieren mit 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten von 82,4% sicherlich verschiedene Populationen innerhalb des OP3-Phylums (Hugenholtz *et al.*, 1998). Die unterschiedliche Lokalisation der beiden Genomfragmente im HdlD-Dendrogramm könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Genomfragment das *hdlD*-Gen durch horizontalen Gentransfer erhalten hat.

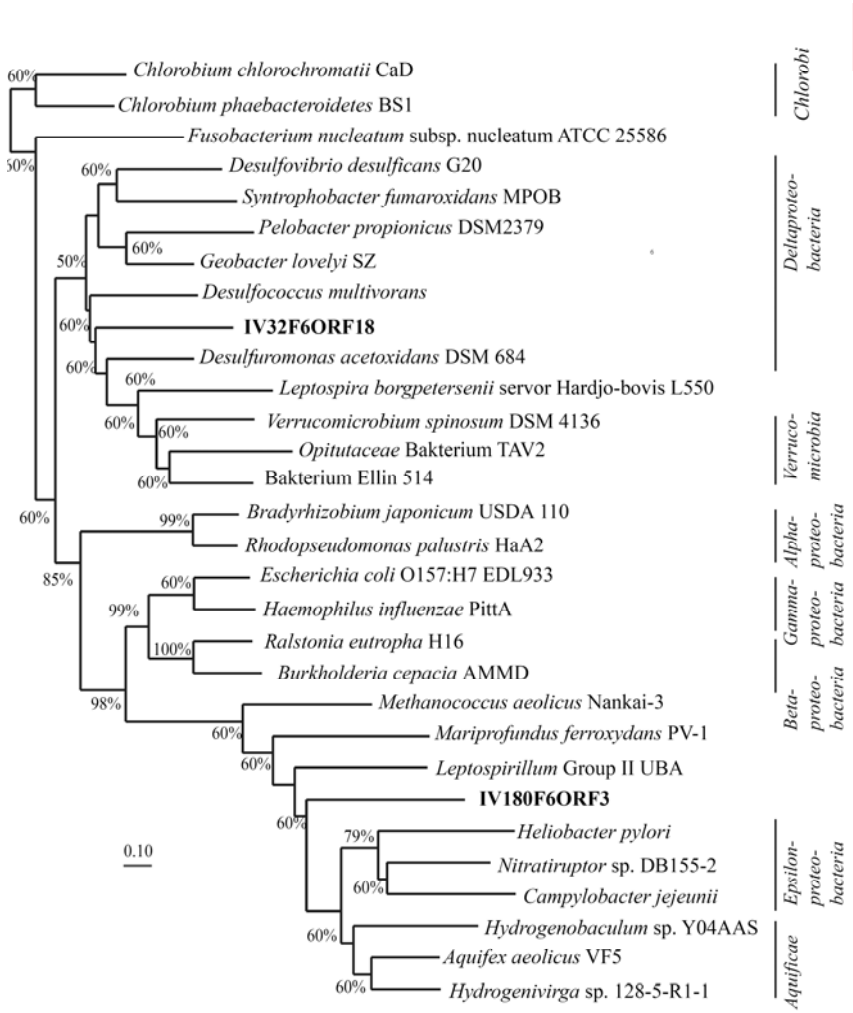

Abbildung 39: Maximum-Likelihood-Dendrogramm basierend auf der ADP-L-Glycero-D-Mannoheptose-Epimerase (HdlD). Die Positionen der von den Genomfragmenten IV32F6 und IV180F6 (Fettdruck) abgeleiteten HdlD-Proteine sind in Korrespondenz zu einer repräsentativen Auswahl bakterieller HdlD-Varianten dargestellt. Der Maßstab zeigt einen Sequenzunterschied von 10%.

Die in Abbildung 39 dargestellte Topologie würde dabei mehr auf das Genomfragment IV32F6 hindeuten, da dessen *hdlD*-Gen innerhalb der *Deltaproteobacteria* gruppiert.

Ein weiteres Indiz, dass die Genomfragmente IV32F6 und IV180F6 unterschiedliche Populationen des OP3 repräsentieren, sind zwei Gene, welche vermutlich für Enzymfunktionen in der Biosynthese des Nukleotids Thymidylat kodieren. Thymidylat (dTMP) ist für die DNA-Synthese und die DNA-Reparatur essentiell. Auf dem Genomfragment IV32F6 sind Gene lokalisiert, die eine Thymidylat-Synthase (ThyA; E-Wert: $3e^{-92}$, hoch signifikant) und eine Dihydrofolat-Reduktase (FolA; E-Wert: e^{-32}, signifikant) kodieren. Erstaunlicherweise konnte das *folA*-Gen in ungefähr 30% der komplett sequenzierten Genome nicht identifiziert werden (Myllykallio *et al.*, 2003). Diese Mikroorganismen besitzen wahrscheinlich einen alternativen Reaktionsweg für die Biosynthese von dTMP. Auf deren Genomen wurde ein Gen lokalisiert, welches vermutlich für eine neue Klasse Flavin-abhängiger Thymidylat-Synthasen (ThyX) kodiert (Myllykallio *et al.*, 2002). Ein solches *thyX*-Gen (E-Wert: $8e^{-139}$, hoch signifikant) wurde auf dem OP3-Genomfragment IV180F6 annotiert. Die Thymidylat-Synthasen ThyX und ThyA sind keine Homologen und weisen entsprechend keine Sequenzähnlichkeiten auf (Leduc *et al.*, 2003, 2007). Bisher wurden auf den komplett sequenzierten Genomen entweder *thyX*- oder *thyA*- Gene identifiziert. Die einzige Ausnahme sind bisher die Genome von Mitgliedern der Gattungen *Mycobacterium* und *Corynebacterium*, bei denen beide Genvarianten vorkommen (Galperin *et al.*, 2000; Leduc *et al.*, 2003; Myllykallio *et al.*, 2003). Dementsprechend korrespondieren die Genomfragmente IV32F6 und IV180F6 wahrscheinlich zu Populationen des OP3 mit unterschiedlichen Reaktionswegen für die Synthese von dTMP.

4.2.3 Taxonomische Zuordnung der vorhergesagten Proteine

Basierend auf den höchsten prozentualen Ähnlichkeiten konnten die von den annotierten Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen definierten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. In BlastP-Analysen wurden 8 ORFs (26%), 4 ORFs (13%) und 10 ORFs (35%) der OP3-Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV226A8 taxonomisch zu Homologen von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria*,

insbesondere der Ordnungen *Syntrophobacterales*, *Desulfuromonadales* und *Myxococcales*, zugeordnet (Tabelle 12, Abbildung 40).

Mit dem Ziel einen hoch aufgelösten Stammbaum des Lebens zu rekonstruieren, haben Ciccarelli *et al*. (2006) und Bapteste *et al*. (2008) eine Kerngruppe an Genen identifiziert, die im Verlauf der Evolution nicht durch horizontalen Gentransfer übertragen worden sind. Diese Gene sind in allen Mikroorganismen universell verbreitet und kodieren für Funktionen der Proteinbiosynthese, insbesondere der Translation. Die Gene *hflC*, *hlfK*, *accA* und *hdlD*, welche in der vorliegenden Arbeit für die Illustration taxonomischer Zuordnungen ausgewählt wurden, wären folglich für die Ableitung phylogenetischer Verwandtschaften nicht geeignet. Das auf dem Genomfragment IV180F6 lokalisierte *serS*-Gen ist hingegen dieser Kerngruppe zuzuordnen. Ein möglicher horizontaler Gentransfer wurde bereits für das *hdlD*-Gen des OP3-Genomfragments IV32F6 diskutiert.

