Identifizierung eisenreduzierender Mikroorganismen in anoxischem Reisfeldboden mit Hilfe stabiler Isotope

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alexandra Müller
aus Lich

Marburg/Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2005 bis April 2009 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von Professor Dr. Michael W. Friedrich durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael W. Friedrich
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der Disputation:

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgender Originalpublikation zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Hori, T., Müller, A., Igarashi, Y., Conrad, R. und Friedrich, M.W. (eingereicht) Identification of ferrihydrite- and goethite- reducing microorganisms in anoxic paddy soil by ^{13}C-acetate probing. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *ISME Journal*.

Die Arbeiten zu folgenden Manuskripten waren bei Erstellung dieser Schrift noch nicht vollständig abgeschlossen und werden daher als Entwürfe präsentiert:

2. **Müller, A. und Friedrich, M.W.** Distinct Fe(III) oxide mineral phases select for individual iron-reducing mibrobial populations in anoxic rice field soil. Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

3. **Müller, A., Fuhr, M.K., Pommerenke B. und Friedrich, M.W.** Identification of lactate-utilizing populations under iron-reducing conditions in rice field soil by stable isotope probing. Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... ***I***

Abkürzungsverzeichnis ..... ***IV***

Zusammenfassung ..... ***V***

I. Einleitung ***1***

1. Ökosystem Reisfeld 1

2. Eisen 4

2.1 Eisenmineralien und deren Bedeutung im Eisenkreislauf 4

2.2 Mikrobielle Eisenreduktion 5

2.3 Phylogenie eisenreduzierender Mikroorganismen 7

3. Eisenzyklus am natürlichen Standort 10

4. Verwendung von stabilen Isotopen in der mikrobiellen Ökologie 13

5. Zielsetzung und methodischer Ansatz 15

II. Material und Methoden ***17***

1. Chemikalien und Gase 17

2. Sterilisationsverfahren 17

3. Probenmaterial und Inkubationsbedingungen 17

4. Eisen(III)-Oxide 20

4.1 2-line Ferrihydrit 20

4.2 Lepidokrokit 21

4.3 Hämatit 21

4.4 Goethit 23

5. Chemische und physikalische Analysen 23

5.1 Analyse von Methan und Kohlendioxid (Gaschromatographie) 24

5.2 Analyse von stabilen Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen 25

5.3 Analyse organischer Säuren (HPLC) 26

5.4 Analyse anorganischer Ionen (Ionenchromatographie) 27

5.5 Kolorimetrische Bestimmung von Eisen(II) und Gesamteisen 28

5.5.1 Bestimmung von Eisen(II) 28

5.5.2 Bestimmung von Gesamteisen und Eisen(III) 29

5.5.3 Berechnung der Eisenkonzentration 29

6. Molekularbiologische Analysen 30
6.1 Extraktion der Nukleinsäuren 30
6.2 DNase Verdau 31
6.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren 32
6.3.1 Photometrische Quantifizierung 32
6.3.2 Fluorimetrische Quantifizierung von RNA 32
6.4 Isopyknische Auftrennung der RNA 33
6.5 PCR-Amplifikation 34
6.5.1 PCR-Amplifikation domänenspezifischer 16S rDNA aus Umweltproben und Klonierungsvektoren 35
6.5.2 RT-PCR bakterieller und archaeeller 16S rRNA aus Umweltproben 36
6.6 T-RFLP-Analyse 36
6.7 Erstellung von 16S rRNA-Klonbibliotheken 38
6.8 Sequenzanalyse 38
7. Bioinformatische Analysen 39
7.1 Sequenzverarbeitung 39
7.2 Phylogenetische Analyse von 16S rRNA-Genen 40
7.3 Identifizierung von chimären Sequenzen 41
8. Berechnung ökologischer Indizes 41
8.1 Ähnlichkeit und Diversität mikrobieller Gemeinschaften 41
8.2 Abschätzung des Artenreichtums 42
III. Ergebnisse 44
1. Identifizierung von Ferrihydrit- und Goethit-reduzierenden Mikroorganismen in anoxischem Reisfeldboden mittels ^{13}C-Acetat Beprobung 45
2. Unterschiedliche Eisen(III)-Oxid-Phasen selektieren auf individuelle eisenreduzierende bakterielle Populationen in anoxischem Reisfeldboden 69
3. Identifizierung von ^{13}C-Lactat-verwertenden Populationen unter eisenreduzierenden Bedingungen in Reisfeldboden mittels RNA-basierender Stabiler Isotopenbeprobung 105
IV. Zusammenfassende Diskussion 136
1. Diversität und Struktur eisenreduzierender Mikroorganismen 136
2. Einfluss der Eisen(III)-Oxide auf die mikrobielle Reduktion 141
3. Methanogenese und Eisenreduktion 143

4. Ausblick 145
V. Literaturverzeichnis 147
Danksagung 160
Lebenslauf 161
Erklärung 162

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BET-Methode	Brunauer, Emmett und Teller (Methode zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Eisenoxiden)
BSA	Rinderserumalbumin („*bovine serum albumine*")
CsTFA	Cäsiumtrifluoracetat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure
FAM	6´-Carboxyfluorescein
g	Erdbeschleunigung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
MPN	„*Most probable number*"
OTU	Operative taxonomische Einheit („*operational taxonomic unit*")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLFA	Phospholipid-Fettsäuren („*Phospholipid fatty acids*")
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SIP	Stabile Isotopenbeprobung („*Stable isotope probing*")
TG	Trockengewicht
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
U	Einheit („*unit*")
v/v	Volumen pro Volumen („*volume per volume*")
w/v	Gewicht pro Volumen („*weight per volume*")
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indoyl-β-galactopyranosid

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for authors" des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten erlangte die Eisenreduktion als ein wichtiger mikrobieller Prozess und die daran beteiligten Mikroorganismen zunehmend an Bedeutung. In vielen anoxischen Habitaten ist Fe(III) der am häufigsten vorkommende natürliche Elektronenakzeptor. So auch in geflutetem Reisfeldboden, wo die dissimilatorische Eisenreduktion neben der Methanogenese den wichtigsten anaeroben respiratorischen Prozess darstellt. Über die Diversität der mikrobiellen Populationen, die ihre Energiegewinnung an die Reduktion von Fe(III) koppeln, ist bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde erstmals mittels biogeochemischer und molekularbiologischer Methoden die mikrobielle Eisenreduktion in geflutetem Reisfeldboden in Anwesenheit von verschiedenen Eisen(III)-Oxiden (Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit und Hämatit) und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen ($^{13}C_2$-Acetat und $^{13}C_3$-Lactat) untersucht. Die Anwendung der Stabilen Isotopenbeprobung ermöglichte dabei die Verknüpfung von Funktion und phylogenetischer Einordnung der metabolisch aktiven Mikroorganismen und erlaubte die Identifizierung von bekannten und neuartigen eisenreduzierenden Mikroorganismen als funktionelle Gilde im Reisfeldboden ohne ihre vorherige Kultivierung.

Die Zugabe von Acetat als ein zentrales Intermediat im anaeroben Stoffwechsel führte unter eisenreduzierenden Bedingungen zur Detektion von bakteriellen Populationen, die bekannten *Geobacter* und *Anaeromyxobacter* spp. (δ-*Proteobacteria*) zugeordnet werden konnten. In Anwesenheit von Goethit zeigten diese beiden Cluster sogar eine vergleichbare Abundanz, was auf die Ausbildung von unterschiedlichen ökologischen Nischen innerhalb des Ökosystems hinweist. Die detektierten neuartigen Bakterien-Cluster sind phylogenetisch in den Familien der *Clostridiaceae* und *Paenibacillaceae* (*Firmicutes*) angesiedelt, wurden bislang jedoch nicht mit der dissimilatorischen Eisenreduktion in Verbindung gebracht. Ob diese Populationen Lactat oder die daraus resultierenden Abbauprodukte Acetat und Propionat metabolisieren, ist anhand der Ergebnisse nicht ersichtlich. Auch in den mitgeführten Kontrollen (ohne Zugabe von Eisen[III]-Oxiden) wurde der Einbau des stabilen Kohlenstoffisotops (^{13}C) nachgewiesen. Die Analyse der 16S rRNA zeigte, dass es zu einer starken Aktivierung von Vertretern der *Rhodocyclaceae* (β-*Proteobacteria*) kam. Die beobachtete Aktivität dieser Population in

den Ansätzen mit Goethit und Hämatit stützt die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass diese bisher nicht kultivierten *Rhodocyclaceae* an der Reduktion von Eisen(III)-Oxiden mit geringer Bioverfügbarkeit beteiligt sein könnten.

Neben der Identifizierung der dissimilatorisch eisenreduzierenden Mikroorganismen unter diversen physiologischen Bedingungen, wurde der Einfluss charakteristischer Eigenschaften (z.B. Kristallinität, Oberflächen- und Partikelgröße) der Eisen(III)-Oxide auf die mikrobielle Reduzierbarkeit untersucht. Die Zugabe der verschiedenen Eisen(III)-Oxide resultierte in einem selektiven Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft der Eisenreduzierer in geflutetem Reisfeldboden. Es wurden nicht nur Eisen(III)-Oxid-spezifische und phylogenetisch diverse Populationen angereichert, sondern es zeigten sogar einige Spezies desselben Genus (*Geobacter*) eine Spezialisierung auf bestimmte Eisen(III)-Oxide mit unterschiedlichem Redoxpotential. Diese Beobachtung weist auf eine hohe funktionelle Diversität innerhalb dieser phylogenetisch, auf Ebene der 16S rRNA-Gene sehr ähnlichen Gruppe von Mikroorganismen hin und bietet somit einen interessanten Ansatzpunkt für vergleichende Analysen auf Genombasis.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Diversität eisenreduzierender Mikroorganismen im natürlichen Habitat weitaus größer ist als bisher angenommen. Neben dem zur Verfügung stehenden Elektronendonor hat die Eisen(III)-Oxid-Phase einen maßgeblichen Einfluss auf die metabolisch aktive mikrobielle Gemeinschaft. Die Identifizierung der eisenreduzierenden Mikroorgansmen als funktionelle Gilde leistet außerdem einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Eisenreduktion und der daran gekoppelten Prozesse im Modellsystem Reisfeldboden.

I. Einleitung

1. Ökosystem Reisfeld

Reis ist eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel der Bevölkerung und wird weltweit auf einer Fläche von 145 Millionen ha angebaut, wovon 73 Millionen ha auf geflutete Reisfelder entfallen (Minami und Neue, 1994; Neue, 1997). Im Gegensatz zu anderen landwirtschaftlichen Nutzungsformen ist der Reisanbau durch einen hohen Anteil von zeitweise oder permanent gefluteten Feldern gekennzeichnet. Je nach Bewässerungsform wird zwischen vier Kategorien von Reisökosystemen unterschieden: Kontrolliert gefluteter- (51% der globalen Anbaufläche; *irrigated rice*), regenbewässerter- (27%; *rain-fed rice*), Tiefwasser- (10%; *deepwater rice*) und Hochland-Reisanbau (11%; *upland rice*) (Minamikawa *et al*., 2006; Neue, 1993; Wassmann und Rennenberg, 1996). Die Bewässerungsform stellt einen wesentlichen Faktor für die Emission des bedeutenden Treibhausgases Methan aus Reisfeldern dar, wobei die jährliche Methanemission auf ca. 25–60 Millionen t geschätzt wird (IPCC, 2001). Die aktuelle atmosphärische Konzentration von Methan liegt bei 1774 ppb und ist seit Beginn der Industrialisierung um ca. 150% angestiegen (IPCC, 2007). Zu den bedeutendsten biogenen Methanquellen zählen natürliche Feuchtgebiete (Sümpfe, Moore, Tundren), Verdauungstrakte von Tieren (Termiten, Wiederkäuer) und Methanhydrate. Als antrophogene Quellen für atmosphärisches Methan sind vor allem der Reisanbau, die Viehhaltung (Wiederkäuer), die Nutzung fossiler Brennstoffe, Kläranlagen, Mülldeponien und die Verbrennung von Biomasse zu nennen (IPCC, 2001). Neben dieser globalen Relevanz werden Reisfelder als wichtige Modellsysteme zur Untersuchung der mikrobiellen Ökologie der anaeroben Nahrungskette in terrestrischen Habitaten verwendet. Dabei sind die Komplexität der vorhandenen Lebensräume und die damit verbundene funktionelle Diversität von Mikroorganismen von zentraler Bedeutung und Interesse. Geflutete Reisfelder können aufgrund von zyklisch wechselnden physikochemischen Bedingungen (trocken/geflutet, oxisch/anoxisch) in distinkte mikrobielle Habitate unterteilt werden (Abb. 1): Oxische Boden-Wasser-Übergangszone, oxisch/anoxische Rhizosphäre und anoxischer nicht durchwurzelter Boden. Innerhalb dieser Kompartimente kommt es zur Ausbildung von chemischen Gradienten, die Rückschlüsse auf die Aktivität und Verteilung

unterschiedlicher physiologischer Gruppen von Mikroorganismen erlauben (Liesack *et al.*, 2000).

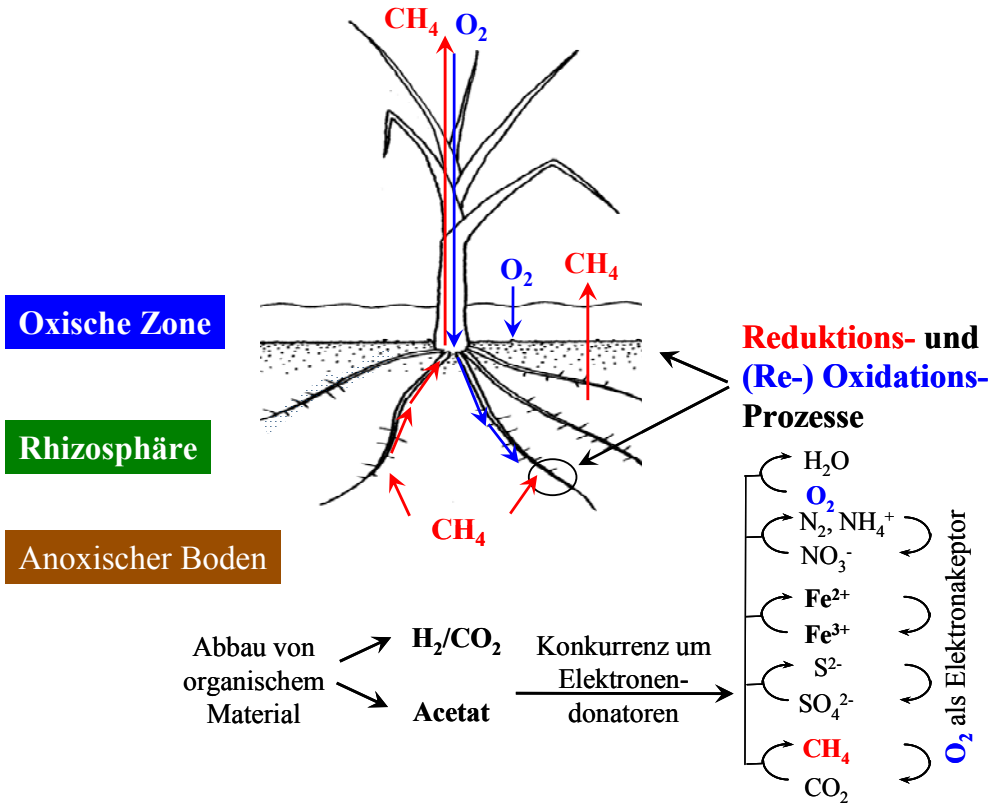


Abbildung 1: Anaerober Abbau von organischem Material in distinkten mikrobiellen Habitaten des gefluteten Reisfeldbodens sowie daran gekoppelte Reduktions- und (Re-) Oxidations-Prozesse. Modifiziert nach P. Frenzel, Marburg (nicht publiziert).

Die Flutung der Reisfelder führt zu einem schnellen Verbrauch des Sauerstoffs durch aerobe Mikroorganismen und chemische Oxidationsreaktionen, wodurch sich schnell anoxische Bedingungen einstellen (Conrad, 1993). Der anaerobe Abbau des organischen Materials erfolgt in mehreren Schritten durch die Interaktion einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft (Chin *et al.*, 1998; Schink, 1997). Zunächst werden organische Polymere (z.B. Cellulose, Lignin, Xylan, Pektin, Proteine) durch extrazelluläre Enzyme zu Monomeren (Monosaccharide, Aminosäuren) hydrolysiert. Diese Zwischenprodukte werden durch fermentierende Mikroorganismen (primäre Gärer) zu organischen Säuren, Alkoholen, H_2 und CO_2 vergoren. In Anwesenheit von Elektronenakzeptoren wie NO_3^-, Fe^{3+} und SO_4^{2-} werden die Substrate komplett zu CO_2 veratmet. Sind diese limitierend,

setzten syntrophe Mikroorganismen (sekundäre Gärer) die organischen Säuren und Alkohole zu Acetat, H_2 und CO_2 um. Alternativ kann Acetat auch aus H_2/CO_2, Zuckern und anderen Abbauprodukten durch homoacetogene Bakterien gebildet werden. Im letzten Schritt verwenden acetoklastische bzw. hydrogenotrophe methanogene *Archaea* Acetat, H_2 und CO_2 zur Bildung des Endprodukts Methan (Zinder, 1993). Dieses entweicht über Diffusion oder durch das Aerenchym der Reispflanze in die Atmosphäre, wenn es nicht an der oxisch/anoxischen Übergangszone sowie innerhalb der Rhizosphäre von methanotrophen Mikroorganismen zu CO_2 und Wasser reoxidiert wird (Brune *et al*., 2000; Wassmann und Aulakh, 2000).