Allerdings erscheint eine zufällige Anhäufung von taxonomischen Zuordnungen zu Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* auf den OP3-Genomfragmenten unwahrscheinlich. Alle drei Genomfragmente sind durch ein rRNA-Operon definiert. Daher werden vermutlich identische genomische Regionen verglichen. Eine mögliche Erklärung für die Anhäufung von taxonomischen Zuordnungen zu Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* wäre ein sehr ursprünglicher horizontaler Transfer einer Genregion aus einem Bakterium der *Deltaproteobacteria* in einen Vorfahren des OP3-Phylums mit Inserierung im Bereich des rRNA-Operons. Gegen diese Annahme spricht allerdings die Tatsache, dass keine Homologien zwischen den Deltaproteobakterien-ähnlichen Genen der drei OP3-Genomfragmente identifiziert worden sind. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Anhäufung von Deltaproteobakterien-ähnlichen Genen einen phylogenetischen Hintergrund hat. Diese Überlegung wäre in Konflikt mit den 16S rRNA- und 23S rRNA-Phylogenien, die keine spezifische Verwandtschaft zwischen den *Deltaproteobacteria* und OP3 zeigen. Eine alternative Erklärung wäre eine im Laufe der Evolution stattgefundene spezifische Selektion von OP3-Bakterien hin zu Physio- und Phänotypen, die auffallende Gemeinsamkeiten mit Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* aufweisen. Letzteres könnte zu vermehrten horizontalen Gentransferereignissen zwischen *Deltaproteobacteria* und Mitgliedern des OP3 geführt haben.

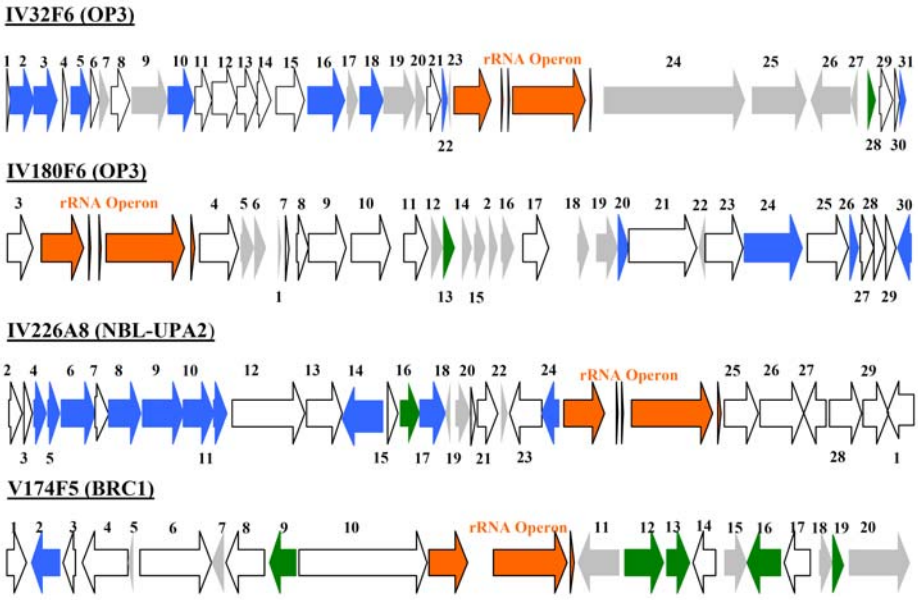

Abbildung 40: Überblick über die Verteilung der offenen Leserahmen auf den Genomfragmenten IV32F6, IV180F6, IV226A8 und V174F5, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen höchste Übereinstimmungen mit korrespondierenden Proteinsequenzen von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* (blau) und der *Planctomycetes* (grün) zeigen. Die rRNA-Operons sind in rot und die hypothetischen Proteine in grau hervorgehoben.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass bei der vergleichenden Genomanalyse mehrere dieser taxonomischen Zuordnungen zu Homologen von Mitgliedern der Gattungen *Syntrophobacter* und *Syntrophus* erfolgten. Diese Bakterien besitzen die Fähigkeit, Alkohole und Fettsäuren syntroph zu oxidieren (Tabelle 13, Abbildung 40). Weitere taxonomische Zuordnungen waren zu Homologen von Mitgliedern der Gattungen *Pelobacter*, *Desulfuromonas* und *Desulfovibrio* (Tabelle 13). Während *Pelobacter* spp. beispielsweise an der syntrophen Oxidation von Polyethylenglykol oder 2,3-Butandiol beteiligt sind, wurde für den Ethanol-oxidierenden *Desulfovibrio vulgaris* in der Abwesenheit von Sulfat bzw. bei sehr geringen Sulfatkonzentrationen eine Syntrophie mit einem hydrogenotrophen methanogenen Partner beschrieben (Bryant *et al.*, 1977). Biebl und Pfennig beschrieben bereits 1978 die syntrophe Assoziation von *Desulfuromonas acetoxidans* mit den phototrophen Sulfid-oxidierenden *Chlorobium* sp. und *Prosthecochloris aestuarii*, in welcher ein Redox-Kreislauf des Schwefels stattfindet. *Desulfuromonas acetoxidans* reduziert dabei elementaren Schwefel zu Sulfid in Verbindung mit der Oxidation von Acetat. Sulfid wird dann von

Chlorobium spp. unter der Einwirkung von Licht und CO_2 wieder zu Schwefel oxidiert und der Kohlenstoff wird in das Zellmaterial eingebaut. Eine ähnliche syntrophe Assoziation im Schwefelkreislauf kommt in der Natur zwischen Sulfat-reduzierenden *Desulfovibrio* sp. und *Chlorobium* sp. vor. Der Ethanol-oxidierende *Desulfovibrio* sp. reduziert Sulfat zu Sulfid, welches dann von *Chlorobium* sp. unter der Einwirkung von Licht nicht nur von Sulfid zu Schwefel, sondern auch zu Sulfat oxidiert werden kann (Biebl und Pfennig, 1978).

Tabelle 13: Metabolische Eigenschaften der Mikroorganismen, deren korrespondierende Proteinsequenzen bei den taxonomischen Zuordnungen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Genomfragmente IV32F6, IV180F6 und IV226A8 wiederholt höchste Übereinstimmungen zeigen.

Ordnung	Gattung	Eigenschaft des Stoffwechsels	Quelle
Syntrophobacterales	*Syntrophus*	Syntrophe Oxidation von primären,	Hatamoto *et al*., 2007
	Syntrophobacter	sekundären aliphatischen	McInerney *et al*., 1981
		Alkoholen bzw. lang- oder	Sousa *et al.*, 2007
		kurzkettigen Fettsäuren	Jackson *et a*l., 1999
Desulfuromonadales	*Pelobacter*	Syntrophe Oxidation von	Schink, 1984
		Polyethylenglykol, 2,3-Butandiol,	
		Acetylen	Schink und Stieb, 1983
	Desulfuromonas	Schwefel-Reduzierer	Pfennig und Biebl, 1977
		Eisen-Reduzierer	Coates *et al*., 1995
			Vandieken *et al*., 2006
	Desulfovibrio	Sulfat-Reduzierer	Kluyver und van Niel, 1936
			Bale *et al.,* 1997
			Postgate und Campbell, 1966
Myxococcales	*Myxococcus*	Primär-und Sekundärmetabolite	Sanford *et al*., 2002
	Anaeromyxobacter	Aryl-Halorespirierend	

Diese überraschenden taxonomischen Zuordnungen zu Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* werden ergänzt durch die Tatsache, dass Populationen des OP3 in methanogenen Bioreaktoren nachgewiesen wurden, in welchen Propionat und Butyrat syntroph oxidiert wurde (Shigimatsu *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der vergleichenden Genomanalyse erlauben daher die Spekulation, dass die zu den OP3-Genomfragmenten korrespondierenden Bakterien syntroph sind, mit der Fähigkeit Propionat, Butyrat oder andere Fettsäuren zu oxidieren.