Im Reisfeldboden bestimmt die Verfügbarkeit der Elektronenakzeptoren die Aktivität und die Konkurrenz der mikrobiellen Gemeinschaft um die gemeinsamen Elektronendonoren (Abb. 1). Dabei stellen vor allem Acetat, Propionat, CO_2 und H_2 wichtige Intermediate des anaeroben Abbaus dar. Unter Substrat-limitierenden Bedingungen findet eine sequentielle Reduktion der verfügbaren Elektronenakzeptoren ($O_2 > NO_3^- > Mn^{4+} > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2$) statt, wobei Elektronenakzeptoren mit einem höheren Redoxpotential bevorzugt reduziert werden (Ponnamperuma, 1972; Zehnder und Stumm, 1988). In oxisch/anoxischen Bereichen können die alternativen Elektronenakzeptoren wieder regeneriert werden (Liesack *et al*., 2000). Mit Hilfe von Kultivierungsmethoden und molekularen Analysen konnte gezeigt werden, dass neben der Gattung *Clostridium*, auch Organismen der *CFB*- (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodetes*) Gruppe, der *Bacillaceae*, *Chlorobiaceae* und der Phyla *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* beim Abbau des organischen Materials eine entscheidende Rolle spielen (Akasaka *et al*., 2003; Chin *et al*., 1998; Chin *et al*., 1999; Hengstmann *et al*., 1999; Krylova *et al*., 1997; Lüdemann *et al*., 2000; Noll *et al*., 2005; Scheid *et al*., 2004; Weber *et al*., 2001). Neben der Methanogenese ist die Reduktion von Eisen der wichtigste Redox-Prozess in gefluteten Reisfeldböden (Conrad und Frenzel, 2002). Eisen(III)-Oxide stellen daher wesentliche Elektronenakzeptoren im Reisfeldboden dar. Diese wichtige Bedeutung in natürlichen Habitaten spiegelt sich auch in der Vermutung wider, dass die mikrobielle Eisenreduktion der erste Atmungsprozess auf der Erde war (Lovley *et al*., 2004; Lovley, 2004; Vargas *et al*., 1998).

2. Eisen

2.1 Eisenmineralien und deren Bedeutung im Eisenkreislauf

Eisen ist nach Sauerstoff, Silizium und Aluminium mit 5,1% das vierthäufigste Element der Erdkruste und ubiquitär in der Hydrosphäre, Lithosphäre, Biosphäre und Atmosphäre als Fe(II)- und Fe(III)-Mineral oder als gelöste Ionen vorhanden (Schwertmann und Cornell, 2000). Es ist ein sehr reaktionsfreudiges Element und kommt auf der Erde natürlich, mit Ausnahme von Meteoriten, nicht elementar vor. Eisen bildet Minerale mit Sauerstoff, Silikaten [z.B. Olivin, $(MgFe)_2SiO_4$], Sulfiden [z.B. Pyrit, (FeS_2)], Karbonaten [z.B. Siderit, $(FeCO_3)$] und Phosphat [z.B. Vivanit, $Fe_3(PO_4)_2$] und liegt, mit Ausnahme von Sauerstoff, als Fe(II) gebunden vor. In den Eisenoxiden, -hydroxiden und –oxo-hydroxiden kommt das Eisen hauptsächlich als Fe(III) vor. In Fe(II)-Fe(III)-Mineralien, wie z.B. Magnetit liegt das Eisen in beiden Formen vor.

Die strukturelle Einheit der Eisenoxide, -hydroxide und -oxohydroxide ist das Oktaeder. In diesem ist jedes Eisenatom von sechs Sauerstoffionen oder Sauerstoff- und Hydroxidionen umgeben. Die verschiedenen Eisenoxide unterscheiden sich hauptsächlich in der Anordnung der Oktaeder. Die Sauerstoff- und Hydroxidionen bilden Schichten, die entweder hexagonal dicht gepackt (α-Phase) oder kubisch dicht gepackt (γ-Phase) vorliegen. Das Eisenatom kann durch Metallionen gleicher Größe, wie z.B. Al^{3+}, Mn^{3+} und Cr^{3+} ersetzt werden. Eine Substituierung mit Aluminium wird am häufigsten bei Goethit beobachtet (Cornell und Schwertmann, 2003), während Ferrihydrit bis zu 9% Silizium enthalten kann (Childs, 1992).

Von den sechzehn bekannten Eisenoxiden, zu denen auch die Eisenhydroxide und –oxo-hydroxide gezählt werden, kommen Ferrihydrit ($Fe_5HO_8 \times 4\ H_2O$), Lepidokrokit (γ-FeOOH), Goethit (α-FeOOH), Hämatit (α-Fe_2O_3), Akaganeit (β-FeOOH) und Magnetit (Fe_3O_4) am häufigsten in der Natur vor. Eisenoxide entstehen primär durch oxidierende Verwitterungsprozesse von vulkanischen Gesteinen, in denen das Eisen hauptsächlich in Form von Silikaten vorliegt. Die einzelnen Eisenoxide können aber auch durch Oxidation von gelösten Fe^{2+}-Ionen bzw. Fe(II)-Mineralien oder durch Umformungsprozesse ineinander entstehen (Hansel *et al.*, 2005). Der gelbbraune Goethit ist nahezu in allen Böden zu finden, während das rote Hämatit vorwiegend in Böden mit höheren Bodentemperaturen und niedrigerem Wassergehalt vorkommt. Der orange Lepidokrokit ist dagegen weniger verbreitet und tritt häufig in hydromorphen Böden (z.B. Reisfelder)

auf. Unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen kommt es hier zur Akkumulation von Fe^{2+}, das dann in der oxischen Zone zu Lepidokrokit oxidiert wird. Das rotbraune Ferrihydrit ist auch bevorzugt dort zu finden, wo Fe^{2+} schnell durch Sauerstoff oxidiert wird und/oder in Anwesenheit von Kristallisations-Inhibitoren. Aufgrund dessen ist Ferrihydrit amorph, hat eine geringe Partikelgröße und eine damit verbundene große Oberfläche (Schwertmann und Cornell, 2000). Ferrihydrit kann in Form von Ferritin bzw. Bacterioferritin als Eisenspeicher-Protein in vielen Organismen dienen. Außerdem wird es wahrscheinlich als Vorstufe für die Bildung von Hämatit verwendet und kann sich aufgrund der Instabilität in Goethit umwandeln. Viele Sedimente und Böden enthalten Fe(III)-Mineralien in Konzentrationen von 50–200 mmol pro kg Trockengewicht (Kappler und Straub, 2005). Allerdings sind diese bei neutralem pH nur schwer löslich, weshalb die Konzentration der frei in Lösung vorliegenden Fe^{3+}-Ionen nur bei 10^{-9} M liegt (Chipperfield und Ratledge, 2000). Der Eisenzyklus hat einen signifikanten Einfluss auf die biogeochemischen Prozesse in vielen Habitaten. Studien in marinen Sedimenten mit Bioturbation zeigten, dass ein Fe(III)-Molekül 100–300 Mal recycelt werden kann, bevor es im Sediment abgelagert wird (Canfield *et al*., 1993). Die damit verbundenen Reaktionen, wie z.B. Reduktion, Oxidation und Präzipitation, können dabei auf chemischem Wege oder durch mikrobielle Prozesse erfolgen (Kappler und Straub, 2005). Mikroorganismen katalysieren die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) bei neutralem pH unter oxischen Bedingungen mit O_2 als Elektronenakzeptor. Unter anoxischen Bedingungen können sie NO_3^- (Benz *et al*., 1998; Straub *et al*., 1996) oder in Anwesenheit von Licht CO_2 (Ehrenreich und Widdel, 1994; Widdel *et al*., 1993) als Elektronenakzeptor nutzen. Außerdem sind Mikroorganismen in der Lage, das Fe(III) der Eisenoxide zu Fe(II) zu reduzieren. Dabei ist die Form, in der das Fe(III)-Molekül im Habitat vorliegt, im Eisenzyklus von besonderer Bedeutung. Für die mikrobielle Reduzierbarkeit der Eisenoxide spielt die Kristallinität (Munch und Ottow, 1980; Phillips *et al*., 1993), die Partikelgröße sowie die damit verbundene Oberflächengröße (Lovley, 1987; Roden und Zachara, 1996; Zachara *et al*., 1998) eine entscheidende Rolle.

2.2 Mikrobielle Eisenreduktion

Eisen ist das mengenmäßig wichtigste Spurenelement und mit Ausnahme von einigen homofermentativen Milchsäurebakterien der Gattung *Streptococcus* für alle Lebewesen

essentiell (Ehrlich, 2002). Die mikrobielle Eisenreduktion kann im assimilatorischen und im dissimilatorischen Stoffwechsel vorkommen. Bei der assimilatorischen Eisenreduktion wird Fe(II) überwiegend für den Aufbau von wichtigen Enzymen verwendet, die z.B. an der Übertragung von Elektronen beteiligt sind (Cytochrome, Eisen-Schwefel-Proteine) oder Reaktionen mit Sauerstoff katalysieren (Katalasen, Peroxidasen). Außerdem ist Fe(II) bei dem Transport von Sauerstoff (Hämoglobin, Myoglobin) von großer Bedeutung (Drechsel und Winkelmann, 1997). In der Natur liegt Eisen oft in Form von schwer löslichen Eisen(III)-Oxiden vor, weshalb Mikroorganismen Chelatoren, so genannte Siderophoren, entwickelt haben. Dies sind Eisen-bindende Moleküle, die von den Bakterien ausgeschieden werden und das Fe(III) aus den Eisen(III)-Oxiden komplexieren. Anschließend werden die beladenen Siderophoren aktiv über spezielle energieverbrauchende Transportsysteme in die Bakterienzelle aufgenommen. In der Zelle wird Fe(III) dann entweder durch den enzymatischen Abbau der Siderophore (Enterobactin) oder durch die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) (Ferrichrome) freigesetzt. Da die assimilatorische Eisenreduktion ein energieverbrauchender Prozess und frei verfügbares Eisen toxisch für die Zelle ist, unterliegt die Fe-Aufnahme einer strengen Genregulation (Fuchs, 2006).

Im dissimilatorischen Stoffwechsel werden in Bezug auf die Energiegewinnung prinzipiell zwei Formen der Eisenreduktion unterschieden (Lovely, 2006). Bei einigen obligat und fakultativ fermentativen Bakterien, z.B. Arten der Gattungen *Clostridium*, *Escherichia*, *Bacillus* und *Pseudomonas*, ist die Reduktion von Fe(III) nicht direkt an die Energiegewinnung gekoppelt und dient wahrscheinlich als potentielle Elektronensenke (Lovely, 2006; Lovley, 1991). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass fermentative Bakterien weniger als 5% der Reduktionsäquivalente der metabolisierten Substrate auf Fe(III) übertragen (Jones *et al*., 1984; Lovley, 1991). Bei der zweiten Form sind die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) und die gleichzeitige Oxidation von organischen oder anorganischen Elektronendonoren an die Energiegewinnung gekoppelt (Lovley *et al*., 2004).

Bisher wurden drei Mechanismen beschrieben, die Fe(III)-reduzierende Mikroorganismen für den Transfer von Elektronen auf die schwer löslichen Eisen(III)-Oxiden anwenden: (i) Direkter physikalischer Kontakt, (ii) Eisen-Chelatoren und (iii) „Elektronen-Shuttle“. Der direkte Kontakt mit Eisen(III)-Oxiden ist für Arten der Gattung *Geobacter* (z.B. *G. metallireducens*) eine wesentliche Vorraussetzung für die dissimilatorsiche Eisenreduktion

(Lovley *et al*., 2004; Nevin und Lovley, 2000b). *Geobacter metallireducens* produziert bei Wachstum auf schwer löslichen Eisen(III)-Oxiden Flagellen und Pili, die eine chemotaktische Bewegung ermöglichen und wahrscheinlich der Anheftung an die Oberfläche dienen (Childers *et al*., 2002). In *Geobacter sulfurreducens* konnte außerdem gezeigt werden, dass Pili als biologische „*Nanowires*" fungieren und wahrscheinlich die Elektronen auf die Oberfläche der Eisen(III)-Oxide transferieren (Reguera *et al*., 2005). *Shewanella* spp. und *Geothrix fermentas* benötigen keinen direkten Kontakt für die Eisenreduktion. Sie verwenden Eisen-Chelatoren oder „Eisen-Shuttle-Moleküle" (z.B. Quinone, Huminsäuren, Pflanzenexudate, Antibiotika), die von diesen eisenreduzierenden Mikroorganismen entweder selbst synthetisiert werden oder in den entsprechenden Habitaten schon vorhanden sind (Hernandez *et al*., 2004; Lovley *et al*., 1999; Nevin und Lovley, 2000a; Nevin und Lovley, 2002a; Nevin und Lovley, 2002b; Newman und Kolter, 2000).

Der Elektronentransport und die daran beteiligten Proteine während der Fe(III)-Reduktion wurden bisher vor allem an den eisenreduzierenden Modellorganismen *Geobacter* spp. und *Shewanella* spp. untersucht. Dabei sind die daran beteiligten Proteine sehr unterschiedlich. Im Allgemeinen werden die Elektronen von einer Dehydrogenase, über Elektronentransport-Proteine oder Quinone in der Cytoplasma-Membran, auf c-Typ-Cytochrome im Periplasma übertragen. Von dort werden die Elektronen über weitere c-Typ-Cytochrome an die Außenmenbran geleitet, wo sie anschließend über Fe(III)-Reduktasen auf das Fe(III) transferiert werden können (Lovley *et al*., 2004; Weber *et al*., 2006b). Der zugrunde liegende Mechanismus und die an dem Elektronentransport unmittelbar beteiligten Komponenten wurden bisher noch nicht vollständig identifiziert.

2.3 Phylogenie eisenreduzierender Mikroorganismen

Mikroorganismen, die ihre Energiegewinnung an die dissimilatorische Eisenreduktion koppeln, sind phylogenetisch und morphologisch sehr divers. Vertreter dieser physiologischen Gruppe sind in den Domänen der *Bacteria* und der *Archaea* zu finden. Innerhalb der *Bacteria* können die meisten dissimilatorischen Eisenreduzierer dem Phylum der *Proteobacteria* zugeordnet werden (Abb. 2). Die größte phylogenetische Gruppe an dissimilatorischen Eisenreduzierern stellen die Mitglieder der Familie *Geobacteraceae* (δ-*Proteobacteria*) dar, die über ihre 16S rRNA-Gensequenz in die

Gattungen *Geobacter*, *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa* und *Pelobacter* gegliedert werden (Holmes *et al*., 2004b; Lonergan *et al*., 1996). Vertreter dieser Familie können neben Fe(III) z.B. auch Nitrat, Fumarat, Schwefel, Mn(IV), U(VI), chlorierte Verbindungen und Elektroden (z.B. Graphit) als Elektronenakzeptor nutzen. Die komplette Genomsequenz von *Geobacter sulfurreducens* läßt außerdem darauf schließen, dass dieses Bakterium zur Sauerstoff-Respiration befähigt ist (Methe *et al*., 2003). Durch Kultivierungsexperimente konnte schließlich gezeigt werden, dass *Geobacter sulfurreducens* mit Konzentrationen von bis zu 10% Sauerstoff als einzigem Elektronenakzeptor wachsen kann (Lin *et al*., 2004). Als Elektronendonor können neben Acetat auch andere Substrate, wie z.B. Wasserstoff, Lactat, Fettsäuren und aromatische Verbindungen oxidiert werden. Mittels molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass die mikrobielle Gemeinschaft in Habitaten, in denen Eisenreduktion ein wichtiger Prozess ist, von Mitgliedern der *Geobacteraceae* dominiert wird (Lovley *et al*., 2004). Weitere eisenreduzierende Bakterien innerhalb der δ-*Proteobacteria* werden den Gattungen *Anaeromyxobacter* (He und Sanford, 2003; Treude *et al*., 2003), *Desulfovibrio* (Bale *et al*., 1997) und *Desulfobulbus* (Holmes *et al*., 2004a) zugeordnet. Die fakultativ anaerobe Lebensweise ist innerhalb der γ-*Proteobacteria* unter den dissimilatorischen Eisenreduzierern der Gattungen *Shewanella*, *Aeromonas*, *Pantoea* und *Acidithiobacillus* weit verbreitet. Die einzige Ausnahme stellt das strikt anaerobe Bakterium *Ferrimonas balearica* (Rossellomora *et al*., 1995) dar.