Ein anderes Beispiel für vermehrte Ereignisse an horizontalen Gentransfers bedingt durch eine im Laufe der Evolution wirkende Selektion hin zu einem bestimmten Phänotyp könnte für *Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans, einen repräsentativen Vertreter der neuen Entwicklungslinie WWE1, zutreffen. Das Genom des bisher nicht in Reinkultur befindlichen Mikroorganismus wurde mittels Metagenom-Analyse von Klärschlamm rekonstruiert (Pelletier *et al.*, 2008). WWE1 stellt eine Hauptentwicklungslinie innerhalb der Domäne *Bacteria* dar und gruppiert in 16S rRNA-Phylogenien mit dem Phylum *Spirochaetes*. WWE1 umfasst auch zwei Umweltsequenzen des anoxischen Reisfeldbodens, die Derakshani *et al.* (2001) mit "SP *lineage*" bezeichnete. Interessanterweise wurde der größte Anteil der Protein-kodierenden Gene auf dem Genom von *Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans taxonomisch Homologen von *Pelobacter carbinolicus*, *Syntrophobacter fumaroxidans* und *Syntrophus aciditrophicus* der *Deltaproteobacteria* zugeordnet (Pelletier *et al.*, 2008). Diese Anhäufung von Deltaproteobakterien-ähnlichen Genen würde wie im Falle der OP3-Genomfragmente auf vermehrte horizontale Gentransferereignisse zwischen WWE1 und *Deltaproteobacteria* hinweisen, die unter bestimmten Bedingungen im Lauf der Evolution zur spezifischen Selektion von WWE1-Populationen führte.

Die taxonomischen Zuordnungen erfolgten bei dem BRC1-Genomfragment V174F5 vermehrt zu Homologen von Mitgliedern der *Planctomycetes* (Abbildung 40). Dies ist konsistent mit den rRNA-Phylogenien, die eine Zugehörigkeit des BRC1 zum PVC-Superphylum andeuten.

4.3 Anreicherungskulturen

Die ersten genetischen Informationen von Mitgliedern des BRC1, OP3 und NBL-UPA2 gaben keine direkten Hinweise auf phänotypische Merkmale, die eine selektive Anreicherung dieser Organismen ermöglicht hätten. Die taxonomischen Zuordnungen annotierter offener Leserahmen auf den Genomfragmenten IV32F6, IV180F6 und IV226A8 führten zu der Hypothese, dass Populationen des OP3 die Fähigkeit besitzen, Fettsäuren oder Alkohole syntroph zu oxidieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Versuche zur biologischen Anreicherung von Mitgliedern des OP3, wie auch von BRC1, durchgeführt. Die Anreicherungsversuche erfolgten in einem Süßwassermedium, dem entweder

Butyrat, Propionat oder ein Substratgemisch als Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurde. Als potentiell syntropher Partner wurde den Kulturen *M. formicicum* DSM 1535^T zugegeben. Entsprechende Kontrollen ohne *M. formicicum* wurden mitgeführt.

Der Nachweis von OP3 erfolgte prinzipiell mit dem spezifischen 16S rRNA-basierten PVC-Assay (PLA40f/1492r), mit welchem OP3 bereits in der Klonbibliothek und in den Genbanken erfolgreich identifiziert worden war. In den angereicherten Konsortien mit Butyrat, Propionat und einem Substratgemisch war der molekularbiologische Nachweis mit dem PVC-Assay negativ. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen veränderte nichts an diesem Befund. Folglich waren Mitglieder des PVC-Superphylums, einschließlich OP3, in den angereicherten Konsortien nicht nachweisbar. Das galt sowohl für die Anreicherungen mit dem potentiell syntrophen Partner *M. formicicum* wie auch für die Kontrollen.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Versuche zur biologischen Anreicherung von *Candidatus* Cloacamonas acidoaminovorans von WWE1 mit synthetischem Medium und Lysin als Kohlenstoff- und Energiequelle wie auch in Kokulturen mit den potentiell syntrophen Partnern *M. formicium* und *Desulfovibrio desulfuricans* nicht zum Erfolg führten (Pelletier *et al*., 2008). Mittels 16S rRNA-basiertem Screening mit spezifischen Primern für WWE1 wurden zwar in einigen angereicherten Konsortien WWE1-Populationen nachgewiesen, jedoch nicht kontinuierlich über die gesamte Inkubationsperiode von einem Jahr. WWE1 war in der Mehrzahl der biologischen Anreicherungen nicht präsent. Es besteht die Möglichkeit, dass für eine erfolgreiche Anreicherung von OP3 wie auch von WWE1 andere potentiell syntrophe Partner getestet werden müssten. Die Ergebnisse der vergleichenden Genomanalysen in Hinblick auf die taxonomischen Zuordnungen als auch erste Proteomanalysen deuten im Fall von *Candidatus* Cloacamonas acidoaminovorans darauf hin, dass es sich um syntrophe Mikroorganismen handelt (Pelletier *et al*., 2008).

Während BRC1 in den Anreicherungen mit Propionat und Butyrat nicht nachweisbar war, zeigten die Kultivierungen mit dem Substratgemisch einen geringfügigen Anreicherungseffekt. BRC1 wurde in der Kontrolle (ohne Methanogenen) nach einem Monat Inkubation und in den Verdünnungsstufen (10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5}) der ersten Anreicherungsstufe nach 90 Tagen Inkubation nachgewiesen. Jedoch war eine kontinuierliche Detektion über die gesamte

Inkubationsperiode nicht möglich. BRC1 war in den angereicherten Konsortien der zweiten Anreicherungsstufe mit Substratgemisch nicht mehr nachweisbar. Damit unterscheiden sich diese Befunde von den Ergebnissen, welche Manigee Derakshani in ihrer Dissertation beschreibt. Mittels spezifischem PCR-basierten Screening wurde BRC1 in Kulturen mit Substratgemisch bis zur 5. Verdünnungsstufe nach 28 Tagen Inkubation und bis zur 6. Verdünnungsstufe nach 90 Tagen Inkubation nachgewiesen. Es stellte sich somit die Frage, wie die unterschiedlichen Befunde zu erklären sind. Das Medium plus Reduktionsmittel, Substrate sowie Inkubationsbedingungen entsprachen exakt den Vorgaben von Manigee Derakshani (Dissertation), jedoch nicht die Zugabe des potentiell syntrophen Partners *M. formicicum*. So ist wahrscheinlich, dass der Zusatz dieses Methanogenen die Ursache für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse ist.

T-RFLP-Analysen zeigten, dass nur wenige der molekularbiologisch überprüften Anreicherungskulturen Mitglieder der *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* enthielten. Die archaeelle Komponente der angereicherten Konsortien war in der Mehrzahl der Kulturen beispielsweise von Mitgliedern der *Methanosarcinaceae* sowie des RC-I und RC-III dominiert. Folglich hatte die Präsenz von *M. formicicum* unter den gegebenen Anreicherungsbedingungen keinen positiven Effekt auf die Anreicherung von Mitgliedern des BRC1.

Die bakterielle Komponente in den angereicherten Konsortien wurde von Mitgliedern der *Clostridia* dominiert. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit der numerischen Bedeutung dieser Organismen in gefluteten Reisfeldböden sowie der wiederholten Anreicherung und Isolierung aus diesem Standort (Hengstmann *et al.*, 1999; Luedemann *et al*., 2000; Weber *et al.*, 2000; Scheid *et al*., 2004; Lueders *et al*., 2004; Noll *et al*., 2005; Erkel *et al*., 2005). Vertreter der *Bacillaceae* und *Rhodocyclaceae* wurden zuvor in den Reisfeldboden-Studien von Hengstmann *et al*. (1999), Noll *et al*. (2005) und Lu *et al*. (2006) ebenfalls relativ häufig nachgewiesen.

Unerwartet war die Anreicherung mesophiler Mitglieder des RC-I (*Methanocellales*), welche über drei Anreicherungsstufen in den Kulturen mit Substratgemisch beobachtet wurde. Allerdings dominierte RC-I die archaeelle Komponente nur in den Kontrollen, in denen *M. formicicum* nicht zugegeben worden war und welche mit unverdünnter Bodenaufschlämmung angeimpft wurden. Im Gegensatz dazu war *M. formicicum* DSM 1535^{T} in der archaeellen Komponente

vorherrschend, wenn er als potentiell syntropher Partnerorganismus den Anreicherungskulturen hinzugefügt worden war. Die einzige Ausnahme stellte die 10^{-3}-Verdünnung der ersten Anreicherungsstufe dar, in welcher nach 131 Tagen Inkubation RC-III detektiert wurde. Methanogene des RC-I und *M. formicicum* konkurrieren mit hoher Affinität um das methanogene Substrat Wasserstoff. RC-I ist wahrscheinlich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in Kulturen mit *M. formicicum* nicht mehr konkurrenzfähig.