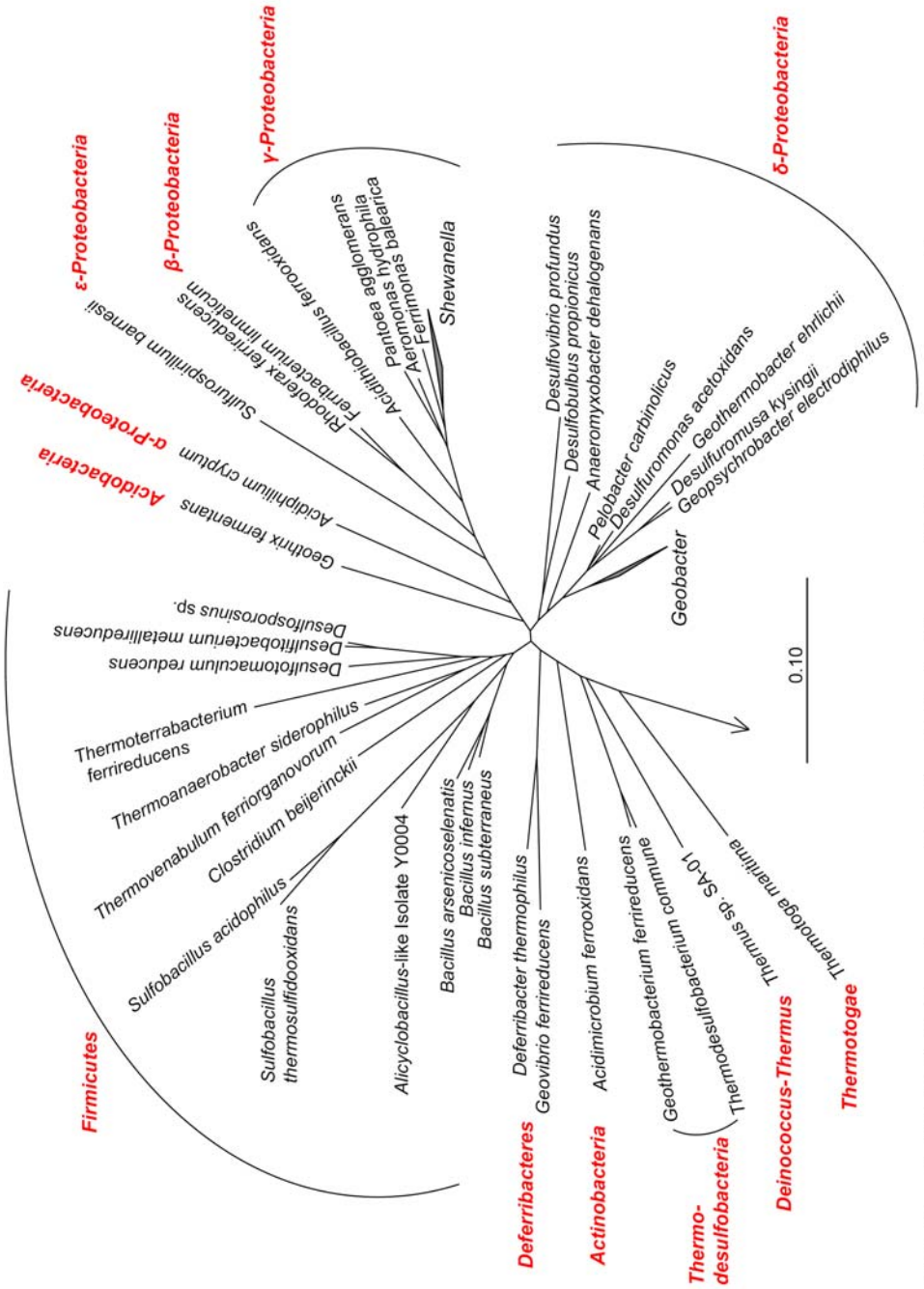


Abbildung 2: 16S rRNA-Phylogenie von repräsentativen Bakterienstämmen, die ihre Energiegewinnung an die dissimilatorische Eisenreduktion koppeln. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied.

Vereinzelt sind auch Arten der β-*Proteobacteria* [*Ferribacterium limneticum*, (Cummings *et al*., 1999); *Rhodoferax ferrireducens*, (Finneran *et al*., 2003)], der ε-*Proteobacteria* [*Sulfurospirillum barnesii*, (Laverman *et al*., 1995)], der α-*Proteobacteria* [*Acidiphilum cryptum*, (Küsel *et al*., 1999)], sowie der Phyla *Acidobacteria* [*Geothrix fermentas*, (Coates *et al*., 1999a)] und *Firmicutes* [z.B. *Bacillus infernus*, (Boone *et al*., 1995); *Clostridium beijerinckii*, (Dobbin *et al*., 1999)] zur dissimilatorischen Eisenreduktion befähigt. In der Domäne der *Archaea* sind dissimilatorische Eisenreduzierer innerhalb der Phyla *Euryarchaeota* [z.B. *Ferroglobus placidus*, (Tor *et al*., 2001; Tor und Lovley, 2001); *Geoglobus ahangari*, (Kashefi *et al*., 2002)] und *Crenarchaeota* [z.B. *Pyrobaculum aerophilum*, (Kashefi und Lovley, 2000)] zu finden.

3. Eisenzyklus am natürlichen Standort

In den 1980er Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass Bakterien die Oxidation von organischem Material und die Reduktion von Eisen an die Energiegewinnung koppeln (Balashova und Zavarzin, 1979; Lovley und Phillips, 1988; Myers und Nealson, 1988). Seitdem gewinnt die mikrobielle Eisenreduktion immer mehr an Bedeutung. Sie ist ein wichtiger Prozess in anoxischen Habitaten, in denen organisches Material, Wasserstoff und natürliches Fe(III) für Mikroorganismen zugänglich sind und hat einen großen Einfluss auf die Biogeochemie in diesen Habitaten (z.B. Lovley, 1991; Nealson und Saffarini, 1994). In verschiedenen Studien von Süßwasser- (Roden und Wetzel, 1996) und marinen Sedimenten (Canfield *et al*., 1993; Jensen *et al*., 2003; Thamdrup, 2000) konnte gezeigt werden, dass bis zu 75% der anaeroben Kohlenstoffoxidation an die Reduktion von Eisen gekoppelt ist. Eine entscheidende Rolle nimmt die Eisenreduktion außerdem bei der biologischen Sanierung von Standorten ein, die mit Schadstoffen wie Toluol, Benzol, Phenol, chlorierten Verbindungen oder mit Metallen wie Uran oder Chrom kontaminiert sind (z.B. Anderson *et al*., 2003; Finneran und Lovley, 2001; Lin *et al*., 2002; Lovley, 1995; Lovley, 1997b; Lovley, 2003; Lovley und Anderson, 2000). Durch die Zugabe von Eisen-Chelatoren, Huminstoffen oder anderen extrazellulären Quinonen zu verunreinigten Grundwassersedimenten kann die Eisenreduktion stimuliert und somit der Abbau von Schadstoffen gefördert werden (Lovley *et al*., 1994; Lovley *et al*., 1996a; Lovley *et al*., 1996b; Lovley *et al*., 1998). Allerdings kann die Eisenreduktion auch zu Qualitätsproblemen im Grundwasser führen. Gelangt das gebildete Fe(II) mit dem

Grundwasser an die sauerstoffhaltige Oberfläche wird es wieder zu unlöslichem Fe(III) oxidiert. Dieses kann die Wasserleitungen verstopfen und zur Verfärbung des Grundwassers führen (Lovley, 1997a). Eine weitere praktische Anwendung findet die Eisenreduktion bei der Energiegewinnung aus marinen Sedimenten (Bond *et al*., 2002), Reisfeldern (Ishii *et al*., 2008; Kaku *et al*., 2008) und organischem Material (Chaudhuri und Lovley, 2003).

Die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) ist nach der Methanogenese der zweitwichtigste anaerobe Prozess beim Abbau von organischem Material im Reisfeldboden (Jäckel und Schnell, 2000a; Yao *et al*., 1999). Dabei kann die Phase der Eisenreduktion, je nach Kohlenstoffgehalt des Bodens, mehrere Wochen andauern und bis zu 24% am gesamten anaeroben Abbau von organischem Material ausmachen (Jäckel und Schnell, 2000a). Der mikrobielle Eisenkreislauf in unbepflanztem Reisfeldboden wurde anhand von Profil-Studien untersucht (Ratering und Schnell, 2000). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der Boden in drei charakteristische Zonen unterteilt. Eine niedrige Konzentration von Fe(II) und Fe(III) wurden an der Bodenoberfläche gemessen, was durch die Diffusion des Eisens in das Flutungswasser und eine Sauerstoff-abhängige Oxidation von Fe(II) erklärt werden kann. Die höchste Konzentration an Fe(III) wurde in einer Tiefe von 2–4 mm detektiert. Diese Akkumulation ist auf die mikrobielle, anaerobe Oxidation von Fe(II) mit Nitrat zurückzuführen, das unterhalb von 2 mm Tiefe als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht (Arth und Frenzel, 2000; Ratering und Schnell, 2001). Die dritte Zone (4–8 mm) ist durch eine Zunahme der Fe(II)-Konzentration und eine gleichzeitige Abnahme der Fe(III)-Konzentration charakterisiert, was auf eine Dominanz von eisenreduzierenden Mikroorganismen hinweist. Neben der Sauerstoff-abhängigen Reoxidation von Fe(II) zu Fe(III) an der Bodenoberfläche spielt in bepflanzten Reisfeldböden auch die Reoxidation an der Wurzel eine entscheidende Rolle. Der Sauerstoff wird durch das Aerenchym der Pflanze zu den Wurzeln transportiert, diffundiert von dort in den Boden und Fe(II) wird reoxidiert (Frenzel *et al*., 1999; Ratering und Schnell, 2000). Das gebildete Fe(III) lagert sich in Form von Eisenplaques an den Wurzeln der Reispflanze ab, wodurch die Toxizität von Fe(II) reduziert werden kann. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Goethit und Lepidokrokit als Oxidations-Produkte an Reiswurzeln gebildet werden (Bacha und Hossner, 1977; Chen *et al*., 1980). Neben diesen Eisen(III)-Oxiden konnten auch Ferrihydrit und Hämatit im Reisfeldboden nachgewiesen werden (Cornell und Schwertmann, 2003; Karim, 1984).

eisenreduzierende Mikroorganismen kommen in hoher Abundanz im Reisfeldboden vor. Ihre numerische Bedeutung wurde in unterschiedlichen Studien mit Hilfe von MPN-Verdünnungsreihen („*most probable number*“) untersucht (Frenzel *et al*., 1999; Schnell, 1997). Unter Verwendung von verschiedenen Eisen(III)-Oxiden (Ferrihydrit, Lepidokrokit, Hämatit und Goethit) als Elektronenakzeptor, konnten die höchsten Zellzahlen mit Acetat, Lactat und Wasserstoff als Elektronendonor nachgewiesen werden. Ferrihydrit reduzierende Bakterien weisen dabei eine Zellzahl von bis zu 10^7 Zellen pro g Trockengewicht Boden auf, die mindestens zehnfach höher ist, als die der methanogenen *Archaea*. Eine Inhibierung der Methanogenese in Reisbodenaufschlämmungen konnte nach Zugabe von Ferrihydrit und Lepidokrokit beobachtet werden, was auf die Kompetition der Eisenreduzierer mit methanogenen *Archaea* um gemeinsame Substrate zurückzuführen ist (Achtnich *et al*., 1995a; Jäckel und Schnell, 2000b; Lueders und Friedrich, 2002; Qu *et al*., 2004). Eine alternative Erklärung für die Inhibierung der Methanogenese könnte die direkte Beteiligung von methanogenen *Archaea* an der Eisenreduktion sein (Bond und Lovley, 2002; Lueders und Friedrich, 2002; Reiche *et al*., 2008; van Bodegom *et al*., 2004). In verschiedenen Studien konnten außerdem methanogene *Archaea* isoliert werden, die ihre Energiegewinnung an die Reduktion von Fe(III) koppeln (z.B. Kashefi *et al*., 2002; Vargas *et al*., 1998). Die Zugabe von Eisen(III)-Oxiden zu Reisfeldboden könnte somit eine mögliche Strategie zur Minderung der Methanemission aus Reisfeldern darstellen.

Mit Hilfe von molekularen Analysen konnten erste Einblicke in die Diversität von eisenreduzierenden Mikroorganismen erzielt werden, die darauf hinwiesen, dass Mitglieder der *Geobacteraceae* eine wichtige Rolle im Reisrhizosphärenboden spielen (Lüdemann, 1999). Des Weiteren konnte aus Reisfeldboden der Stamm *Anaeromyxobacter dehalogenans* FAc12 isoliert werden, der unter anderem mit Ferrihydrit und Acetat wächst (Treude *et al*., 2003). Dieser Stamm zeigt auf Ebene der 16S rRNA-Gene eine Sequenzähnlichkeit von 99,5% zu *Anaeromyxobacter dehalogenans*, einem eisenreduzierenden Bakterium der Ordnung *Myxococcales* (He und Sanford, 2003). Durch die Anwendung der Stabilen Isotopenbeprobung (SIP) konnte nachgewiesen werden, das *Geobacter* spp. und *Anaeromyxobacter* spp. an der Assimilierung von ^{13}C-markiertem Acetat unter methanogenen Bedingungen beteiligt sind (Hori *et al*., 2007). Aus thermodynamischen Gründen kann Acetat unter diesen Bedingungen nicht vergoren werden, weshalb spekuliert wurde, dass Eisenoxide mit

geringer Bioverfügbarkeit diesen bekannten dissimilatorischen Eisenreduzierern als Elektronenakzeptor dienten.

4. Verwendung von stabilen Isotopen in der mikrobiellen Ökologie

Die Identifizierung von Mikroorganismen und deren Funktion im natürlichen Habitat ist ein wichtiger Aspekt innerhalb der mikrobiellen Ökologie. Die Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften wurde früher über Kultivierung und phänotypische Charakterisierung der Isolate bestimmt (Atlas, 1984). Allerdings konnten die dafür notwendigen Methoden nur bei Mikroorganismen angewendet werden, die bereits isoliert und kultivierbar waren. Außerdem war die genetische Information, die man über den isolierten Organismus erhielt, sehr gering. Abhängig vom Habitat sind gegenwärtig nur 0,001 bis 15% der Mikroorganismen, die in einem natürlichen Ökosystem vorkommen, mit den bekannten Methoden kultivierbar (Amann *et al*., 1995). Dies ist unter anderem auf die Wachstumsbedingungen im Labor zurückzuführen, die sich deutlich von den *in situ* Bedingungen der Mikroorganismen unterscheiden. Somit ist die Kultivierungsmethode für repräsentative Aussagen über Identität und Funktion der vorhandenen Mikroorganismen in einem bestimmten Ökosystem ungeeignet. Erst die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, insbesondere die Klonierung und vergleichende Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens als phylogenetischer Marker (Olsen *et al*., 1986; Pace *et al*., 1986; Woese, 1987; Woese, 2000), führten zur Entdeckung von bisher nicht kultivierten Mikroorganismen und neuen taxonomischen Gruppen (Rappe und Giovannoni, 2003). Allerdings kann man keine Rückschlüsse auf die Physiologie und die damit verbundene Funktion der Mikroorganismen ziehen (Liesack *et al*., 1997). Zur Verknüpfung der phylogenetischen Einordnung einer mikrobiellen Gemeinschaft mit ihrer Funktion im natürlichen Habitat ist die Verwendung der „Stabilen Isotopenbeprobung“ („*Stable Isotope Probing*“; SIP) besonders gut geeignet (Radajewski *et al*., 2000). Sie beruht auf der Assimilation des stabilen bzw. „schweren“ Isotops (z.B. ^{13}C) in die Biomasse der aktiv an der Umsetzung des markierten Substrats beteiligten Mikroorganismen. ^{13}C-Kohlenstoff kommt in der Natur nur mit einem Anteil von 1,1% vor, während der weitaus größere Anteil auf das leichtere ^{12}C-Isotop entfällt. Die Verfolgung des Flusses eines ^{13}C-markierten Substrats durch die mikrobielle Gemeinschaft und die anschließende isotopische Analyse von Biomarkern, wie z.B.

Phospholipid-Fettsäuren (PLFA; Boschker *et al*., 1998), DNA (Radajewski *et al*., 2000) und RNA (Manefield *et al*., 2002a), erlaubt somit die Identifizierung der aktiven an der Umsetzung des Substrats beteiligten mikrobiellen Populationen. Aufgrund der Massendifferenz durch das zusätzliche ^{13}C-Atom, können ^{13}C-markierte und nicht markierte (^{12}C) Nukleinsäuren mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt werden. Anhand der ^{13}C-markierten Nukleinsäuren können die aktiven Mikroorganismen direkt über T-RFLP-Analysen und anschließende Sequenzierung der 16S rRNA-Gene identifiziert werden. Entscheidend für den Erfolg von SIP ist ein ausreichend hoher Grad an isotopischer Anreicherung in den Nukleinsäuren, der durch den anabolischen Stoffwechselweg, das verwendete Substrat, die Dauer der Inkubation, das relative Vorkommen von natürlich vorhandenem unmarkiertem Substrat und die Rate der Nukleinsäuresynthese beeinflusst wird (Lueders *et al*., 2004a). Die Verwendung von DNA, insbesondere die Untersuchung der 16S rRNA-Gene (DNA-SIP) als markierte Biomarker, ermöglicht eine hohe phylogenetische Auflösung der an der Umsetzung des ^{13}C-markierten Substrats beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft (Dumont und Murrell, 2005; Friedrich, 2006). Allerdings stellen die hohen Konzentrationen an ^{13}C-markietem Substrat und lange Inkubationszeiten eine Limitierung dieser Methode dar und führen wahrscheinlich zu Anreicherungseffekten. Außerdem ist eine zweifache Zellteilung eine Grundvoraussetzung für die Synthese ^{13}C-markierter DNA (Neufeld *et al*., 2007). Eine Weiterentwicklung der SIP-Methode ist die Verwendung des 16S rRNA-Moleküls selbst als Biomarker (RNA-SIP; Lueders *et al*., 2004a; Lueders *et al*., 2004b; Manefield *et al*., 2002a; Manefield *et al*., 2002b). Dieser Ansatz ist wesentlich sensitiver und kombiniert die Sequenz basierte phylogenetische Auflösung von DNA-SIP mit den Vorteilen eines „*high-copy*“ Biomarkers, dessen Umsetzung unabhängig von der Zellreplikation ist und dessen Gehalt in der Zelle deren Aktivität widerspiegelt (Whiteley *et al*., 2006). Eine mögliche Limitierung der SIP-Methode stellt die Sensitivität dar. Der wahrscheinlich wichtigste Faktor, der die Identifizierung der Mikroorganismen beeinflussen kann, ist die Verdünnung des markierten Substrats vor der Assimilation und der Inkorporation. Dieser Verdünnungseffekt kann einen Einfluss auf die Trennung von markierten und unmarkierten Nukleinsäuren haben, da hierfür etwa 20% der Markierung in die Nukleinsäuren eingebaut werden müssen (Radajewski *et al*., 2000). Ein weiteres Problem bei der Trennung stellt das Vorhandensein von rRNA-Spezies verschiedener Dichte da, weshalb sich auch in der schweren Fraktion unmarkierte RNAs befinden können

(Manefield *et al*., 2002b). Ein weiterer Faktor, der die Identifizierung der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen kann, ist die Möglichkeit von „*Substrat cross-feeding*“. Hierbei metabolisieren Mikroorganismen das markierte Substrat und bilden markierte Abbauprodukte, die wiederum von anderen Mikroorganismen verwertet werden können. Auf diese Weise können mikrobielle Populationen markiert werden, die an dem zu untersuchenden Vorgang nicht beteiligt sind. Durch die Kombination von DNA- und RNA-SIP und die Analyse des Einbaus von ^{13}C über den zeitlichen Verlauf der Inkubation können solchen Nahrungsketten aufgeklärt werden (Lueders *et al*., 2004c). Neben der Verwendung von PLFA und Nukleinsäuren als Biomarker wurde kürzlich die Stabile Isotopenbeprobung erstmals auf Proteine angewandt (Jehmlich *et al*., 2008a; Jehmlich *et al*., 2008b). Die Autoren postulieren, dass Protein-SIP eine höhere Sensitivität, im Vergleich zu DNA/RNA-SIP, besitzt. Allerdings wurde Protein-SIP bisher nur bei Reinkulturen und noch nicht bei natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften angewendet. Die Stabile Isotopenbeprobung von Nukleinsäuren stellt somit eine geeignete Methode dar, um die Struktur und *in situ* Funktion von bisher unkultivierten Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat zu charakterisieren.