Die T-RFLP-Analysen der angereicherten Konsortien in den Kontrollen zeigten, dass die archaeelle Komponente während der ersten Inkubationsperiode stets von RC-I dominiert wurde. Im weiteren Inkubationsverlauf reduzierte sich jedoch der Anteil an RC-I zugunsten von Mitgliedern der *Methanosarcinaceae* und von phylogenetischen Gruppen mit 789 bp und 794 bp T-RFs sowie einem 123 bp T-RF. Diese T-RFs konnten bisher durch die *in-silico* T-RFLP-Analyse nicht exakt zugeordnet werden. Während die T-RFs von 789 bp und 794 bp Mitglieder der *Methanococcales*, *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium* repräsentieren könnten, war die Zuordnung des 123 bp T-RFs nicht möglich. Letztlich kann die archaeelle Komponente in den angereicherten Konsortien nur mit einer Klonierung und der vergleichenden Sequenzanalyse des archaeellen 16S rRNA-PCR-Produkts identifiziert werden.

Damit stellte sich die Frage, wie die Abundanz des RC-I erhöht werden kann. Es ist bekannt, dass bei der Inkubation von anoxischem Reisfeldboden in einem Temperaturgradienten von 10° bis 80°C ein Maximum der Methanproduktion bei ungefähr 41°C und 50°C vorliegt (Fey *et al.*, 2001). Bei einer Temperatur-verschiebung von gefluteten Reiswurzeln und anoxischem Reisfeldboden von 25°C auf 50°C wurde beobachtet, dass die archaeelle Komponente eine zunehmend geringere phylogenetische Diversität aufwies und von hydrogenotrophen RC-I dominiert wurde (Fey *et al*., 2001; Chin *et al*., 2004; Peng *et al*., 2008). Dieses Temperaturoptimum der Methanproduktion verbunden mit einer hohen Abundanz des RC-I im Reisfeldboden bei 50°C (Fey *et al*., 2001) wurde zur selektiven Anreicherung von thermophilen Vertretern des RC-I genutzt (Lueders *et al.*, 2001). Das angereicherte Konsortium wurde als MRE50 (*methanogenic rice field soil enrichment at 50°C*) bezeichnet. Bei dem Transfer eines Aliquots des angereicherten Konsortiums MRE50 von einer Inkubationstemperatur von 50°C auf 30°C fand kein Wachstum mehr statt. Folglich sind diese Vertreter des RC-I strikt thermophil

(Lueders *et al.*, 2001). Das erklärt das Maximum der Methanproduktion bei 50°C im anoxischen Reisfeldboden. Die Temperatur in Reisfeldböden variiert jedoch naturgemäß von 15°C bis 30°C, so dass die Mehrheit der RC-I-Populationen eher mesophiler Natur ist, welche vermutlich das zweite Temperaturoptimum der Methanproduktion bestimmen (Schütz *et al.*, 1990). Einerseits würde eine Temperaturverschiebung des angereicherten Konsortiums dieser Arbeit von jetzt 30°C auf 50°C sicherlich vor allem die Abundanz der *Methanosarcinaceae* reduzieren (Erkel *et al*., 2005). Verbunden damit wäre aber eine Selektion zugunsten thermophiler Mitglieder des RC-I. Da die Experimente eine biologische Anreicherung mesophiler Vertreter des RC-I zum Ziel haben, war eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50°C folglich nicht geeignet.

Damit stellte sich die Frage, unter welchen Bedingungen der Anreicherungsstatus von RC-I gezielt erhöht werden kann. Die thermophilen Vertreter des RC-I sind obligat hydrogenotroph (Erkel *et al*., 2006). Die vollständige Rekonstruktion des Genoms eines dominierenden RC-I-Genotyps in der Anreicherungskultur MRE50 zeigte, dass die genetischen Voraussetzungen für die Verwertung von Formiat vorhanden sind (Erkel *et al*., 2006). Das wurde bereits experimentell bestätigt (Kemnitz, Dissertation). Diese physiologischen Merkmale waren bei der strategischen Planung für die Anreicherung von RC-I-Vertretern mit 20 mM Propionat unter mesophilen Bedingungen aus dem Reisfeldboden und der gezielten Isolierung von *Methanocella paludicola* DSM 17711^T mit 40 mM Formiat, H_2 (ca. 150 kPa) in Syntrophie mit dem Propionat-Verwerter *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB von Bedeutung (Sakai *et al*., 2007, 2008). Es wurde bereits vermutet, dass RC-I in Syntrophie mit sekundär fermentierenden Mikroorganismen vorkommt. RC-I hält dabei die Wasserstoffkonzentration gering, so dass der Abbau von Fettsäuren thermodynamisch begünstigt wird (Lueders *et al*., 2004). Populationen des RC-I haben unter diesen Bedingungen einen selektiven Vorteil, wobei RC-I dabei theoretisch wieder mit *Methanobacterium* spp. konkurriert und sich bei höheren Wasserstoffkonzentrationen andere hydrogenotrophe Methanogene durchsetzen würden. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit versucht, die Erhöhung des Anreicherungsstatus durch eine syntrophe Assoziation mit Acetat- und Propionat-verwertenden Bakterien durchzuführen. Ein Aliquot der biologischen Anreicherung mit RC-I wurde folglich in Acetat und Propionat überimpft.

Mitglieder des RC-III wurden kultivierungsunabhängig vor allem im Reisfeldboden, Marschland und Kompostbergen nachgewiesen (Kemnitz *et al.*, 2004, 2005; Thummes *et al.*, 2007; Peng *et al*., 2008). Reinkulturen existieren bisher nicht. Anreicherungsexperimente mit Proben aus Marschland führten zu der Schlussfolgerung, dass diese *Euryarchaeota*-Gruppe an der Fermentation von Oligopeptiden beteiligt ist (Kemnitz *et al*., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit war in einem angereicherten Konsortium der 10^{-3}-Verdünnung mit Substratgemisch RC-III nach 130 Tagen spezifisch nachweisbar. Der potentiell syntrophe Partnerorganismus *M. formicicum* war zu Beginn der biologischen Anreicherung hinzugefügt worden. Dabei zeigten Analysen der Substratumsetzungen, dass Fumarat, Pyruvat und Lactat nach ungefähr 20 Tagen Inkubation umgesetzt war. Das Intermediat Ethanol war nach einer Inkubationsperiode von 95 Tagen nicht mehr detektierbar. Der Nachweis einer Methanproduktion und die Verfügbarkeit von ausschließlich Acetat und Propionat bis zum Ende der Inkubationsperiode von 158 Tagen führten zu Spekulationen über eine mögliche syntrophe Assoziation, bei welcher Acetat- und Propionat-fermentierende Bakterien beteiligt sein könnten. Nach Überimpfen eines Aliquots in Kulturen mit Acetat und Propionat in verschiedenen Mischungsverhältnissen konnte RC-III nach einer Inkubationsperiode von 40 Tagen allerdings nicht mehr detektiert werden. Aus diesen Befunden ist zu schlussfolgern, dass unter den gegebenen Anreicherungsbedingungen kein Wachstum von Mitgliedern des RC-III stattfand, so dass diese Organismengruppe möglicherweise andere Substratpräferenzen hat.

Literatur

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143−169.

Akasaka, H., Izawa, T., Ueki, K., Ueki, A. (2003) Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy field soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 149–161.

Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J., Parkes, R.J. (1997) *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 515−521.

Bapteste, E., Susko, E., Leigh, J., Ruiz-Trillo, I., Bucknam, J., Doolittle, W.F. (2008) Alternative Methods for Concatenation of Core Genes Indicate a Lack of Resolution in Deep Nodes of the Prokaryotic Phylogeny. Mol. Biol. Evol. 25, 83–91.

Bauer, M., Lombardot, T., Teeling, H., Ward, N.L., Amann, R.I., Gloeckner, F.O. (2004) Archaea-like genes for C1-transfer enzymes in *Planctomycetes*: phylogenetic implications of their unexpected presence in this phylum. J. Mol. Evol. 59, 571−586.

Bentley, S.D., Parkhill, J. (2004) Comparative Genomic Structure of Prokaryotes. Annu. Rev. Genet. 38, 771–791.

Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S.B., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N., DeLong, E.F. (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science. 289, 1902−1906.

Biebl, H., Pfennig, N. (1978) Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. Arch. Microbiol. 117, 9–16.

Bohlin, J., Skjerve, E., Ussery, D.W. (2008) Reliability and applications of statistical methods based on oligonucleotide frequencies in bacterial and archaeal genomes. BMC Genomics. 9, 104−122.

Boos, W., Shuman, H. (1998) Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism and Regulation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 204−229.

Braun, M., Bungert, S., Friedrich, T. (1998) Characterization of the Overproduced NADH Dehydrogenase Fragment of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*. Biochem. 37, 1861−1867.

Brieé, C., Moreira, D., López-García, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. Res. Microbiol. 158, 213−227.

Brümmer, I.H., Felske, A.D., Wagner-Dobler, I. (2004) Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5094−5101.

Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A., Crabill, M.R. (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H2-utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162–1169.

Buckley, D.H., Huangyutitham, V., Nelson, T.A., Rumberger, A., Thies, J.E. (2006) Diversity of *Planctomycetes* in Soil in Relation to Soil History and Environmental Heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4522−4531.

Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., Côté, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. Trends Genet. 19, 321−329.

Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science. 311, 1283−1287.

Chen, J., Banks, D., Jarret, R.L., Jones, J.B. (2000) Evidence for conserved tRNA genes in the 16S-23S rDNA spacer sequence and two *rrn* operons of *Xylella fastidiosa.* Can. J. Microbiol. 46, 1171−1175.

Chin, K.-J., Rainey, F.A., Janssen, P.H., Conrad, R. (1998) Methanogenic Degradation of Polysaccharides and the Characterisation of Polysaccharalytic *Clostridia* from Anoxic Rice Field Soil. System. Appl. Microbiol. 21, 185−200.

Chin, K.-J., Lukow, T., Conrad, R. (1999a) Effect of Temperature on Structure and Function of the Methanogenic Archaeal Community in an Anoxic Rice Field Soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2341−2349.

Chin, K.-J., Hahn, D., Hengstmann, U., Liesack, W., Janssen, P.H. (1999b) Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5042−5049.

Chin, K.-J., Lueders, T., Friedrich, M.W., Klose, M., Conrad, R. (2004) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. Microb. Ecol. 47, 59−67.

Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2003) Molecular evidence for novel *Planctomycete* diversity in a municipal wastewater treatment plant. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7354−7363.

Chourai, R., Le Paslier, D., Dauga, C., Daegelen, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2005) Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2145−2153.

Coates, J.D., Lonergan, D.J., Philips, E.J., Jenter, H., Lovley, D.R. (1995) *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov., a marine dissimilatory Fe(III) reducer that can oxidize long-chain fatty acids. Arch. Microbiol. 164, 406−413.

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. Prot. Eng. 10, 673−676.

Daniel, R. (2005) The Metagenomics of Soil. Nat. Rev. Microbiol. 3, 470−478.

Davis, K.E.R., Joseph, S.J., Janssen, P.H. (2005) Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71, 826–834.

Dedysh, S.N., Panikov, N.S., Liesack, W., Grosskopf, R., Zhou, J., Tiedje, J.M. (1998) Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. Science. 282, 281−284.

Dedysh, S.N., Pankratov, T.A., Belova, S.E., Kulichevskaya, I.S., Liesack, W. (2006) Phylogenetic Analysis and In Situ Identification of *Bacteria* Community Composition in an Acidic *Sphagnum* Peat Bog. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2110–2117.

Derakshani, M., Lukow, T., Liesack, W. (2001) Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 67, 623−631.

Derakshani, M. (1999). Molekularbiologische Untersuchung zur Diversität von Planctomyceten im Boden und an der Wurzel gefluteter Reis-Mikrokosmen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.

Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., Pace, N.R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3869−3877.

Donachie, S.P., Hou, S., Lee, K.S., Riley, C.W., Pikina, A., Belisle, C., Kempe, S., Gregory, T.S., Bossuyt, A., Boerema, J., Liu, J., Freitas, T.A., Malahoff, A., Alam, M. (2004) The Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot. Microb. Ecol. 48, 509–520.

Donachie, S.P., Foster, J.S., Brown, M.V. (2007) Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. ISME J. 1, 97−99.

Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Weatherby, T.M., Bodelier, P.L., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., Alam, M. (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. Nature. 450, 879−882.

Dyda, F., Klein, D.C., Hickman, A.B. (2000) GCN5-Related N-Acetyltransferases: A Structural Overview. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 81−103.

Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Luo, Q., Najar, F.Z., Roe, B.A., Sisk, T.M., Bühring, S.I., Hinrichs, K.U., Krumholz, L.R. (2007) Phylogenetic and metabolic diversity of *Planctomycetes* from anaerobic, sulfide- and sulfur-rich Zodletone Spring, Oklahoma. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4707−4716.

Erkel, C., Kemnitz, D., Kube, M., Ricke, P., Chin, K.-J., Dedysh, S., Reinhardt, R., Conrad, R., Liesack, W. (2005) Retrieval of first genome data for rice cluster I methanogens by a combination of cultivation and molecular techniques. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 187−204.

Erkel, C., Kube, M., Reinhardt, R., Liesack, W. (2006) Genome of Rice Cluster I archaea—the key methane producers in the rice rhizosphere. Science. 313, 370−372.

Ezraty, B., Aussel, L., Barras, F. (2005) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. Biochim. Biophys. Acta. 1703, 221−229.

Falk-Krzesinski, H.J., Wolfe, A.J. (1998) Genetic Analysis of the *nuo* Locus, Which Encodes the Proton-Translocating NADH Dehydrogenase in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 180, 1174−1184.

Fey, A., Conrad, R. (2000) Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4790−4797.

Fey, A., Chin, K.-J., Conrad, R. (2001) Thermophilic methanogens in rice field soil. Environ. Microbiol. 3, 295−303.

Fieseler, L., Quaiser, A., Schleper, C., Hentschel, U. (2006). Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum *Poribacteria* by environmental genomics. Environ. Microbiol. 8, 612−624.

Freitag, T.E., Prosser, J.I. (2003) Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria within Anoxic Marine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1359−1371.

Friedrich, T. (1998) The NADH:ubiquinone oxidoreductase complex I/from *Escherichia coli.* Bioch. Biophys. Acta. 1364, 134–146.

Foerstner, K.U., von Mering, C., Hooper, S.D., Bork, P. (2005) Environments shape the nucleotide composition of genomes. EMBO Reports. 6, 1208–1213.

Foerstner, K.U., von Mering, C., Hooper, S.D., Bork, P. (2006) Comparative analysis of environmental sequences: potential and challenges. Phil. Trans. R. Soc. B. 361, 519–523.

Fondi, M., Brilli, M., Emmiliani, G., Paffetti, D., Fandi, R. (2007) The primordial metabolism: an ancestral interconnection between leucine, arginine, and lysine biosynthesis. BMC Evolution. Biol. 7, S3.

Fox, A., Rogers, J.C., Gilbart, J., Morgan, S., Davis, C.H., Knight, S., Wyrick, P.B. (1990) Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. Infect. Immun. 58, 835−837.

Fuerst, J.A. (1995) The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. Microbiol. 141, 1493−1506.

Gade, D., Schlesner, H., Gloeckner, F.O., Amann, R., Pfeiffer, S., Thomm, M. (2004) Identification of *Planctomycetes* with Order-, Genus-, and Strain-Specific 16S rRNA-Targeted Probes. Microbial. Ecol. 47, 243–251.

Galperin, M.Y., Koonin, E.V. (2000) Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics. Nat. Biotechnol. 18, 609−613.

Gloeckner, F.O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., Rabus, R., Schlesner, H., Amann, R., Reinhardt, R. (2003) Complete genome sequence of the marine Planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 8298−8303.

Graff, A., Conrad, R. (2005) Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. FEMS Microb. Ecol. 53, 401−415.

Gray, J.R., Herwig, R.P. (1996) Phylogenetic Analysis of the Bacterial Communities in Marine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4049−4059.