5. Zielsetzung und methodischer Ansatz

Die dissimilatorische Eisenreduktion ist der zweitwichtigste anaerobe Prozess beim Abbau von organischem Material im Reisfeldboden. Mittels biogeochemischer Analysen konnte gezeigt werden, dass die Eisenreduktion einen großen Einfluss auf die im Reisfeldboden ablaufenden Prozesse hat. Während die numerische Abundanz der eisenreduzierenden Mikroorganismen im Reisfeldboden mit MPN-Verdünnungsreihen ermittelt wurde, ist bisher nur wenig über die Diversität der metabolisch aktiven eisenreduzierenden Mikroorganismen und ihre physiologische Rolle im Reisfeldboden bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung und Identifizierung der aktiven eisenreduzierdenen mikrobiellen Population in geflutetem Reisfeldboden mittels biogeochemischer und molekularbiologischer Methoden. Dabei stellte die Stabile Isotopenbeprobung (SIP) eine geeignete Methode dar, um im Verlauf dieser Studie folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- Welche Mikroorganismen sind aktiv an der Reduktion von verschiedenen Eisen(III)-Oxiden (Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit und Hämatit) beteiligt?
- Wie ist die mikrobielle Gemeinschaft unter Verwendung dieser Eisen(III)-Oxide strukturiert?
- Welchen Einfluss haben Kristallinität, Partikel- und Oberflächengröße auf die mikrobielle Reduzierbarkeit der Eisen(III)-Oxide?

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Gase

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit im Text nicht gesondert aufgeführt, im Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder in vergleichbaren Reinheitsgraden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Bio-Rad Laboratories (München) bezogen. Enzyme und molekularbiologische Reagenzien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), Eurogentec Deutschland GmbH (Köln), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) geliefert. Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Alle verwendeten Gase wurden von Air Liquid (Krefeld) und Messer-Griesheim (Darmstadt) bezogen.

2. Sterilisationsverfahren

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren bei 121°C für 30 min sterilisiert. Nicht autoklavierbare Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Nr. FP 30/0,2 CA-S, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel). Glasmaterialien wurden bei 180°C für 4 h sterilisiert.

3. Probenmaterial und Inkubationsbedingungen

Der in den Experimenten verwendete Reisfeldboden wurde 2006 aus einem Reisfeld des italienischen Reisforschungsinstituts (ISC) in der Nähe von Vercelli (Po-Ebene) entnommen. Der Boden wurde luftgetrocknet und bei Raumtemperatur in Polyethylenwannen gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde der getrocknete Boden grob von Stroh- und Wurzelresten befreit, mit einem Backenbrecher (Typ BB1, Retsch, Haan) zerkleinert und auf eine Korngröße von ≤ 2 mm gesiebt.

Für die Vorinkubation wurde Reisfeldboden mit bidestilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:2 in einer Glasflasche gemischt, mit Butyl-Stopfen verschlossen und

30 min mit N_2 begast. Die Inkubation erfolgte statisch im Dunkeln für 36 d, um alle im Reisfeldboden enthaltenen potentiellen Elektronenakzeptoren vor allem Fe(III) zu erschöpfen. In der Anaerobenkammer (Mecaplex AG, Grenchen, Schweiz) wurden 20 g der vorinkubierten, homogenen Bodenaufschlämmung in 60 ml Serumflaschen gefüllt, mit Butyl-Stopfen verschlossen und 5 min mit N_2 begast. In einigen Experimenten wurden zuvor die verwendeten Eisen(III)-Oxide Ferrihydrit (40 bzw. 70 µmol g_{TG}^{-1}), Lepidokrokit (70 µmol g_{TG}^{-1}), Hämatit (140 µmol g_{TG}^{-1}) oder Goethit (140 µmol g_{TG}^{-1}) in die Serumflaschen gefüllt, diese mit N_2 begast und anschließend in der Anaerobenkammer mit der Bodenaufschlämmung supplementiert. Zu Beginn der Stabilen Isotopenbeprobung (SIP) wurden die verschiedenen Mikrokosmen (Tab. 1) mit $^{13}C_2$-markiertem Acetat (Sigma-Aldrich) versetzt. Die Zugabe von Acetat erfolgte in 0,7 mM Schritten über einen Zeitraum von 48 h (Endkonzentration 2,1 mM). Die bei jeder Inkubation mitgeführten Kontrollen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Eine im Rahmen dieser Doktorarbeit duchgeführte Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von Lactat metabolisierenden Mikroorganismen im Reisfeldboden unter eisenreduzierenden (Ferrihydrit und Lepidokrokit) und methanogenen Bedingungen. Das Konzentrationsverhältnis von Elektronendonor:Elektronenakzeptor wurde anhand der folgenden stöchiometrischen Gleichungen für Acetat [1] und Lactat [2] (Lovley, 1991) berechnet:

$$Acetat^- (CH_3COO^-) + 8\ Fe(III) + 4\ H_2O \rightarrow 2\ HCO_3^- + 8\ Fe(II) + 9\ H^+ \quad [1]$$

$$Lactat^- (C_3H_5O_3^-) + 4\ Fe(III) + 2\ H_2O \rightarrow Acetat^- + HCO_3^- + 4\ Fe(II) + 5\ H^+ \quad [2]$$

Dadurch wurde gewährleistet, dass die Konzentration der verwendeten Elektronenakzeptoren nicht limitierend war, um das zugegebene Acetat bzw. Lactat vollständig zu oxidieren. Im Vergleich zu den Eisen(III)-Oxiden Lepidokrokit (γ-FeOOH), Hämatit (α-Fe_2O_3) und Goethit (α-FeOOH) ist die exakte Strukturformel für Ferrihydrit bisher noch nicht bekannt (Cornell und Schwertmann, 2003). Für die Berechnung der molaren Masse wurde die vorhergesagte Strukturformel $Fe_5HO_8 \times 4\ H_2O$ (Towe und Bradley, 1967) verwendet.

Tabelle 1. Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsexperimente.

Ansatz	Inkubations-bedingungen		Chemische und physikalische Analysen						Molekulare Analysen[a]			
	C-Quelle Acetate	Konzentration Fe(III)-Oxid (µmol g_{TG}^{-1})	GC		GC-c-IRMS		IC	HPLC	RNA-Extraktion	RNA-SIP	T-RFLP	Klon-bibliotheken
			CH_4	CO_2	$^{13}CH_4$	$^{13}CO_2$						
Ferrihydrit	^{13}C-markiert	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ferrihydrit	^{13}C-markiert	70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lepidokrokit	^{13}C-markiert	70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Goethit	^{13}C-markiert	140	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hämatit	^{13}C-markiert	140	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kontrolle OE[b]	^{13}C-markiert	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kontrolle 1[b]	^{12}C-markiert	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kontrolle 2[b]	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Kontrolle 3[b]	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

a. Die molekularen Analysen erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation.

b. Diese Kontrollen wurden bei allen Inkubationsexperimenten mitgeführt.

Die Inkubation der Mikrokosmen erfolgte statisch bei 25°C im Dunkeln über einen Zeitraum von 72 h, bzw. 168 h und 240 h im Falle der Langzeitexperimente von Hämatit und Goethit. Zu verschiedenen Zeitpunkten der SIP-Experimente wurden von drei parallelen Mikrokosmen die Konzentration von CH_4 und CO_2 sowie deren stabile Isotopensignatur gemessen.

Anschließend wurden zwei Parallelen für die Bestimmung von Eisen(II), Gesamteisen, pH-Wert, Fettsäuren und anorganischen Ionen geöffnet. Die Bodenproben wurden in 2-ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 21.000 *g* und 4°C zentrifugiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden der Überstand und die Bodenproben bei –20°C bzw. –80°C eingefroren.

4. Eisen(III)-Oxide

Alle verwendeten Eisen(III)-Oxide wurden nach einem modifizierten Protokoll von Schwertmann und Cornell (2000) hergestellt. Die Identifizierung, Charakterisierung und die Bestimmung der Partikelgröße der synthetisierten Eisen(III)-Oxide erfolgte über Röntgenstrukturanalysen (Professor Dr. Massa, FB Chemie, Universität Marburg). Die mittlere Teilchengröße der Eisen(III)-Oxid-Partikel wurde mit Hilfe der Scherrer-Formel aus der Halbwertsbreite in den Pulverdiffraktiogrammen berechnet. Die spezifische Oberflächengröße der Eisen(III)-Oxide wurde mittels BET-Oberflächen-Messungen (Dr. Karin Eusterhues, Institut für Geowissenschaften, Universität Jena) bestimmt.

4.1 2-line Ferrihydrit

In einem Becherglas mit eingehängter pH-Elektrode (SenTix MIC, WTW GmbH, Weilheim) wurden 1000 ml einer 0,25 M $FeCl_3$-Lösung hergestellt. Unter kräftigem Rühren wurden zügig ca. 740 ml einer 1 M NaOH-Lösung hinzugefügt, so dass die Suspension nicht zum Stocken kam. Dabei wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert nicht über 7,0 stieg. Es bildete sich ein rostbrauner Eisenhydroxidschlamm. Anschließend wurde der pH-Wert durch langsame Zugabe von 1 M NaOH auf 7,6–7,8 eingestellt und nachreguliert bis er sich in diesem konstanten Bereich bewegte. Danach wurde die Suspension auf Zentrifugenbecher verteilt und für 60 min bei 9700 *g* (Sorvall RC 5B Plus, Rotor SLA-3000, Thermo Scientific, Dreieich) abzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, das Pellet in bidestilliertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschprozess wurde solange wiederholt bis im Überstand kein Chlorid (< 5 mM) mehr nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von Chlorid-Ionen erfolgte über dessen Präzipitation als Silberchlorid (AgCl), indem 500 µl Überstand der Probe mit 500 µl einer 65%igen Salpetersäure und 10 µl 0,1 M Silbernitrat ($AgNO_3$) versetzt wurden. In Anwesenheit von Chlorid bildet sich AgCl als weißer Niederschlag. Als Vergleich wurden eine Positivkontrolle (5 mM NaCl-Lösung) und eine Negativkontrolle (bidestilliertes Wasser) mitgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet bei –20°C eingefroren und anschließend in einem Lyophilisator (ALPHA 1-4, LDC-1M, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) unter Vakuum und Kälte getrocknet.

4.2 Lepidokrokit

In ein Becherglas mit eingehängter pH-Elektrode wurden 300 ml bidestilliertes Wasser gefüllt und unter Rühren 11,93 g nicht kristallisiertes $FeCl_3 \times 4\ H_2O$ (60 mmol Fe) hinzugefügt. Kam es zur Bildung von ockerfarbenen Kristallen musste die Lösung zunächst filtriert werden, um präzipitiertes Akaganeit (β-FeOOH) zu entfernen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M NaOH auf 6,7–6,9 eingestellt. Anschließend wurde Pressluft zugeführt und der pH-Wert mit 1 M NaOH nachreguliert. Während der Oxidation verfärbte sich die Suspension von grün/blau über grau nach orange. Die bei der Oxidation von Fe^{2+} gebildeten Protonen wurden durch die Zugabe von NaOH neutralisiert. Nach etwa 2 h war die Oxidation beendet und der pH-Wert blieb konstant. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (60 min, 9700 *g*) und durch mehrere Waschschritte von Chlorid-Ionen gereinigt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 4.1 beschrieben.

4.3 Hämatit

Um reines Hämatit herzustellen, wurden für die Synthese verschiedene Protokolle getestet. Bei Methode 1 erfolgte die Synthese durch die Transformation von Ferrihydrit. Dabei präzipitiert zunächst 2-line Ferrihydrit, das dann in einer wässrigen Lösung in Hämatit umgewandelt wird. Im Vergleich dazu kann die Synthese auch über die Präzipitation des Hämatits durch vorherige Hydrolyse von Fe(III)-Lösungen bei hohen Temperaturen und stark sauren Bedingungen erfolgen (Methode 2 und 3).

Methode 1. In einer Polyethylenflasche wurden 500 ml bidestilliertes Wasser auf 90°C temperiert. Des Weiteren wurden eine 1 M KOH- und eine 1 M $NaHCO_3$-Lösung auf diese Temperatur erhitzt. In dem erwärmten Wasser wurden unter Rühren 40 g $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ gelöst und es bildete sich eine klare, rötlich-braune Lösung. Anschließend wurden 300 ml 1 M KOH zugegeben und rotbraunes Ferrihydrit präzipitierte. Danach wurden 50 ml 1 M $NaHCO_3$ hinzugefügt, der pH-Wert auf 8,0–9,0 eingestellt und die Suspension in der geschlossenen Polyethylenflasche für 48 h bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Suspension wurde der präzipitierte Hämatit auf Zentrifugenbecher verteilt, zentrifugiert (60 min, 9700 *g*) und das Pellet in bidestilliertem Wasser resuspendiert. Dieser Waschprozess wurde solange wiederholt bis kein Nitrat im Überstand mehr nachgewiesen werden konnte. Hierfür wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Zum einen erfolgte der Nachweis von Nitrat-Ionen mit Hilfe von Diphenylamin (Schwertmann und Cornell, 2000). Hierzu wurden wenige Kristalle der Chemikalie mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt und der zu untersuchende Überstand vorsichtig damit unterschichtet. Bei Anwesenheit von Nitrat färbt sich die untere Phase blau, was auf die schrittweise Oxidation des Diphenylamin über N, N'-Diphenylbenzidin (farblos) zu dem blauen N, N'-Diphenylbenzidinviolett (Chinoimin-Farbstoff) zurückzuführen ist. Das zweite Protokoll beruht auf dem Nachweis von Nitrat mittels Ringprobe. In einem Reagenzglas wurde Eisen(II)-Sulfat in bidestilliertem Wasser gelöst, der zu untersuchenden Überstand zugegeben und das Gemisch vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Bei Anwesenheit von Nitrat bildet sich ein braun-schwarzer Ring (je nach Konzentration des Nitrats). Diese Ringbildung beruht auf Redoxreaktionen, die an der Grenzfläche der Probenlösung und der Schwefelsäure stattfinden. Zunächst werden Nitrat-Ionen zu Stickstoffmonoxid reduziert, wobei das Fe(II) zu Fe(III) oxidiert wird (Gleichung [3]). Das gebildete Stickstoffmonoxid lagert sich an mit Wasser komplexierte Eisen(II)-Ionen an und bildet den braunen Pentaaquanitrosyl-Eisen(II)-Komplex (Gleichung [4]).

$$3\ Fe^{2+} + NO_3^- + 4\ H^+ \rightarrow 3\ Fe^{3+} + NO + 2\ H_2O \qquad [3]$$

$$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + NO \rightarrow [Fe(H_2O)_5NO]^{2+} + H_2O \qquad [4]$$

Als Vergleich wurden bei den angewendeten Protokollen eine Positivkontrolle (2 mM $NaNO_3$) und eine Negativkontrolle (bidestilliertes Wasser) mitgeführt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 4.1 beschrieben.

Methode 2. In einer Glasflasche wurden 2 l einer 0,0002 M HNO_3-Lösung auf 98°C erhitzt. Unter kräftigem Rühren wurden 16,6 g unhydrolysiertes $Fe(NO_3) \times 9\ H_2O$ (0,02 M Fe) zugegeben, wodurch eine klare orangefarbene Lösung entstand. Diese wurde in der verschlossenen Flasche für 7 d bei 98°C inkubiert. Die entstandene rötlich-braune Suspension wurde wie unter 4.1 beschrieben zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Der Nachweis von Nitrat-Ionen erfolgte wie unter 4.3, Methode 1 erklärt.

Methode 3. In einer Glasflasche wurden 2 l einer 0,0002 M HCl-Lösung auf 98°C erwärmt. Unter kräftigem Rühren wurden 10,81 g $FeCl_3 \times 6\ H_2O$ hinzugefügt. Die rötlich-braune Lösung wurde für 10 d bei 98°C inkubiert und anschließend wie unter 4.1 beschrieben weiterbehandelt.

4.4 Goethit

In ein 5-l Becherglas wurden 100 ml einer 1 M $Fe(NO_3)_3$-Lösung gefüllt und unter kräftigem Rühren zügig 180 ml einer 5 M KOH-Lösung zugegeben, so dass die Suspension nicht zum Stocken kam. Es bildete sich rötlich-braunes Ferrihydrit. Die Suspension wurde mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 2 l aufgefüllt und auf Polyethylenflaschen verteilt. Die Inkubation erfolgte für 60 h bei 70°C, wodurch ockerfarbener Goethit präzipitierte. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension auf Zentrifugenbecher verteilt, zentrifugiert (60 min, 9700 *g*) und durch mehrere Waschschritte von Nitrat-Ionen befreit (siehe 4.1). Der Nachweis von Nitrat erfolgte wie unter 4.3 beschrieben.