Green, B.D., Keller, M. (2006) Capturing the uncultivated majority. Curr. Opin. Biotechnol. 17, 236−240.

Griffiths, E., Gupta, R.S. (2007) Phylogeny and shared conserved inserts in proteins provide evidence that *Verrucomicrobia* are the closest known free-living relatives of *Chlamydiae.* Microbiol. 153, 2648–2654.

Großkopf, R., Janssen, P.H., Liesack, W. (1998a) Diversity and Stucture of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval. Appl. Environ. Microbiol. 64, 960−969.

Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W. (1998b) Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4983−4989.

Guertler, V., Stanisich, V.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142, 3−16.

Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. Science. 305, 1457−1462.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. Chem. Biol. 5, R245−R249.

Harrington, E.D., Singh, A.H., Doerks, T., Letunic, I., von Mering, C., Jensen, L.J., Raes, J., Bork, P. (2007) Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 104, 13913−13918.

Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A., Harada, H. (2007) *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 2137−2142.

Hedderich, R., Whitman, W.B. (2006) Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. The Prokaryotes. (Hrsg. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E.), Springer Verlag, New York, Berlin: 2, 1050–1079.

Hedlund, B.P., Gosink, J.J., Staley, J.T. (1997) Verrucomicrobia div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of *Prosthecobacter*. Antonie Van Leeuwenhoek. 72, 29−38.

Henckel, T., Friedrich, M., Conrad, R. (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1980−1990.

Hengstmann, U., Chin, K.-J., Janssen, P.H., Liesack, W. (1999) Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5050−5058.

Hou, S., Makarova, K.S., Saw, J.H., Senin, P., Ly, B.V., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Galperin, M.Y., Omelchenko, M.V., Wolf, Y.I., Yutin, N., Koonin, E.V., Stott, M.B., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Smirnova, A.V., Dunfield, P.F., Feng, L., Wang, L., Alam, M. (2008) Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, "Methylacidiphilum infernorum", a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. Biol. Direct. 3, 26.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180, 4765−4774.

Hugenholtz, P. (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biol. 3, Reviews S0003.

Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC. Report 2007.

Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L.J., Larsen, O., Birkeland, N.K. (2008) Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105, 300−304.

Jackson, B.E., Bhupathiraju, V.K., Tanner, R.S., Woese, C.R., McInerney, M.J. (1999) *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. Arch. Microbiol. 171, 107−114.

Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A., Janssen, P.H. (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7210−7215.

Kemnitz, D., Chin, K.-J., Bodelier, P., Conrad, R. (2004) Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. Environ. Microbiol. 6, 449−461.

Kemnitz, D., Kolb, S., Conrad, R. (2005) Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. Environ. Microbiol. 7, 553−565.

Kemnitz, D. (2005) Charakterisierung unkultivierter *Archaea* aus Böden. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Lahn.

Kerger, B.D., Mancuso, C.A., Nichols, P.D., White, D.C., Langworthy, T., Sittig, M., Schlesner, H., Hirsch, P. (1988) The budding bacteria, *Pirellula* and *Planctomyces,* with atypical 16S rRNA and absence of peptidoglycan, show eubacterial phospholipids and uniquely high proportions of long chain beta-hydroxy fatty acids in the lipopolysaccharide lipid A. Arch. Microbiol. 149, 255−260.

Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K. (1996) A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. EMBO J. 15, 6122−6131.

Kihara, A., Ito, K. (1998) Translocation, folding, and stability of the HflKC complex with signal anchor topogenic sequences. J. Biol. Chem. 273, 9770−9775.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. J. Microbiol. Methods. 58, 169−188.

Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J.T. Murray, J.W. (2006) Diversity and distribution of *Planctomycetes* and related bacteria in the suboxic zone of te black sea. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3079−3083.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1328−1333.

Kluyver, A.J., Van Niel, C.B. (1936) Prospects for a natural system of classification of bacteria. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 94, 369−403.

König, E., Schlesner, H., Hirsch, P. (1984) Cell wall studies on budding bacteria of the *Planctomyces/Pasteuria* group and on a *Prosthecomicrobium* sp.. Arch. Microbiol. 138, 200−205.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. J. Mol. Biol. 305, 567-580.

Krüger, M., Frenzel, P., Kemnitz, D., Conrad, R. (2005). Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. FEMS Microb. Ecology 51, 323−331.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. und Goodfellow M. (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester, England. 205−248.

Leduc, D., Graziani, S., Meslet-Cladiere, L., Sodolescu, A., Liebl, U., Myllykallio, H. (2004) Two distinct pathways for thymidylate (dTMP) synthesis in (hyper) thermophilic Bacteria and Archaea. Biochem. Soc. Trans. 32, 231−235.

Leduc, D., Escartin, F., Nijhout, H.F., Reed, M.C., Liebl, U., Skouloubris, S., Myllykallio, H. (2007) Flavin-dependent thymidylate synthase ThyX activity: implications for the folate cycle in bacteria. J. Bacteriol. 189, 8537−8545.

Leif, H., Sled, V.S., Ohnishi, T., Weiss, H., Friedrich, T. (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from *Escherichia coli.* Eur. J. Biochem. 230, 538−548.

Ley, R.E., Harris, J.K., Wilcox, J., Spear, J.R., Miller, S.R., Bebout, B.M., Maresca, J.A., Bryant, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (2006) Unexpected diversity and complexity of the guerrero negro hypersaline microbial mat. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3685−3695.

Liesack, W., König, H., Schlesner, H., Hirsch, P. (1986) Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. Arch. Microbiol. 145, 361−366.

Liesack, W., Stackebrandt, E. (1989) Evidence for Unlinked *rrn* Operons in the Planctomycete *Pirellula marina.* J. Bacteriol. 171, 5025−5030.

Liesack, W., Schnell, S., Revsbach, N.P. (2000) Microbiology of Flooded rice paddies. FEMS Microbiol. Rev. 24, 625−645.

Liles, M.R., Manske, B.F., Bintrim, S.B., Handelsman, J., Goodman, R.M. (2003) A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2684−2691.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4516–4522.

Lu, Y., Conrad, R. (2005) In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. Science. 309, 1088−1090.

Lu, Y., Rosencrantz, D., Liesack, W., Conrad, R. (2006) Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. Environ. Microbiol. 8, 1351−1360.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucl. Acids Res. 32, 1363−1371.

Luedemann, H., Arth, A., Liesack, W. (2000) Spatial Changes in the Bacterial Community Structure along a Vertical Oxygen Gradient in Flooded Paddy Soil Cores. Appl. Environ. Microbiol. 66, 754−762.

Lueders, T., Friedrich, M.W. (2000) Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2732−2742.

Lueders, T., Pommerenke, B., Friedrich, M.W. (2001) Molecular analyses of methyl-coenzyme M Reductase α-subunit (mcrA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. Environ. Microbiol. 3, 194−204.

Lueders, T., Pommerenke, B., Friedrich, M.W. (2004) Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5778−5786.

Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M.I., Chistoserdov, A.Y. (2001) Phylogenetic Diversity of Bacterial and Archaeal Communities in the Anoxic Zone of the Cariaco Basin. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1663−1674.

McHardy, A.C., Rigoutsos, I. (2007) What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. Curr. Op. Microbiol. 10, 499−503.

McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., Costerton, J.W. (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1029−1039.

Menke, M.A.O.H., Liesack , W., Stackebrandt, E. (1991) Ribotyping of 16S and 23S rRNA genes and organization of rrn operons in members of the bacterial genera *Gemmata, Planctomyces, Thermotoga, Thermus,* and *Verrucomicrobium.* Arch. Microbiol. 155, 263−271.

Minamikawa, K., Sakai, N., Yag, K. (2006) Methane Emission from Paddy Fields and its Mitigation Options on a Field Scale. Microbes and Environments. 21, 135−147.

Miskin, I.P., Farrimond, P.F., Head, I.M. (1999) Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. Microbiol. 145, 1977–1987.

Moreira, D., Rodríguez-Valera, F., López-García, P. (2006) Metagenomic analysis of mesopelagic Antarctic plankton reveals a novel deltaproteobacterial group. Microbiol. 152, 505-517.

Morris, R.M., Longnecker, K., Giovannoni, S.J. (2006) *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. Environ. Microbiol. 8, 1361−1370.

Musat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., van Beusekom, J.E., de Beer, D., Dubilier, N., Amann, R. (2006) Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. Syst. Appl. Microbiol. 29, 333−348.

Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez-Valín, F., Bernardi, G. (2004) Correlations between genomic GC levels and optimal growth temperatures in prokaryotes. FEBS Lett. 573, 73−77.

Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez-Valín, A., Bernardi, G. (2006) Genomic GC level, optimal growth temperature, and genome size in prokaryotes. Bioch. Biophys. Res. Commun. 347, 1–3.

Myllykallio, H., Lipowski, G., Leduc, D., Filee, J., Forterre, P., Liebl, U. (2002) An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. Science. 297, 105−107.

Myllykallio, H., Leduc, D., Filee, J., Liebl, U. (2003) Life without dihydrofolate reductase FolA. Trends Microbiol. 11, 220−223.

Naya, H., Romero, H., Zavala, A., Alvarez, B., Musto, H. (2002) Aerobiosis increases the genomic guanine plus cytosine content (GC%) in prokaryotes. J. Mol. Evol. 55, 260−264.

Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.-H. (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. Microbiol. 144, 3257−3266.

Nesbø, C., Boucher, Y., Dlutek, M., Doolittle, W.F. (2005) Lateral gene transfer and phylogenetic assignment of environmental fosmid clones. Environ. Microbiol. 7, 2011–2026.

Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., Liesack, W. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. Environ. Microbiol. 7, 382−395.

O'Farrell, K., Janssen, P.H. (1999) Detection of *Verrucomicrobia* in a Pasture Soil by PCR-Mediated Amplification of 16S rRNA Genes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4280−4284.

Olsen, G.J., Woese, C. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 7, 113−123.

Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science. 276, 734−740.

Padmanabhan, P., Shanker, R., Khanna, P. (1998) Short Communication: A method for extraction of DNA and PCR-based detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in soil contaminated with oil and grease. World J. Microbiol. Biotech. 14, 925−926.

Pátek, M., Krumbach, K., Eggeling, L., Sahm, H. (1994) Leucine Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Enzyme Activities, Structure of leuA, and Effect of leuA Inactivation on Lysine Synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 60, 133−140.

Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G.N., Médigue, C., Weissenbach, J., Le Paslier, D. (2008) "*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. J. Bacteriol. 190, 2572−2579.

Percent, S.F., Frischer, M.E., Vescio, P.A., Duffy, E.B., Milano, V., McLellan, M., Stevens, B.M., Boylen, C.W., Nierzwicki-Bauer, S.A. (2008) Bacterial community structure of acid-impacted lakes: what controls Diversity. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1856−1868.

Peng, J., Lu, Z., Rui, J, Lu, Y. (2008) Dynamics of the Methanogenic Archaeal Community during Plant Residue Decomposition in an Anoxic Rice Field Soil. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2894−2901.

Pfennig, N., Biebl, H. (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. Arch. Microbiol. 110, 3−12.

Pilhofer, M., Rappl, K., Eckl, C., Bauer, A.P., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Petroni, G. (2008) Characterization and Evolution of Cell Division and Cell Wall Synthesis Genes in the Bacterial Phyla *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes* and Phylogenetic Comparison with rRNA Genes. J. Bacteriol. 190, 3192–3202.

Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H.R., Tedesco, D., Jetten, M.S., Op den Camp, H.J. (2007) Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species. Nature. 450, 874−878.

Postgate, J.R., Campbell, L.L. (1966) Classification of *Desulfovibrio* species, the non-sporulating sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. Rev. 30, 732−738.

Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H.P., Kletzin, A., Treusch, A.H., Meurer, G., Eck, J., Sensen, C.W., Schleper, C. (2002) First insight into the genome of an uncultivated *Crenarchaeote* from soil. Environ. Microbiol. 4, 603−611.

Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S.C., Treusch, A.H., Eck, J., Schleper, C. (2003) *Acidobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. Mol. Microb. 50, 563−75.

Raes, J., Foerstner, K.U., Bork, P. (2007a) Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. Curr. Opin. Microbiol. 10, 490–498.

Raes, J., Korbel, J.O., Lercher, M.J., van Mering, C., Bork, P. (2007b) Prediction of effective genome size in metagenomic samples. Genome Biology. 8, R10.

Ramakrishnan, B., Lueders, T., Conrad, R., Friedrich, M.W. (2000) Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. 32, 261−270.

Rappe, M.S., Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. 57, 369−394.

Ricke, P. (2001) Untersuchungen zu Diversität und Abundanz der bakteriellen Entwicklungslinie Bacterial Rice Cluster 1 in geflutetem Reisfeldboden. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Lahn.

Ricke, P., Kube, M., Nakagawa, S., Erkel, C., Reinhardt, R., Liesack, W. (2005) First genome data from uncultured upland soil cluster alpha methanotrophs provide further evidence for a close phylogenetic relationship to *Methylocapsa acidiphila* B2 and for high-affinity methanotrophy involving particulate methane monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7472−7482.

Ricke, P., Kolb, S., Braker, G. (2005) Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel pmoA cluster in a forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1671−1673.

Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. Annu. Rev. Genet. 38, 525−552.

Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., Goodman, R.M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2541−2547.

Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P.H. (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. Environ. Microbiol. 4, 654−666.

Saikawa, N., Akiyama, Y., Ito, K. (2004) FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. J. Struct. Biol. 146, 123–129.

Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2007) Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4326−4331.

Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2008) *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 929−936.

Sanford, R.A., Cole, J.R., Tiedje, J.M. (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. Appl. Environ. Microbiol. 68, 893−900.

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M., Smith, S. (1977) Nucleotide sequence of ΦX174. Nature. 264, 687−697.

Sangwan, P., Kovac, S., Davis, K.E.R., Sait, M., Janssen, P.H. (2005) Detection and Cultivation of Soil *Verrucomicrobia*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8402−8410.

Scheid, D., Stubner, S., Conrad, R. (2004) Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. FEMS Microbiol. Ecol. 50, 101–110.

Schink, B. (1984) Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C_2 compounds. Arch. Microbiol. 137, 33−41.

Schink, B., Stieb, M. (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov.. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1905-1913.

Schink, B. (1997) Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 262−280.

Schink, B., Stams, A.J.M. (2006) Syntrophism among Prokaryotes. The Prokaryotes. (Hrsg. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E.), Springer Verlag, New York, Berlin: 2, 309–335.

Shigematsu, T., Era, S., Mizuno, Y., Ninomiya, K., Kamegawa, Y., Morimura, S., Kida, K. (2006) Microbial community of a mesophilic propionate-degrading methanogenic consortium in chemostat cultivation analyzed based on 16S rRNA and acetate kinase genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 401−415.

Schlesner, H., Jenkins, C., Staley, J.T. (2006) The Phylum *Verrucomicrobia*: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group. The Prokaryotes. (Hrsg. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E.), Springer Verlag, New York, Berlin: 7, 881–896.

Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., Wagner, M. (2001) 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. Environ. Microbiol. 3, 450−459.

Schütz, H., Seiler, W., Conrad, R. (1990) Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. Biogeochem. 11, 77−95.

Sousa, D.Z., Smidt, H., Alves, M.M., Stams, A.J. (2007) *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 609−615.

Springer, E., **Sachs, M.S.**, **Woese, C.R.**, **Boone, D.R**. (1995) Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 554−559.

Stamatakis, A., Ludwig, T., Meier, H. (2005) RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. Bioinformatics. 21, 456–463.

Stams, A.J., de Bok, F.A., Plugge, C.M., van Eekert, M.H., Dolfing, J., Schraa, G. (2006) Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. Environ. Microbiol. 8, 371−382.

Streit, W.R., Schmitz, R.A. (2004) Metagenomics-the key to the uncultured microbes. Curr. Opin. Microbiol. 7, 492−498.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Médigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H.J., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Wagner, M., Le Paslier, D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature. 440, 790−794.