5. Chemische und physikalische Analysen

Um die in den Inkubationsansätzen ablaufenden biogeochemischen Prozesse verfolgen zu können, wurde der Verbrauch von verschiedenen Substraten sowie die Bildung von Stoffwechselprodukten mittels analytischer Methoden bestimmt. Vor jeder Gasanalyse wurden die Inkubationsflaschen kurz von Hand geschüttelt, um ein Gleichgewicht zwischen flüssiger Phase und Gasphase herzustellen. Die Gasproben wurden mit einer

0,25 ml gasdichten Spritze (SGE GmbH, Darmstadt) unmittelbar vor der Analyse entnommen und analysiert. Die Spritze wurde zuvor mit N_2 gespült, um einen Eintrag von O_2 in die Inkubationsflaschen zu vermeiden. Das Probenvolumen betrug 0,1 ml.

5.1 Analyse von Methan und Kohlendioxid (Gaschromatographie)

Die Bestimmung von CH_4 und CO_2 erfolgte an einem GC-8A Gaschromatographen (Shimadzu, Japan) mit Flammenionisationsdetektor (FID; Roy *et al*., 1997). CO_2 wurde nach der Umsetzung im Methanisator als CH_4 detektiert. Einpunkt-Eichungen wurden mit Hilfe eines Gasgemisches aus jeweils 1000 ppmv CO_2 und CH_4 in N_2 durchgeführt.

Injektor:	Betriebstemperatur: 120°C
Trägergas:	Wasserstoff 5.0
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, Durchmesser 1/8 Zoll,
	Trägermaterial: Hayesep Q 80/100 mesh
	Betriebstemperatur: 80°C
Methanisator:	Eigenbau, Edelstahlsäule, 20 cm Länge,
	Durchmesser 1/8 Zoll, NiCr-Ni-Katalysator
	(Chromopack, Middelburg, Niederlande)
	Betriebstemperatur: 350°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
	Brenngas: Wasserstoff und FID-Gas
	Quenchgas: Stickstoff 5.0
	Betriebstemperatur: 160°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv CH_4
Auswertung:	Peak Simple (SRI Instruments, Kalifornien, USA)

Zur Berechnung der freigesetzten Methan- und Kohlendioxidmengen wurden die gemessenen Konzentrationen M_v [ppmv] in Stoffmengen n [µmol] umgerechnet (Gleichung [5]).

$$n = \frac{M_v \times 10^{-6}\ bar \times V_g}{R \times T} \qquad [5]$$

n: Stoffmenge [mol]

M_v: Mischungsverhältnis [ppmv]

V_g: Volumen der Gasphase [l]

R: allgemeine Gaskonstante (0,083144 bar K^{-1} mol^{-1})

T: Temperatur [K]

5.2 Analyse von stabilen Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen

Stabile Isotopenhäufigkeiten werden in dieser Arbeit in der üblichen δ-Notierung dargestellt. Hierbei wird der relative Unterschied des Isotopenverhältnisses ($^{13}C/^{12}C$) der Probe zu einem internationalen Standard in ‰ ausgedrückt. Der Standard für Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessungen ist gemäß internationaler Übereinkunft der Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) mit einem $R_{Standard} = 11180.2 \times 10^{-6} \pm 2.8 \times 10^{-6}$. Die stabile Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 wurde mit einem Gaschromatographen mit Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (GC-c-IRMS, Thermo Electron, Bremen) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode wurde von Brand (1996) beschrieben.

GC:	Hewlett Packard 6890 (Waldbronn)
Injektor:	Splitverhältnis 1:10
	Betriebstemperatur: 150°C
Trägergas:	Helium 5.0; Flussrate 2,6 ml min^{-1}
Säule:	Edelstahlsäule, 27,5 m Länge, Durchmesser 0,32 mm;
	Filmdicke 10 µm (Crompack, Frankfurt)
	Trägermaterial: Pora Plot Q
	Betriebstemperatur: 30°C
GC/C-Interface:	Standard GC Combustion Interface III
	(Thermo Electron, Bremen)
	Oxidationsreaktor: 940°C
	Reduktionsreaktor: 650°C

Detektor:	IRMS: Finnigan MAT delta plus (Thermo Electron)
Auswertung:	ISODAT™ NT 2.0 (Thermo Electron)
Referenzgas:	CO_2 4.8 (Reinheitsgrad 99,998%; Messer-Griessheim, Düsseldorf)

Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck-Institut für Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht. Die Präzision war bei wiederholter Injektion 1,3 nmol CH_4 ± 0,2 ‰. Das ermittelte Isotopenverhältnis wurde als $\delta^{13}C$-Wert (Gleichung [6]) und als Atomprozent ([*atm%*]; Gleichung [7]) dargestellt:

$$\delta^{13}C = \left[\frac{R_{Probe}}{R_{Standard}} - 1 \right] \times 10^3 \qquad [6]$$

$$atm\% = \frac{100 \times R_{Standard} \left[\frac{\delta_{Probe}}{1000 + 1} \right]}{1 + R_{Standard} \left[\frac{\delta_{Probe}}{1000 + 1} \right]} \qquad [7]$$

$\delta^{13}C$: Stabiles Kohlenstoffisotopenverhältnis relativ zum internationalen Standard [‰]

R_{Probe}: Verhältnis der Isotopenhäufigkeit der Probe ($^{13}C/^{12}C$)

$R_{Standard}$: Verhätnis der Isotopenhäufigkeit des Standards ($^{13}C/^{12}C$)

atm%: Atomprozent [atm%]

5.3 Analyse organischer Säuren (HPLC)

Die Konzentration von organischen Säuren und Alkoholen im Porenwasser der Bodenproben wurde mittels HPLC- (High Performance Liquid Chromatography) Analyse bestimmt (Krumböck und Conrad, 1991). Dafür wurden die Proben der inkubierten Bodenaufschlämmungen zentrifugiert (10 min, 21.000 *g*, 4°C), der Überstand durch einen

Acetat-freien Filter (REZIST 13/0,2 PTFE) filtriert und bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert. Das Injektionsvolumen betrug 0,1 ml.

HPLC-Anlage:	Pumpe S1000, Säulenofen S4110 (Sykam, Fürstenfeldbruck)
Probenaufgeber:	Jasco 851-AS Intelligent Sampler (Japan Spectroscopy Co. Ltd., Japan)
Trägermaterial:	Sulfiertes Divinyl-Benzol-Styren (Aminex HPX-87-H, Bio-Rad)
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäure, Flussrate 0,5 ml min^{-1}
Säule:	Edelstahlsäule, 30 cm Länge, Durchmesser 7,8 mm Betriebstemperatur: 65°C
Detektor:	Refraction Index (RI)-Detektor: ERC-7512 (ERMA Cr.Inc., Tokio), Betriebstemperatur: 40°C UV-Detektor: UVIS 200 (LINAER Instruments, Reno, USA), Wellenlänge 205 nm
Nachweisgrenze:	~ 50 µM (substanzabhängig)
Auswertung:	Peak Simple (SRI Instruments, Kalifornien, USA)
Eichstandard:	Mischstandard aus Lactat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat und Ethanol (je 1 mM)

5.4 Analyse anorganischer Ionen (Ionenchromatographie)

Zur Bestimmung der Chlorid-, Nitrat-, Nitrit-, Phosphat- und Sulfat-Konzentrationen wurde ein Ionenchromatograph (Sykam, Fürstenfeldbruck) verwendet (Bak *et al*., 1991). Die Proben von inkubierten Bodenaufschlämmungen wurden zentrifugiert (10 min, 21.000 *g*, 4°C), der Überstand durch einen Acetat-freien Filter (REZIST 13/0,2 PTFE, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) filtriert und bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert. Das Injektionsvolumen betrug 0,05 ml.

IC-Anlage:	Pumpe S1121, Säulenofen S4260B, Suppressorsystem S4260A, Probenaufgeber S5200, Reagent Organizer S7121 (Schambeck, Bad Honnef)

Trägermaterial:	Styrol/Divinobenzol, 10 µm Korngröße
Säule:	Anionentrennsäule (LCA A14, Sykam), Edelstahlsäule, Länge 2,5 cm, Durchmesser 3 mm, Betriebstemperatur: 70°C
Fließmittel:	5 mM Na_2CO_3 + 1 ml Modifier (1 g 4-Hydroxy-benzonitril in 100 ml Methanol) Flussrate: 1,5 ml min^{-1}
Detektor:	Leitfähigkeitsdetektor: S3111 UV/VIS Detektor: S3200, Wellenlänge 220 nm
Nachweisgrenze:	~ 10 µM (substanzabhängig)
Auswertung:	Peak Simple (SRI Instruments, Kalifornien, USA)
Eichstandard:	Mischstandard aus Chlorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat (je 1 mM)

Ein Liter des verwendeten Eluenten setzte sich aus einer 5 mM Na_2CO_3-Lösung und 1 ml Modifier (1 g 4-Hydroxybenzonitril in 100 ml Methanol) zusammen.

5.5 Kolorimetrische Bestimmung von Eisen(II) und Gesamteisen

Zum Nachweis der Eisen-Ionen wurde ein kolorimetrisches Verfahren (modifiziert nach Achtnich *et al*., 1995a) eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung der Fe^{2+}-Ionen diente das Reagenz Ferrozin [3-(2-Pyridyl)-5,6-bis-(4-Phenylsulfonsäure)-1,2,4-Triazin-Dinatrium-salz]. Drei Ferrozinmoleküle bilden mit einem Fe^{2+}-Ion einen stabilen fuchsinroten Komplex. Dabei findet zwischen dem Fe^{2+} und einem Pyridyl-Stickstoff sowie dem 2. und 4. Triazin-Stickstoff eine Wechselwirkung statt. Dieser Komplex entsteht in wässrigen Lösungen bei pH 4,0–9,0 und weist ein Absorptionsmaximum bei 562 nm auf (Stookey, 1970). Ferrozin reagiert nicht mit Fe^{3+}-Ionen. Das Ferrozin-Reagenz wurde 0,1%ig (v/v) in 200 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxylethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure) gelöst und mit NaOH auf eine pH-Wert von 7,0 eingestellt.

5.5.1 Bestimmung von Eisen(II)

Zur Extraktion der Fe^{2+}-Ionen wurden 0,5 g Reisfeldbodenaufschlämmung in 4,5 ml 0,5 M HCl gegeben und schüttelnd für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser

Extraktion wurden 100 µl des Extrakts (oder eine 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung davon) mit 1 ml Ferrozin-Reagenz gemischt und für 3 min bei 21.000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion des Überstandes (1 ml) in einem Photometer (Smart Spec Plus Spektrophotometer, Bio-Rad, München) bei 562 nm ermittelt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extinktion von 100 µl 0,5 M HCl mit 1 ml Ferrozin-Reagenz wurde als Blindwert gemessen. Als Eichstandard diente eine Verdünnungsreihe einer 2 mM $FeCl_2$-Lösung in 0,5 M HCl, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Fe(II)-Konzentration der Proben wurde durch die Steigung der Eichgeraden errechnet.

5.5.2 Bestimmung von Gesamteisen und Eisen(III)

Hierzu wurden 100 µl des zuvor in 0,5 M HCl extrahierten Eisens mit 2 ml einer 0,25 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (gelöst in 0,25 M HCl) schüttelnd für 2 h bei 60°C inkubiert. Dadurch wurde das in den Proben vorkommende Fe(III) zu Fe(II) reduziert (Chao und Zhou, 1983; Lovley und Phillips, 1987). Anschließend erfolgte die Bestimmung des Gesamteisens mit dem Ferrozin-Reagenz wie unter 5.5.1 beschrieben. Der Gehalt an Gesamteisen setzte sich nach der Reduktion aus dem in der Probe vorhandenem Fe(II) und dem zu Fe(II) reduzierten Fe(III) zusammen.
Die Fe(III)-Konzentration ergab sich aus der Konzentrationsdifferenz zwischen Gesamteisen und Fe(II).

5.5.3 Berechnung der Eisenkonzentration

Die mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität wurde mit folgender Formel [8] in Mikromol pro Gramm Trockengewicht Reisfeldboden umgerechnet (modifiziert nach Klüber, 1996).

$$K = \left[\frac{M \times (V + S_w)}{1000 \times S_B} \right] \times n \qquad [8]$$

K: Mikromol pro Gramm Trockengewicht Boden [µmol g_{TG}^{-1}]

M: Mit Hilfe der Eichgerade ermittelte Mikromolarität im Bodenextrakt [µM]

V: Volumen der 0,5 M HCl, in das die Probe nach Entnahme pipettiert wurde (im Versuch 4,5 ml)

S: Die Hälfte des Gewichts der Probe (Gewichtsverhältnis Boden:Wasser = 1:2)

S_W: Das Volumen des Wasseranteils [ml] entspricht dem Gewicht des Wasseranteils S_W (die Dichte von Wasser ist 1)

S_B: Die Hälfte des Probengewichts entspricht dem Gewicht des Bodenanteils S_B [g]

n: Verdünnungsfaktor der Probe

6. Molekularbiologische Analysen

Alle Lösungen und Puffer für die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden mit DEPC- (Diethylpyrocarbonat) Wasser (Roth, Karlsruhe) hergestellt und wie unter 2. beschrieben sterilisiert. Durch die Behandlung mit DEPC werden DNA- und RNA-degradierende Enzyme (DNasen bzw. RNasen) inaktiviert und damit ein Abbau der Nukleinsäuren verhindert (Sambrook und Russell, 2001).

6.1 Extraktion der Nukleinsäuren

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial erfolgte mittels einer direkten Lyse-Technik, die auf dem mechanischen Aufschluss von Zellen unter Zugabe von denaturierenden Reagenzien basiert (modifiziert nach Lueders *et al*., 2004a).

Bis zu 0,5 g Probenmaterial wurden zusammen mit 0,7 g sterilen Zirkonium-Kugeln (Ø 0,1 mm; Roth, Karlsruhe), 750 µl Natrium-Phosphatpuffer (120 mM, pH 8,0) und 250 µl TNS-Lösung (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M NaCl, 10% SDS,) in ein 2-ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und durch vortexen homogenisiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einer Zellmühle (FP120 FastPrep™, BIO 101 Savant Instruments Inc., New York, USA) für 45 s bei einer maximalen Beschleunigung von 6,5 m s^{-1}. Um die Zirkonium-Kugeln von dem lysierten Zellmaterial zu trennen, wurde das Homogenat zentrifugiert (20 min, 21.000 *g*, 4°C), der Überstand abgenommen und in ein 2-ml Phase Look Gel™ Heavy-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Proteine, Zellbestandteile und anderen Verunreinigungen wurden mit je einem Volumen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v) aus dem Überstand gefällt. Zur Phasentrennung wurde zwischen beiden Schritten zentrifugiert (5 min, 21.000 *g*, 4°C). Die Verwendung von 2-ml Phase Look Gel™ Heavy-Gefäßen ermöglichte dabei eine optimale Phasentrennung und somit eine erhöhte Ausbeute an Nukleinsäuren. Der gereinigte wässrige Überstand wurde mit zwei Volumen Polyethylenglykol-Lösung (30% (w/v) Polyethylenglykol 6000 in 1,6 M NaCl) gemischt und die Nukleinsäuren durch anschließende Zentrifugation (60 min, 21.000 *g*, 4°C) gefällt. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und erneut abzentrifugiert (30 min, 21.000 *g*, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das gereinigte Pellet in 50–100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen, Hilden) aufgenommen und in ein 0,5-ml Reaktionsgefäß überführt. Der Erfolg der Extraktion wurde durch Agarosegelelektrophorese von 5 µl Nukleinsäureextrakt in einem 1%igen TAE- (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) Agarosegel (SeaKem® LE Agarose, Bioproducts, Rockland, Main) und anschließender Ethidiumbromidfärbung kontrolliert. Als Längenstandard wurde „Smart-Ladder“ (Eurogentec, Köln), mit DNA-Fragmenten definierter Größe (200–10000 bp), aufgetragen. Der Nukleinsäureextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

6.2 DNase Verdau

Zur Gewinnung reiner RNA wurde die in den Nukleinsäureextrakten enthaltene, co-extrahierte DNA mittels DNase-Behandlung verdaut. Hierfür wurden ca. 70 µl Nukleinsäureextrakt mit 40 µl 10x DNase-Puffer (Promega), 15 U RQ1 RNase-freie DNase (Promega) und RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v) wie unter 6.1 beschrieben extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen 100%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und die RNA über Nacht bei –20°C gefällt. Am folgenden Tag wurde die RNA pelletiert (60 min, 21.000 *g*, 4°C) und mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen (30 min, 21.000 *g*, 4°C). Das Ethanol wurde quantitativ entfernt, das RNA-Pellet in 50 µl EB-Puffer resuspendiert und bei –80°C eingefroren. Der vollständige Verdau der DNA wurde gegebenenfalls durch PCR (siehe 6.5) überprüft.

6.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

6.3.1 Photometrische Quantifizierung

Die photometrische Messung von DNA- und RNA-Extrakten sowie aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte mit einem Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA). Hierzu wurden 1,5 µl der zu bestimmenden Probe auf die Messzelle pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration doppelsträngiger DNA bzw. einzelsträngiger RNA ergibt sich aus folgenden Formeln ([9, 10]; Sambrook und Russell, 2001):

DNA: $c = 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260nm}$ [9]

RNA: $c = 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260nm}$ [10]

c: Konzentration von DNA bzw. RNA [ng μl^{-1}]

A_{260nm}: Absorption bei 260 nm

6.3.2 Fluorimetrische Quantifizierung von RNA

Zur exakten Bestimmung von RNA-Konzentrationen in den Ausgangsproben, z.B. für das Ansetzen der Dichtegradienten, wurde die RNA spezifisch mit dem Fluoreszenz-Farbstoff RiboGreen (Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) quantifiziert. Diese fluorimetrische Methode hat den Vorteil, dass ausschließlich Nukleinsäuren angefärbt und detektiert werden und Kontaminationen mit Proteinen und Huminsäuren aus dem Boden die eigentliche Messung nicht beeinflussen. Allerdings ist zu beachten, dass RiboGreen auch an DNA bindet, weshalb die DNA zuvor durch einen DNase Verdau (siehe 6.2) vollständig entfernt werden muss. Für jede Messung wurde eine Verdünnungsreihe mit dem quantitativen Standard des Kits (Ribosomal RNA Standard, 16S und 23S von *E. coli*, 100 ng μl^{-1}) von 0–100 ng μl^{-1} in einer Mikrotiterplatte (Multiple Well Plate 96-Well Flat Bottom with Lid, Sarstedt Inc., Newton, New York, USA) angesetzt. Die zu bestimmenden Proben wurden nach vorheriger photometrischer Messung so verdünnt, dass sie innerhalb der Konzentration des mitgeführten Standards lagen. Es wurde jeweils eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurde jede Standardverdünnung und jede Probe mit der RiboGreen-Lösung (1:360-Verdünnung) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für jede Verdünnung wurde 1x TE-Puffer (200 mM Tris-HCl,

pH 7,5; 200 mM EDTA) verwendet. Die fluorimetrische Messung erfolgte an einem Fluorimeter (Multi-Detection and Fluorescence Plate Reader, SAFIRE, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emission von 516 nm. Die Fluoreszenzwerte des RNA-Standards wurden gegen ihre jeweilige Konzentration [ng μl^{-1}] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Anhand der resultierenden Geradengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten der unbekannten Proben die RNA-Konzentration berechnet werden.

6.4 Isopyknische Auftrennung der RNA

Die Trennung von „schwerer", ^{13}C-markierter und „leichter", unmarkierter RNA erfolgte durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation mit einem Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA) enthaltendem Gradientenmedium (Lueders *et al*., 2004a). Hierfür wurden 4,5 ml CsTFA (2,0 ± 0,05 g ml^{-1}, Amersham Bioscience, Freiburg) mit 175 µl deionisiertem Formamid gemischt. Anschließend wurden 500 ng RNA mit Gradientenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M KCl, 1 mM EDTA) auf ein Volumen von 750 µl aufgefüllt und hinzugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde der Brechungsindex durch Messung eines 65 µl Aliquots mit einem Refraktometer (Reichert GmbH, Seefeld) bestimmt. Der bei der Geräteeinstellung nD-TC, 20°C gemessene Brechungsindex des Gradientenmediums sollte bei 1,3725 ± 0,0002 liegen. Dies entspricht einer CsTFA-Konzentration von ~ 1,79 g ml^{-1}, bei der eine optimale Auftrennung der RNA erzielt wird. Falls notwendig, wurde der Brechungsindex durch weitere Zugabe von CsTFA oder Gradientenpuffer korrigiert. Das Gemisch wurde anschließend in ein 6-ml Polyallomer UltraCrimp-Gefäß (Sorvall, Kendro Laboratory Products, USA) überführt und verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte für 72 h bei 39.000 rpm (130.000 *g*) und 20°C in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery 90SE, TV-865 Vertikalrotor, Kendor Laboratory Products, Langenselbold). Langsames Ausrotieren der Zentrifugation ermöglichte eine Umorientierung der schweren und leichten RNA von einer vertikalen in eine horizontale Schichtung. Die Fraktionierung der Gradienten wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Aladdin AL-1000, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) durchgeführt. Über eine an die Pumpe angeschlossene sterile Kanüle (Ø 0,4 mm) wurde das Gradientenmedium von oben her durch DEPC-Wasser ersetzt (Flussrate 0,75 ml min^{-1}). Durch einen Einstich an der Unterseite des Gradientenröhrchens wurden pro Gradient 14

Fraktionen zu je 375 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde der Brechungsindex bestimmt (siehe oben) und anhand von Gleichung [11] in die entsprechende Dichte umgerechnet.

$$\rho = 257{,}77x^2 - 683{,}57x + 454{,}42 \qquad [11]$$

ρ: Dichte [g ml^{-1}]
x: Brechungsindex der Probe

Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die RNA pelletiert (60 min, 21.000 *g*, 4°C), mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen (45 min, 21.000 *g*, 4°C) und das RNA-Pellet in 30 µl EB-Puffer eluiert.

6.5 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur spezifischen Vervielfältigung von bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Genen (phylogenetisches Markergen) aus Nukleinsäureextrakten angewandt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder für die T-RFLP- oder die vergleichende Sequenz-Analyse (siehe 6.6 und 6.8) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primerkombinationen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für die Definition von Primersequenzen gilt die nach IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) international gültige Nomenklatur für so genannte „*Wobble*"-Positionen: M: A/G, W: A/T, S: G/C, Y: C/T, K: G/T, V: A/G/C, H: A/C/T, D: A/G/T, B: G/C/T, N: A/G/C/T. Dabei handelt es sich um Positionen, an denen zwei, drei oder sogar vier verschiedene Basen in die Nukleotidsequenz eingebaut werden können.

Tabelle 2. Verwendete Primerkombinationen für die spezifische Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Genabschnitte aus den untersuchten Umweltproben sowie klonierter rcDNA-Fragmente aus dem pGEM-T Vektor.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zielgruppe	Referenz
Ba27f*	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	*Bacteria*	(Edwards *et al*., 1989)
Ba907r	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	*Bacteria*	(Muyzer *et al*., 1995)
Ar109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	*Archaea*	(Großkopf *et al*., 1998)
Ar912rt*	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	*Archaea*	(Lueders und Friedrich, 2002)
M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	Insertion	Promega
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Insertion	Promega

f = Vorwärtsprimer, r = Rückwärtsprimer

* Diese Primer wurden fluoreszenzmarkiert in der T-RFLP-Analyse eingesetzt.

Nach der PCR-Reaktion wurde eine Aliquot von 5 µl des erhaltenen Amplifikats durch Agarosegelelektrophorese (siehe 6.1) und anschließende Ethidiumbromidfärbung auf die korrekte Länge überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem MinElute Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um überschüssige Primer, Enzyme, Salze und nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte wurden in 10 µl EB-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

6.5.1 PCR-Amplifikation domänenspezifischer 16S rDNA aus Umweltproben und Klonierungsvektoren

Alle Reaktionen zur Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene aus DNA-Extrakten von Bodenproben und Klonierungsvektoren wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 1x PCR-Puffer (Applied Biosystems), 1,5 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems), 50 µM jedes Desoxynukleosid-triphosphats (Amersham), 0,5 µM beider Primer, 1 U AmpliTaq DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Applied Biosystems) und 1 µl Matrizen-DNA zusammen. Diese wurde meist verdünnt in einer Konzentration von ca. 20–100 ng eingesetzt. Zur Vermeidung von Inhibierungseffekten bei der Amplifikation z.B. durch Huminstoffe, die bei der Nukleinsäureextraktion nicht vollständig entfernt werden konnten, wurde den PCR-Ansätzen 0,2 mg ml^{-1} Bovine Serum Albumin (BSA, Roche) zugesetzt (Kreader, 1996).

Die Konzentrationsangaben der einzelnen Komponenten beziehen sich auf die Endkonzentration im Reaktionsansatz. Bei jeder Amplifikation wurde eine Negativkontrolle ohne Matrizen-DNA mitgeführt, die zur Reinheitskontrolle der eingesetzten Reagenzien und dem Ausschluss von möglichen Kontaminationen diente. Als Positivkontrolle wurden DNA-Extrakte oder Klone von Referenzorganismen verwendet. Zur Vermeidung von unspezifischen Amplifikationen wurden alle PCR-Reaktionen bei 4°C angesetzt und umgehend in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler-Block gestellt („*semi hot-start*"). Die PCR-Reaktionen wurden in einem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprofil standardgemäß durchgeführt: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C, 30–35 Zyklen bestehend aus jeweils 30 s Denaturierung (94°C), 45 s Primeranlagerung (52–55°C) sowie 60 s Elongation (72°C) und 7 min abschließende Elongation bei 72°C.

6.5.2 RT-PCR bakterieller und archaeeller 16S rRNA aus Umweltproben

Die reverse Transkription (RT) von 16S rRNA-Genen aus RNA-Extrakten von Bodenproben und Gradientenfraktionen und die anschließende Amplifikation der ribosomalen 16S copy DNA (16S rcDNA) erfolgte mit dem „One-step" AccessQuick™ RT-PCR-System (Promega). Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1x AMV/Tfl Reaktionspuffer, 1 mM $MgSO_4$, 100 µM jedes Desoxynukleosid-triphosphats, 0,5 µM beider Primer, 0,2 mg ml^{-1} BSA (Roche), 4 U AMV reverse Transkriptase (aus dem Avian Myeloblastis Virus) und 4 U DNA-Polymerase Tfl (aus *Thermus flavus*). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 beschrieben. Bei jeder RT-PCR wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt (siehe 6.5.1). Die reverse Transkription wurde 45 min bei 48°C durchgeführt. Anschließend folgten eine initiale Denaturierung der rcDNA für 2 min bei 94°C und 23 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (30 s, 94°C), Primeranlagerung (30 s, 52–55°C) und Elongation (1 min, 68°C). Die abschließende Elongation erfolgte für 10 min bei 68°C.

6.6 T-RFLP-Analyse

Die Terminale-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus- (T-RFLP) Analyse ist eine einfache und schnelle Methode, um die Diversität und Komplexität mikrobieller Gemeinschaften zu erfassen (Liu *et al*., 1997). Sie ermöglicht das Erstellen von

genetischen Fingerabdrücken („*Fingerprints*“), wodurch man eine Auskunft über die Zusammensetzung sowie über die relative Häufigkeit von Genen in einer Umweltprobe erhält. Die Methode basiert auf der Analyse von PCR-Produkten, die an einem Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind und mit einem spezifischen Restriktionsenzym fragmentiert werden. Dadurch wird nicht das gesamte Fragmentmuster, sondern nur das terminale Restriktionsfragment (T-RF) detektiert. Mit Hilfe von Klonbibliotheken und Sequenzanalysen können die Fragmente bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden.

Die T-RFLP-Analyse bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene wurde mit FAM-(6-Carboxyfluorescein) markierten PCR-Produkten durchgeführt, die mit einem 5'-FAM-markierten Vorwärtsprimer (*Bacteria*) bzw. Rückwärtsprimer (*Archaea*) nach einem Standard-PCR-Protkoll erzeugt wurden (Tab. 2). Die gereinigten Amplifikate wurden einem Restriktionsverdau unterzogen, der in einem Gesamtvolumen von 10 µl 120 ng aufgereinigtes PCR-Produkt, 1 µl 10x Reaktionspuffer (Promega), 2,5 U Restriktions-enzym (Promega) und 1 µg acetyliertes BSA (Promega) enthielt. Bakterielle 16S rcDNA und 16S rRNA-Genamplifikate wurden mit *Msp*I (Schnittstelle 5'-C$^{\blacktriangledown}$CGG-3'; Promega), archaeelle mit *Taq*I (Schnittstelle 5'-T$^{\blacktriangledown}$CGA-3'; Promega) verdaut. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C (*Msp*I) bzw. 65°C (*Taq*I) im Dunkeln wurde der Ansatz über SigmaSpin™ Post-Reaction Purification Columns (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. 1,5 µl des Verdaus wurden mit 11 µl deionisiertem Formamid (Hidi; Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) und 0,2 µl des internen Längenstandards (X-Rhodamine MapMarker®, BioVentures, Murfreesboro, Tenessee, USA) gemischt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die T-RFLP-Analyse wurde auf einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applera Deutschland GmbH) durchgeführt. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung wurde die Länge und relative Häufigkeit FAM-markierter terminaler Restriktionsfragmente durch Detektion der Fluoreszenz mit einem Argonlaser ermittelt. Die Elektropherogramme wurden mit Hilfe der GENESCAN Analysis Software 3.1 (Applied Biosystems) ausgewertet. Fragmente mit einer Länge ≤ 50 bp wurden grundsätzlich von der Analyse ausgeschlossen, um vorhandene Primer-Dimere auszuschließen. Die in dieser Arbeit angegebenen Längen der terminalen Restriktionsfragmente sind Näherungswerte. Die tatsächlichen Längen können bei der Analyse mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer um bis zu acht bp abweichen (Kaplan und Kitts, 2003).

Um die relativen Häufigkeiten detektierter T-RFs in verschiedenen T-RFLP-Profilen mittels statistischer Methoden miteinander vergleichen zu können (siehe 8.1), wurden die T-RFLP-Daten auf gleiche Gesamt-Peakhöhe normalisiert. Dazu wurde ein iteratives Verfahren nach Dunbar (Dunbar *et al*., 2001) angewendet, bei dem wiederholt alle Peak-Höhen der miteinander zu vergleichenden Profile mit einem Faktor multipliziert werden, der von der niedrigsten aller Gesamt-Peakhöhen bestimmt wird. Sukzessiv wurden alle Peaks mit einer Höhe ≤ 50 Fluoreszeneinheiten eliminiert, bis alle Profile die gleiche Gesamt-Peakhöhe aufwiesen. Die Peak-Höhe jedes T-RFs der Profile wurde als Maß für die Abundanz der Arten gewählt und in prozentuale Anteile an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft umgerechnet.

6.7 Erstellung von 16S rRNA-Klonbibliotheken

Aus Gradientenfraktionen amplifizierte 16S rcDNA-Fragmente wurden über Klonierung vereinzelt, um ihre Sequenzierung und phylogenetische Einordnung zu ermöglichen. Für die Klonierung wurde das pGEM®-T Vektor System II (Promega) verwendet. Hierzu wurden die aufgereinigten Amplifikate gemäß den Angaben des Herstellers in den pGEM®-T Vektor (Promega) ligiert und anschließend über hochkompetente *E. coli* JM109 Zellen (Promega) kloniert. Die transformierten Zellen wurden auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Nährböden angezogen und über „Blau-Weiß-Kontrolle“ selektioniert. Durch Aufkochen (10 min, 100°C) wurde die DNA aus den transformierten Zellen gewonnen. Anschließend wurden die klonierten DNA-Inserts über PCR mit Vektor-gerichteten Primern (Tab.2) amplifiziert und deren korrekte Länge mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

6.8 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Amplifikate wurde nach dem Prinzip des Kettenabbruchs (Sanger *et al*., 1977) durchgeführt. Die in dem Reaktionsansatz enthaltenen 5'-fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) bewirken den Abbruch der Polymeraseaktivität während der Doppelstrang-Synthese. Nach Abschluss der Sequenzierreaktion erhält man ein Gemisch aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert sind. Nach

kapillarelektrophoretischer Auftrennung des Gemischs lässt sich die Basensequenz der DNA-Matrize anhand der Fluoreszenzsignale ablesen.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 mit AmpliTaq® DNA-Polymerase FS (Applied Biosystems) durchgeführt. Von jedem M13-Amplifikat wurden Vorwärts- und Rückwärtsstrang sequenziert. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 20 µl ca. 80–100 ng amplifizierte Matrizen-DNA, 0,25 µM eines geeigneten Sequenzierprimers (Tab. 2), 2 µl BigDye 5x Puffer und 3 µl BigDye Reaction Mix. Die Reaktion wurde nach 30 s Denaturierung bei 96°C mit 30 Zyklen (10 s 96°C, 5 s 50°C, 4 min 60°C) in einem GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) mit einer Heizrate von 1°C s^{-1} durchgeführt. Anschließend wurde die Sequenzierreaktion über SigmaSpin™ Post-Reaction Purification Columns (Sigma-Aldrich) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt, unter Vakuum getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg), in 20 µl deionisiertem Formamid (Hi-Di) resuspendiert, 3 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Sequenzanalyse erfolgte auf einem Kapillarsequenzierer ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Ein Großteil der Sequenzierreaktionen erfolgte extern am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (ADIS, Köln). Hierzu wurden die unaufgereinigten M13-Amplifikate der Klone in 96-well-Mikrotiterplatten versendet.

7. Bioinformatische Analysen

7.1 Sequenzverarbeitung

Die 16S rRNA-Rohsequenzdaten wurden als Elektropherogramme mit dem Programm Seqman II (DNASTAR, Madison, USA) einer Qualitätskontrolle unterzogen und editiert. Überhänge aus Vektorsequenzen wurden entfernt, Teilsequenzen und komplementäre Sequenzen wurden zu Gesamtsequenzen vereinigt und die überlappenden Sequenzbereiche auf Basenunterschiede kontrolliert. Gegebenenfalls wurden falsch identifizierte Basen manuell korrigiert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden zu einer ersten phylogenetischen Einordnung mittels einer BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) mit Einträgen in öffentlichen Datenbanken (z.B. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.n) verglichen. Die am nächsten verwandten Sequenzen von Umweltklonen und Reinkulturen wurden in die eigene 16S rRNA-Gendatenbank importiert.

7.2 Phylogenetische Analyse von 16S rRNA-Genen

Die phylogenetische Einordnung, Verrechnung und Darstellung von 16S rRNA-Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Software ARB (Datenbank-Version corrected-Jan04, erschienen Januar 2005; erhältlich unter http://www.arb-home.de; Ludwig *et al*., 2004). Neu importierte Sequenzen wurden mit dem automatischen FAST ALIGNER mit bereits vorhandenen, nahe verwandten Sequenzen in ein Alignment gebracht (Ludwig, 1995). Die jeweils homologen Nukleotidpositionen wurden so auch in den hypervariablen Regionen der 16S rRNA (Gutell *et al*., 1994) untereinander in Spalten angeordnet. Anschließend wurde das Alignment überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Die neuen Sequenzen wurden dann mit der Maximum-Parsimony-Methode (Fitch, 1971) des ARB-Programms unter Anwendung eines geeigneten Basenfrequenz-Filters für die jeweils bearbeitete phylogenetische Gruppe (z.B. für *Bacteria*, bacteria_rrn5_dec04) in den „Gesamtbaum“ der Datenbank eingefügt. Durch die Verwendung dieser Filter werden nur diejenigen Nukleotidpositionen in die Berechnungen miteinbezogen, die bei einem definierten Prozentsatz (z.B. 50%) der Sequenzen konserviert sind. Hochvariable Regionen der 16S rRNA, deren phylogenetischer Informationsgehalt aufgrund hoher Mutationsraten anzuzweifeln ist, werden somit aus den Berechnungen ausgeschlossen. Dieser vorläufige Baum diente als Grundlage für weitergehende phylogenetische Berechnungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit rekonstruierten phylogenetischen Bäume wurden anschließend auf der Grundlage von geeigneten Referenzsequenzen von Reinkulturen und Umweltklonen und einer von der ARB-Software berechneten und korrigierten Distanzmatrix erstellt. Dabei werden Sequenzdifferenzen aus dem Alignment paarweise in eine Distanzmatrix umgerechnet, die dann nach verschiedenen Evolutionsmodellen (z.B. Felsenstein, 1981) in phylogenetische Distanzen umgerechnet wird. Die Distanzwerte wurden danach mit der Neighbor-Joining Methode (Saitou und Nei, 1987) in Dendogrammen dargestellt. Kürzere Sequenzen wurden unter Anwendung des Maximum-Parsimony-Tools nachträglich in den Baum eingeordnet, ohne die Topologie des zugrunde liegenden Baumes zu verändern (Ludwig *et al*., 1998).