Tang, Y.Q., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K. (2007) Effect of dilution rate on the microbial structure of a mesophilic butyrate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. Appl. Microbiol. Biotechol. 75, 451−465.

Thummes, K., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2007) Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material. Syst. Appl. Microbiol. 30, 418–429.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Øvreås, L. (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J. Biotechnol. 64, 53−62.

Torsvik, V., Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5, 240–245.

Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.T. (2002) Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. Science. 296, 1064−1066.

Toyama, H., Mathews, S., Adachi, O., Matsushita, K. (2004) Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. Arch. Biochem. Biophys. 428, 10–21.

Traore, A.S., Fardeau, M.L., Hatchikian, C.E., Le Gall, J., Belaich, J.P. (1983) Energetics of Growth of a Defined Mixed Culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Interspecies Hydrogen Transfer in Batch and Continuous Cultures. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1152−1156.

Tringe, S.G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C., Bork, P., Hugenholtz, P., Rubin, E.M. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. Science. 308, 554−557.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V. V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature. 428, 37−43.

Vandieken, V., Mussmann, M., Niemann, H., Jørgensen, B.B. (2006) *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe (III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1133−1139.

Vergin, K.L., Urbach, E., Stein, J.L., DeLong, E.F., Lanoil, B.D., Giovannoni, S.J. (1998) Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3075−3078.

Vetting, M.W., de Carvalho, L.P.S., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., Blanchard, J.S. (2005) Structure and functions of the GNAT Superfamily of Acetyltransferases. Arch. Biochem. Biophys. 433, 212−226.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science. 304, 66−74.

Wadhams, G.H., Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 5, 1024−1037.

Wagner, M., Horn, M. (2006) The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. Curr. Opin. Biotechnol. 17, 241–249.

Wang, J., Jenkins, C., Webb, R.I., Fuerst, J.A. (2002) Isolation of *Gemmata*-like and *Isosphaera*-like *Planctomycete* bacteria from soil and freshwater. Appl. Environ. Microbiol. 68, 417−422.

Ward, N.L., Rainey, F.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Ludwig, W., Stackebrandt, E. (2000) Comparative phylogenetic analyses of members of the order *Planctomycetales* and the division *Verrucomicrobia*: 23S rRNA gene sequence analysis supports the 16S rRNA gene sequence-derived phylogeny. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1965–1972.

Ward, N., Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni S., Schlesner, H., Stackebrandt, E. (2006) The Order *Planctomycetales*, Including the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus Genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua.* The Prokaryotes. (Hrsg. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E.), Springer Verlag, New York, Berlin: 7, 757–793.

Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernández, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P., Leadbetter, J.R. (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature. 450, 560−565.

Waßmann, R., Rennenberg, H. (1996) Die Methanemission aus Reisfeldern. Biologie in unserer Zeit. 26, 272−281.

Weber, S., Stubner, S., Conrad, R. (2001) Bacterial Populations Colonizing and Degrading Rice Straw in Anoxic Paddy Soil. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1318–1327.

Weissbach, H., Resnick, L., Brot, N. (2005) Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. Biochim. Biophys. Acta. 1703, 203−212.

West, A.H., Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. Trends Biochem. Sci. 26, 369−375.

Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-negative mesophile sulfat-reducing bacteria. In: The Prokaryotes. (Hrsg. Balows A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer), Springer Verlag, New York, Berlin: 3352−3378.

Woebken, D., Teeling, H., Wecker, P., Dumitriu, A., Kostadinov, I., DeLong, E.F., Amann, R., Gloeckner, F.O. (2007) Fosmids of novel marine *Planctomycetes* from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with *Planctomycete* genomes. ISME J. 1, 419–435.

Woese, C.R., Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5088−5090.

Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221−271.

Woese, C.R., Kandler, O. Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87, 4576−4579.

Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F.O., Boffelli, D., Anderson, I.J., Barry, K.W., Shapiro, H.J., Szeto, E., Kyrpides, N.C., Mussmann, M., Amann, R., Bergin, C., Ruehland, C., Rubin, E.M., Dubilier, N. (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. Nature. 443, 950−955.

Wu, X.-L., Friedrich, M.W., Conrad, R. (2006) Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils. Environ. Microbiol. 8, 394−404.

Yoon, J., Yasumoto-Hirose, M., Matsuo, Y., Nozawa, M., Matsuda, S., Kasai, H., Yokota, A. (2007) *Pelagicoccus mobilis* gen. nov., sp. nov., *Pelagicoccus albus* sp. nov. and *Pelagicoccus litoralis* sp. nov., three novel members of subdivision 4 within the phylum '*Verrucomicrobia*', isolated from seawater by in situ cultivation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1377−1385.

Yoon, J., Matsuo, Y., Adachi, K., Nozawa, M., Matsuda, S., Kasai, H., Yokota, A. (2008) Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohnpeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum '*Verrucomicrobia*', and emended descriptions of the class *Verrucomicrobiae*, the order *Verrucomicrobiales* and the family *Verrucomicrobiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 998−1007.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Werner Liesack für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel danke ich für die Begutachtung der Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn Prof. Dr. Paul Galland möchte ich mich für die Bereitstellung als Prüfer meiner Disputation bedanken.

Der gesamten Abteilung danke ich für das Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft, besonders Melanie Klose für die Einführung in die analytische Welt und Mohamed Baani für die Diskussion über die Wissenschaft und darüber hinaus sowie das Korrigieren meiner Arbeit. Christoph Erkel möchte ich für die Zusammenarbeit auf den ersten Metern danken. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner Adoptivarbeitsgruppe, die mich nicht nur in wissenschaftlichen Belangen unterstützten, sondern mein Marburger Leben sehr bereicherten. Die Ehemaligen und der harte Kern. Ohne die wissenschaftliche Beratung, die gute Laune und die Herzlichkeit von Bianka Pommerenke wären die Pausen zwischendurch und mache Abende nur halb so schön gewesen. Alexandra Müller ist dabei besonders hervorzuheben. Danke für die wunderbare Freundschaft in den letzten drei Jahren, für die Ablenkungsmanöver von der Wissenschaft, den unermüdlichen Optimismus, die Fröhlichkeit und für das bedingungslose Korrekturlesen.

Viktoria Ortner für die langjährige Freundschaft auch über die Grenzen hinweg. Lydia Schubert für die sehr gute Nachbarschaft in der Anfangszeit und noch mehr! Den dazu gewonnenen Stiegkern für die liebevolle Aufnahme und die Hilfe in allen Lebenslagen. Vor allem aber gilt mein besonderer Dank an Gunter für die Unterstützung, die Ablenkung, den Beistand und vor allem für die neue Heimat!

Meinen Eltern danke ich ganz lieb für die liebevollen, aufmunternden, unermüdlichen Gespräche aus der Ferne, die manchmal für ein rotes Ohr sorgten, die finanzielle Unterstützung und besonders den Glaube an mich. Ohne Euch wäre ich nicht zu dem geworden, was ich jetzt bin!

Lebenslauf

Jana Glöckner
Geburtsdatum: 10.03.1981
Geburtsort: Freiberg/Sachsen
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1987- 1989	Polytechnische Oberschule Zug
1989- 1990	Oberschule Wilhelm Pieck, Brand-Erbisdorf
1990- 1992	3. Oberschule Brand-Erbisdorf
1992- 1999	Bernhard- von- Cotta- Gymnasium- Brand-Erbisdorf Allgemeine Hochschulreife

Studium

WS 1999	Studium der Angewandten Naturwissenschaft (Diplom), TU Bergakademie Freiberg
SS 2003 / SS 2004	Studium der Biologie an der Universität Wien
WS 2004 / SS 2005	Diplomarbeit am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien unter der Leitung von PD Dr. Hans-Jürgen Busse, Thema „Untersuchungen zur Beschreibung einer neuen Art aus dem *Bradyrhizobium*-Verwandtschaftskreis".
Juli 2005	Abschluss des Studiums als Diplom-Naturwissenschaftler

Dissertation

2005-2008	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter der Anleitung von PD Dr. Werner Liesack.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Metagenom-Analyse zum PVC-Superphylum im anoxischen Reisfeldboden“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 11.08.2008