Mit Hilfe des *in silico* „T-RF-Cut-Tools“ (Ricke *et al*., 2005) wurde von allen erzeugten Klonsequenzen und ausgewählten Referenzsequenzen die Restriktionsschnittstelle für *Msp*I (*Bacteria*) bzw. *Taq*I (*Archaea*) bestimmt. Auf diese Weise konnten die mittels T-RFLP-Analyse (siehe 6.6) detektierten T-RFs in den Umweltproben und Gradientenfraktionen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Um diese

phylogenetische Zuordnung zu bestätigen, wurde von zufällig ausgewählten Klonsequenzen das *in vitro* T-RF bestimmt. Der „T-RF-Cut-Tool“ ist in der ARB-Software implementiert und kann bei allen Sequenzen angewendet werden, die zuvor in ein Alignment gebracht wurden. Bei der Berechnung der Schnittstelle werden die Primerposition, die Primerlänge und das Restriktionsenzym berücksichtigt.

7.3 Identifizierung von chimären Sequenzen

Alle in dieser Arbeit erzeugten Klonsequenzen wurden mit dem Softwareprogramm Mallard (Ashelford *et al*., 2006) und dem Bellerophon-Server (http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl; Huber *et al*., 2004) auf chimäre Sequenzen, d.h. auf Mischprodukte aus Sequenzen phylogenetisch verschiedener Organismen, die als Artefakte während der PCR entstehen können, überprüft. Die von diesen Programmen als potentielle Chimären identifizierten Sequenzen wurden einem so genannten „*fractional treeing*“ unterzogen (Ludwig *et al*., 1997). Ergab sich unter Berücksichtigung der vorderen Hälfte einer Sequenz eine signifikant andere phylogenetische Einordnung als unter Berücksichtigung der zweiten Hälfte, so deutete dies auf eine chimäre Sequenz hin. Diese wurde aus der Datenbank entfernt und von weiteren Analysen ausgeschlossen.

8. Berechnung ökologischer Indizes

8.1 Ähnlichkeit und Diversität mikrobieller Gemeinschaften

Mikrobielle Gemeinschaften können untereinander anhand ihrer T-RFLP-Profile mit Hilfe von ökologischen Indizes (Übersicht bei Hill *et al*., 2003) verglichen werden, wenn man die einzelnen T-RFs als Arten und ihre relative Höhe (bezogen auf die Gesamt-Peakhöhe eines Profils) als ein Maß für deren Häufigkeit interpretiert. Zum Vergleich der Diversität verschiedener Profile wurde der Dominanz-Index *l* nach Simpson berechnet (Dollhopf *et al*., 2001), wobei n_i die Anzahl der Individuen von der Art *i*, *N* die Gesamtzahl aller Individuen und *s* die Gesamtzahl aller Arten in der untersuchten Gemeinschaft beschreibt (Gleichung [12]).

$$l = \frac{\sum_{i-1}^{s} (n_i (n_i - 1))}{N (N - 1)} \qquad [12]$$

Um die paarweise Ähnlichkeit von T-RFLP-Profilen zu vergleichen, wurde der Morisita-Index I_M [13], basierend auf dem Dominanz-Index l nach Simpson, berechnet.

$$I_M = \frac{2 \sum n_{1i} n_{2i}}{(l_1 + l_2) N_1 N_2} \qquad [13]$$

Mit diesem Index werden zwei mikrobielle Gemeinschaften auf Grundlage des Vorkommens von bestimmten Arten sowie deren Häufigkeit miteinander verglichen. Morisita-Indizes liegen zwischen 0 und 1, wobei 1 eine völlige (100%ige) Identität der beiden analysierten Gemeinschaften bedeutet.
Für die Berechnungen der Indizes wurde die PAST-Software (PAlaeontological STatistics, ver. 1.79; http://folk.uio.no/ohammer/past; Hammer *et al*., 2001) verwendet.

8.2 Abschätzung des Artenreichtums

Für die Abschätzung des Artenreichtums einer mikrobiellen Gemeinschaft wurden die Sequenzinformationen aller Klone einer Klonbibliothek in Form einer Ähnlichkeitsmatrix (PHYLIP Distance-Matrix-Programm, v.3.573c) aus der ARB-Datenbank exportiert und mit Hilfe des Programms DOTUR ausgewertet (Schloss und Handelsman, 2005). Als Arten, Gattungen und Familien wurden dazu Klongruppen definiert, deren 16S rRNA-Gene eine Sequenzidentität von mindestens 97%, 95% bzw. 90% aufwiesen (Stackebrandt und Goebel, 1994). Anschließend wurde in einem Diagramm die Anzahl an beobachteten OTUs (operational taxonomic units) über die Anzahl der beprobten Sequenzen aufgetragen. Die Steilheit der Kurve zeigte an, ob die Menge an analysierten Klonen zur Abdeckung der zu Grunde liegenden Diversität ausreichend war.

Zusätzlich wurde für jede Klonbibliothek die „*Coverage*“ mit folgender Gleichung [14] berechnet (Wagner *et al*., 2002):

$$C = [1 - (n_1 \times N^{-1})] \times 100 \qquad [14]$$

C: Coverage [%]
n_1: Anzahl an OTUs, die nur eine Sequenz enthalten
N: Gesamtzahl der 16S rRNA-Sequenzen in der analysierten Klonbibliothek

Die Einschätzung des Artenreichtums der mikrobiellen Gemeinschaft gibt Aufschluss darüber, inwieweit die Anzahl der untersuchten Klone die Diversität im untersuchten System erfasst hat. Die „*Coverage*“ hat einen Wert zwischen 0 und 100, wobei 100% bedeutet, dass die Diversität im System mit der Anzahl der analysierten Klone komplett abgedeckt wurde.

III. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die aus dieser Studie hervorgegangenen Publikationen und Manuskripte dargestellt. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Charakterisierung und Identifizierung der eisenreduzierenden mikrobiellen Gemeinschaft im Reisfeldboden mittels Stabiler Isotopenbeprobung. Im ersten und zweiten Teil wird die Acetat-assimilierende Gemeinschaft unter Verwendung von Ferrihydrit, Goethit, Lepidokrokit und Hämatit als Elektronenakzeptor beschrieben. Im zweiten Teil wird außerdem der Einfluß der verschiedenen Eisen(III)-Oxide auf die mikrobielle Gemeinschaft im Reisfeldboden dargestellt. Der dritte Teil beschäftigt sich mit der Oxidation von Lactat und dessen Abbauprodukten (Acetat und Propionat) unter eisenreduzierenden und methanogenen Bedingungen.

1. Hori, T., Müller, A., Igarashi, Y., Conrad, R. und Friedrich, M.W. (eingereicht) Identification of ferrihydrite- and goethite- reducing microorganisms in anoxic paddy soil by ^{13}C-acetate probing. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *ISME Journal*.

2. **Müller, A. und Friedrich, M.W.** Distinct Fe(III) oxide mineral phases select for individual iron-reducing microbial populations in anoxic rice field soil. Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

3. **Müller, A., Fuhr, M.K., Pommerenke, B. und Friedrich, M.W.** Identification of lactate-utilizing populations under iron-reducing conditions in rice field soil by stable isotope probing. Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

1. Identifizierung von Ferrihydrit- und Goethit-reduzierenden Mikroorganismen in anoxischem Reisfeldboden mittels ^{13}C-Acetat Beprobung

Tomoyuki Hori, Alexandra Müller, Yasuo Igarashi, Ralf Conrad und Michael W. Friedrich

Zusammenfassung. Die Reduktion von Eisen ist einer der wichtigsten terminalen Elektronen-akzeptierenden Prozesse in anoxischem Reisfeldboden. Dennoch ist bisher wenig über die Identität von eisenreduzierenden Mikroorganismen bekannt.

In dieser Studie wurden Acetat-metabolisierende Mikroorganismen in Anwesenheit von Eisen(III)-Oxiden mittels RNA-basierender Stabiler Isotopenbeprobung identifiziert. Nach der Reduktion von endogenem Fe(III) für 21 Tage erfolgte die Beprobung der Reisfeldboden-Inkubationen mit ^{13}C-markiertem Acetat (2 mM) und Eisen(III)-Oxiden (Ferrihydrit und Goethit) für 48 und 72 Stunden. Die Reduktion von Ferrihydrit war mit einer starken Suppression der Methanogenese (77%) verbunden. Die bakterielle und archaeelle Gemeinschaft wurde mittels T-RFLP Analyse, Klonierung und Sequenzierung der 16S rRNA untersucht. In den Ansätzen mit Ferrihydrit wurden *Geobacter* spp. (~85% der Klone) als die dominierende ^{13}C-assimilierende Gemeinschaft identifiziert. In den schweren Fraktionen der Mikrokosmen mit Goethit waren überwiegend *Geobacter* spp. (~30%), *Anaeromyxobacter* spp. (~30%) und neuartige β-*Proteobacteria* an der Assimilation von ^{13}C-Acetat beteiligt. Diese Populationen wurden in den schweren Fraktionen der Kontrolle nicht detektiert.

In dieser Studie konnten erstmals Acetat-oxidierende und eisenreduzierende Bakterien als funktionelle Gilde identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, das *Geobacter* spp. und *Anaeromyxobacter* spp. unterschiedliche Präferenzen für die Reduktion von Ferrihydrit und Goethit besitzen.

Identification of ferrihydrite- and goethite-reducing microorganisms in anoxic paddy soil by ^{13}C-acetate probing

(Submitted to *ISME Journal*)

Tomoyuki Hori, Alexandra Müller, Yasuo Igarashi, Ralf Conrad and Michael W. Friedrich

Abstract. In anoxic rice field soil, ferric iron reduction is one of the most important terminal electron accepting processes, yet little is known about the identity of iron-reducing microorganisms.

Here, we identified acetate-metabolizing bacteria by RNA-based stable isotope probing in the presence of Fe(III) oxides as electron acceptors. After reduction of endogenous Fe(III) for 21 days, isotope probing with ^{13}C-labelled acetate (2 mM) and added ferric iron oxides (ferrihydrite or goethite), was performed in rice field soil slurries for 48 and 72 hours. Ferrihydrite reduction coincided with a strong suppression of methanogenesis (77%). Extracted RNA from each treatment was density-resolved by isopycnic centrifugation, and analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), followed by cloning and sequencing of 16S rRNA of bacterial and archaeal populations. In 'heavy', isotopically labelled RNAs of the ferrihydrite treatment, predominant ^{13}C-assimilating populations were identified as *Geobacter* spp. (~85% of all clones). In the goethite treatment, *Geobacter* spp. (~30%), the δ-proteobacterial *Anaeromyxobacter* spp. (~30%), and novel β-*Proteobacteria* were predominant in 'heavy' rRNA fractions clearly indicating that ^{13}C-acetate had been assimilated, whereas in the control 'heavy' RNA was not detected. For the first time, active acetate-oxidizing Fe(III)-reducing bacteria, including novel hitherto unrecognized populations, were identified as a functional guild in anoxic paddy soil. Moreover, *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. were found to exhibit different propensities to reduce the differently crystalline iron oxides ferrihydrite and goethite.

INTRODUCTION

The degradation of organic matter in flooded rice field soils is accomplished by several guilds of microorganisms that operate the anaerobic microbial food chain (Conrad, 1996; Schink, 1997). Most of the electrons from substrate oxidation flow into methanogenesis as predominant terminal reduction processes in rice paddies, however, iron oxide reduction is the second most important electron sink (Yao *et al*., 1999). Conceptually, iron oxide reduction occurs directly after flooding of rice field soil, and at interfaces such as water-soil and the rhizosphere, where oxygen diffusion fuels the re-oxidation of Fe(II) in steep chemical gradients (Conrad, 2007; Conrad and Frenzel, 2002). After flooding oxidants (oxygen > nitrate > sulfate > iron(III) oxides) are reduced sequentially according to the thermodynamic theory (Patrick, Jr. and Reddy, 1978; Ponnamperuma, 1972). In many rice field soils, the duration of the iron reduction phase determines the onset of methanogenesis, whereas in iron-rich acidic sulfur soils methanogenesis might not commence at all due to the presence of oxidants (Yao *et al*., 1999). The suppression of methanogenesis most likely originates from outcompetition of methanogens by iron-reducing microorganisms for common electron donors (Achtnich *et al*., 1995a; Chidthaisong and Conrad, 2000) but direct inhibition of methanogens by ferric iron is also discussed (van Bodegom *et al*., 2004). Accordingly, addition of weakly crystalline ferric iron oxides (i.e., ferrihydrite) effectively suppresses methanogenesis (Achtnich *et al*., 1995a; Jäckel and Schnell, 2000; Lueders and Friedrich, 2002; Qu *et al*., 2004), whereas more crystalline iron oxides such as lepidocrocite, goethite, and hematite are less effective (Qu *et al*., 2004). Iron fertilization has been suggested as strategy for mitigation of methane emission from rice paddies (Furukawa and Inubushi, 2002; Jäckel *et al*., 2005). However, the biogeochemical details of microbial iron cycling and methane suppression in rice field soils are not well known nor are the microorganisms involved (Conrad, 2007). Compared to the numerically abundant polymer hydrolyzing and fermenting microorganisms in rice field soil (up to 10^{10} cells per g dry weight soil), dissimilatory iron-reducing populations are three orders of magnitude smaller but still significantly more abundant (one order) than methanogens (Frenzel *et al*., 1999). Potentially involved in iron reduction are *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp., which were detected by molecular surveys in bulk soil, on rice roots, or were retrieved by cultivation (Hengstmann *et al*., 1999; Scheid *et al*., 2004; Treude *et al*., 2003). However, dissimilatory iron reduction has so far not been directly linked to specific populations in rice field soil.

A direct way of linking identity of microorganisms to a specific function is stable isotope probing (SIP) of nucleic acids (Radajewski *et al*., 2000), and in particular of RNA (Manefield *et al*., 2002). Nucleic acid SIP capitalizes on the incorporation of heavy stable isotopes (^{13}C, ^{15}N, ^{18}O) into RNA (or DNA), the physical separation of labelled, isotopically 'heavy' RNA from unlabelled, 'light' RNA, and subsequent identification of actively label incorporating populations by cloning and sequencing of 'heavy' RNA. In rice field soil, the known iron-reducing bacteria *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. were recently found by SIP to assimilate ^{13}C-labelled acetate in the methanogenic phase, i.e., when the iron reduction phase had already ceased, and presumably easily bio-reducible Fe(III) oxides were not available (Hori *et al*., 2007).

Ferrihydrite and goethite are the most abundant ferric iron minerals in soils but not much is known about the identity of iron-reducing bacteria capable of reducing these iron mineral phases. In pure culture experiments, hydrous ferric oxide (HFO) and ferrihydrite, two iron mineral phases with low crystallinity, were reduced at higher rate than phases with a higher crystallinity such as goethite (Roden *et al*., 2003).

The objective of our study was to identify the active acetate-assimilating microbes in anoxic paddy soil that utilize added ferric iron oxides as terminal electron acceptor, i.e., ferrihydrite and goethite. To this end, we performed a combined analysis of geochemical processes and RNA-based stable isotope probing.

RESULTS

Iron reduction and acetate turnover in slurry incubations

For the main experiment with "recycled" soil, the pre-incubated anoxic slurry was supplemented with ferric iron oxides (i.e., ferrihydrite or goethite) and ^{13}C-labelled acetate (20 μmol in total) at the start of the incubation. The final amount of ferric iron oxide was 140 μmol g^{-1}, which was sufficient for complete oxidation of the supplied acetate. Geochemical liquid-phase parameters (i.e., ferrous iron, total iron, and acetate concentrations) and the gaseous phase (i.e., CH_4 and CO_2 concentrations, and the ^{13}C atoms percent) were monitored over the duration of the experiments.

Ferrous iron [Fe(II)] was formed in the ferrihydrite treatment but was not detectable in goethite and control treatments (Fig. 1A, B, and C). In the ferrihydrite treatment, Fe(II) concentration increased gradually from 75 μmol g^{-1} at the beginning of the incubation to approximately 100 μmol g^{-1} at 72 h. Total extractable iron remained constant at

~120 µmol g^{-1} during incubation. Thus, part of the ferric iron, mostly consisting of the supplemented ferrihydrite, was reduced to ferrous iron. In the goethite treatment, both total iron and ferrous iron remained at a low level (i.e., 70−80 µmol g^{-1}) throughout the incubation. Certain iron oxides including goethite, and also magnetite as a possible product of ferric iron reduction are known for inefficient extraction by HCl (0.5 M) (Raiswell *et al*., 1994).

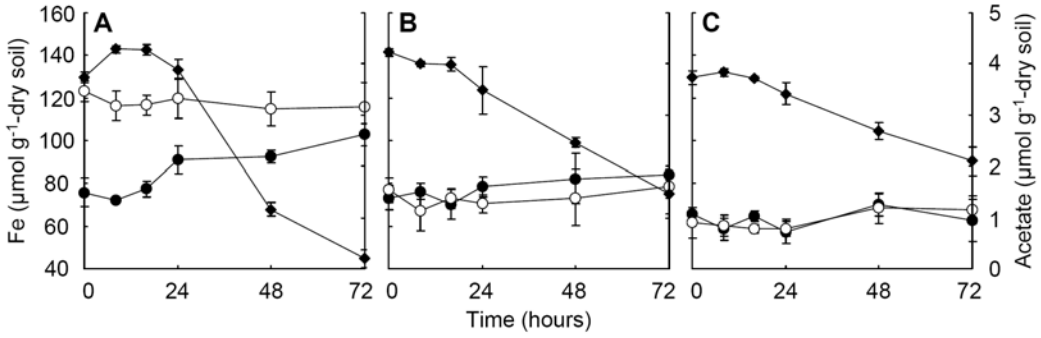


Figure 1. Kinetics of total iron (○), ferrous iron (●), and acetate (♦) during the anoxic incubations of rice field slurries. Treatments with (A) ferrihydrite, (B) goethite (C) control (no iron oxide added). The error bars indicate the standard deviations of three replications.

Acetate consumption in ferrihydrite treatment was much more vigorous compared to goethite and control treatments (Fig 1A, B, and C). After a short lag phase, acetate was almost completely degraded (~95%, 0.2 µmol g^{-1} residual acetate) in the ferrihydrite treatment within 72 h of incubation. The stoichiometry of acetate:Fe(II) formed (1:8.6) closely matched the expected ratio of 1:8 for acetate dependent ferric iron reduction. In goethite and control treatments, residual acetate concentrations were 65% (1.5 µmol g^{-1}) and 44% (2.1 µmol g^{-1}) after 72 h, respectively.

CH_4 production was largely suppressed in the presence of ferrihydrite but not by goethite (Fig. 2A, B, and C). The concentration of CH_4 in the ferrihydrite treatment increased only moderately to 0.4 µmol g^{-1} after 72 h. In goethite and control treatments, CH_4 initially (i.e., 24 hours) increased gradually and thereafter, rapidly to 1.3 µmol g^{-1} after 72 h. CO_2 production was apparently lower in the presence of ferrihydrite, while it was slightly restrained by that with goethite (Fig. 2A, B, and C); the formation of siderite (Fe_2CO_3) from ferrous iron and carbonate might have masked the formation of gaseous CO_2, and therefore, less CO_2 formation was detected.

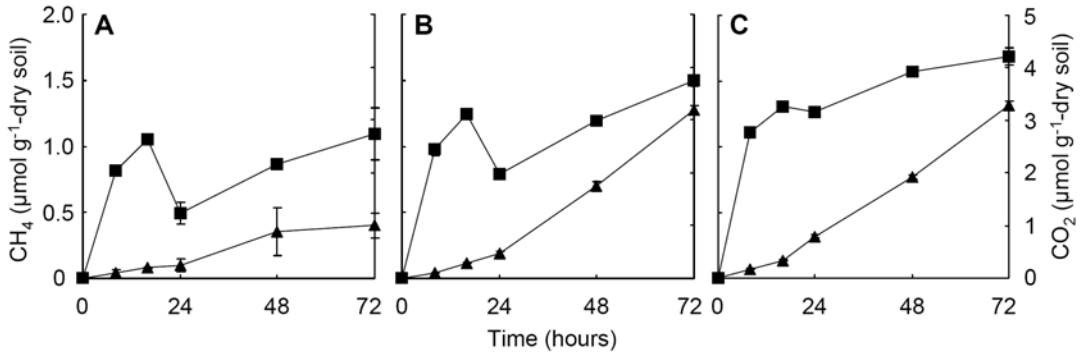


Figure 2. Kinetics of CH_4 (▲) and CO_2 (■) during the incubation of rice field slurries. Treatments with (A) ferrihydrite, (B) goethite, (C) control (no iron oxide added). The error bars present the standard deviations of three replications.

The fate of ^{13}C-acetate was traced by following the ^{13}C atom percentage of gaseous products CH_4 and CO_2 over time (Fig. 3A, B, and C). After rapid initial increases in all treatments, the ^{13}C atoms percent of CH_4 varied between 55-60% (ferrihydrite) and up to 80% (goethite, and control) indicating that methane was formed to a large extent from added ^{13}C-acetate. By contrast, the increase of ^{13}C atom percent of CO_2 (up to 15% in 72 h) revealed no difference among treatments. Overall, acetoclastic $^{13}CH_4$ formation was significantly suppressed in the ferrihydrite treatment (77%) but not much by goethite (9%; Fig. 3D, E, and F), whereas $^{13}CO_2$ formation was not affected. Microcosms with "fresh" soil had similar biogeochemical kinetics, however, methane formation was suppressed only by 13%; which was probably a consequence of the lower amount of ferrihydrite added and higher organics and nitrogen content than in "recycled" soil.

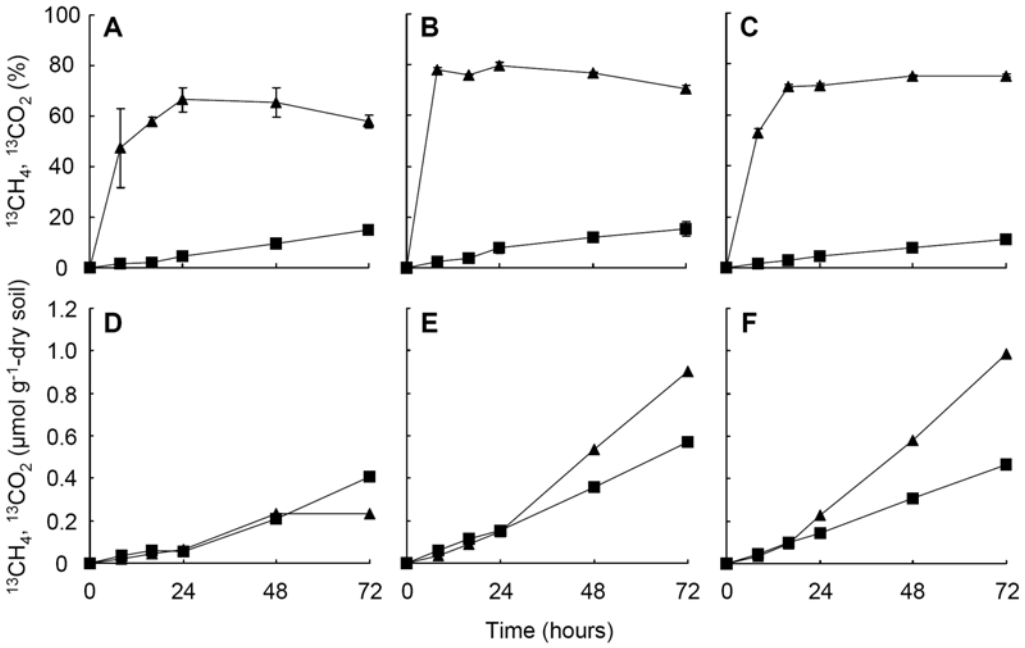


Figure 3. Conversion of ^{13}C-labelled acetate to $^{13}CH_4$ and $^{13}CO_2$ during incubation of the ferrihydrite (A and D), goethite (B and E), and control treatments (C and F). (A, B, and C) Change in ^{13}C atom percent of CH_4 (▲) and CO_2 (■) in the headspace. The error bars indicate the standard deviations of three replications. (D, E, and F) Time course of $^{13}CH_4$ (▲) and $^{13}CO_2$ (■) concentrations.

Bacterial and archaeal community dynamics in density gradient fractions of RNA

RNA-based stable isotope probing was performed to identify microorganisms capable of acetate assimilation in all treatments of recycled soil after 72 h of incubation. Sufficient amounts of supplemented ^{13}C-labelled acetate had been metabolized in ferrihydrite, goethite, and control treatments (95%, 65%, and 44% respectively). Isotopically 'heavy', ^{13}C-labelled RNA extracted from samples of each soil microcosm was density-separated from the unlabelled bulk RNA by isopycnic centrifugation. Density-resolved bacterial and archaeal RNA were subjected to RT-PCR-mediated T-RFLP analyses (Fig. 4) to trace differences in community composition along RNA density.

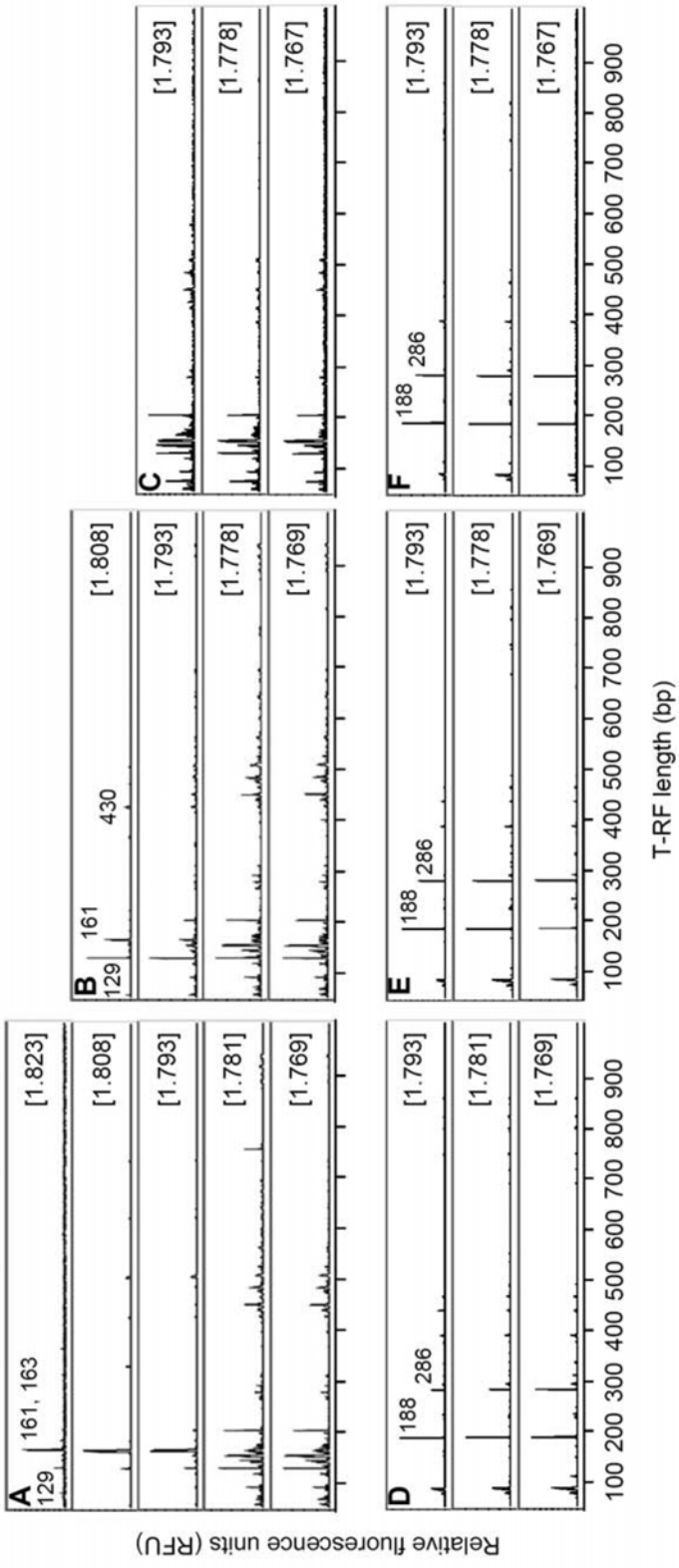


Figure 4. T-RFLP analysis of density-resolved bacterial (A, B, and C) and archaeal (D, E, and F) 16S rRNA derived from the ferrihydrite (A and D), goethite (B and E), and control treatments (C and F) after 72 h with recycled soil. The CsTFA BDs (g ml^{-1}) of the fractions are shown in brackets. The T-RF size is given in base pairs.

Bacteria specific amplicons were obtained from fractions with highest buoyant densities (BDs; up to 1.823 g ml^{-1}) only for the ferrihydrite treatment, which corresponded to the density of fully ^{13}C-labelled *E.coli* rRNA (Lueders *et al*., 2004a). Less label had been incorporated by Bacteria in treatments with goethite (up to 1.808 g ml^{-1}) and the control (up to 1.793 g ml^{-1}; Fig. 4). The T-RFLP fingerprinting patterns of all treatments were highly similar in 'light' RNA fractions (BDs of 1.767 to 1.781 g ml^{-1}; Fig. 4A, B, and C). The community profile clearly changed with increasing BD only in treatments with ferrihydrite and goethite. In the ferrihydrite treatment, two major T-RFs (161 and 163 bp, ~85% of total peak heights) and a minor T-RF (129 bp; ~8%) predominated in 'heavy' fractions (BDs $\geq$ 1.793 g ml^{-1}). Likewise, in the goethite treatment, these peaks were predominant, however, the 129 bp T-RF was now as abundant (~45%) as the 161 bp and 163 bp T-RFs (~44%; BD $\geq$ 1.793 g ml^{-1}); a third peak of 430 bp T-RF (4.4%) was detectable in the highest density fraction (BD of 1.808 g ml^{-1}). From treatments with "fresh" soil, Bacteria-specific RT-PCR amplicons were obtained from high buoyant density (BD > 1.82 g ml^{-1}) fractions after 48 h of stable isotope probing (Fig. 5). Three major T-RFs (129, 161, and 163 bp) were likewise predominant (14, 23, 23 % of total peak height, respectively) in fractions with high (1.828 g ml^{-1}) but also in fractions with intermediate BD (> 1.804 g ml^{-1}). Moreover, intermediate BD fractions had a major T-RF with 504 bp (19%) and two smaller T-RFs with 428 and 430 bp (~5%) indicating the presence of a more diverse community responsive to ^{13}C-acetate amendment than in the recycled soil.

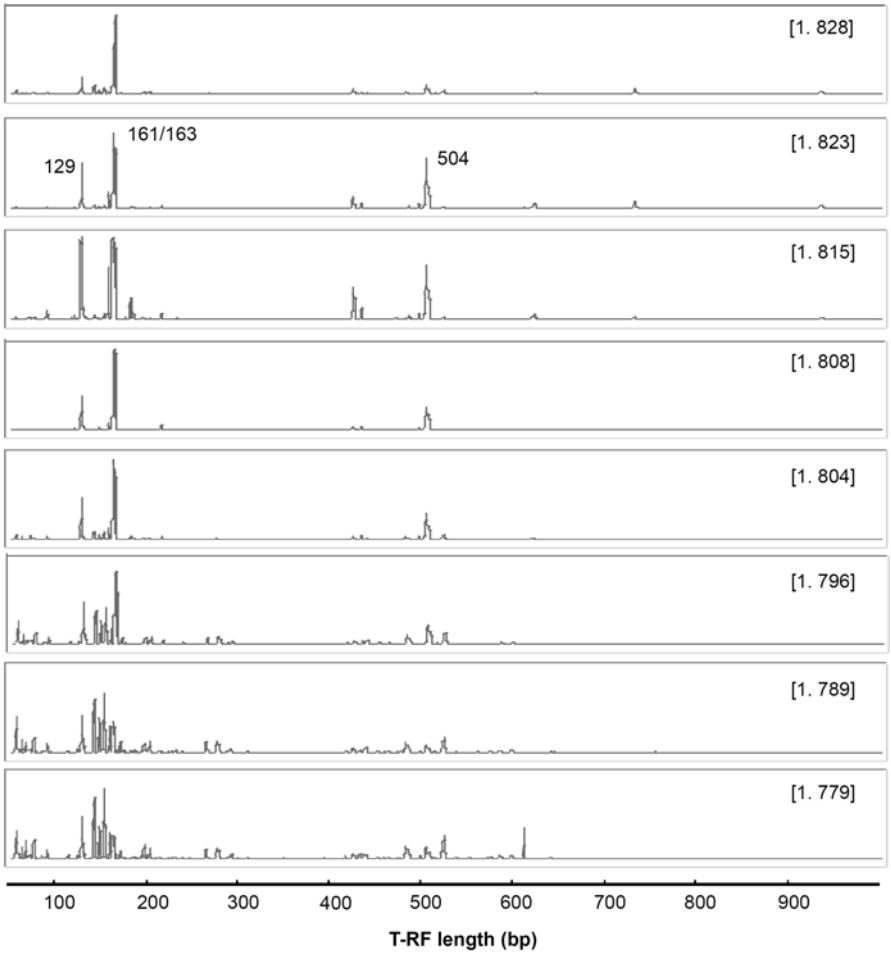


Figure 5. T-RFLP analysis of density-resolved bacterial 16S rRNA derived from the ferrihydrite treatment with fresh soil after 48 h of incubation. The CsTFA BDs (g ml^{-1}) of the fractions are shown in brackets. The T-RF length is given in base pairs.

Archaeal rRNA templates from all treatments were amplified only from 'light' RNA fractions (BDs of 1.769 to 1.793 g ml^{-1}) despite a higher cycle number (23 cycles) used than in Bacteria-targeting RT-PCR (20 cycles) indicating low archaeal abundance. T-RFLP fingerprinting patterns were not significantly different between goethite and control treatments (Fig. 4). Two dominant T-RFs of 188 bp and 286 bp were detected throughout the density fractions of RNA. In the ferrihydrite treatments, the relative abundance of the 286 bp T-RF appeared to decrease as increasing BDs of the density fractions. Most likely, T-RFs of 188 and 286 bp correspond to *Methanosarcina* spp. and *Methanosaeta* spp.,

respectively, as was previously shown (Chin *et al*., 2004; Lueders and Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al*., 2001; Weber *et al*., 2001).

Phylogenetic identification of microorganisms incorporating ^{13}C-acetate

Major populations represented by T-RFLP profiling in 'heavy' gradient fractions were identified by cloning and sequencing of randomly selected clones of treatments with ferrihydrite (FH, n = 61 clones), goethite (GH, n = 58 clones), and control (CH, n = 53 clones). Phylogenetic affiliations and numbers of the 16S rRNA clones are shown in Table 1.

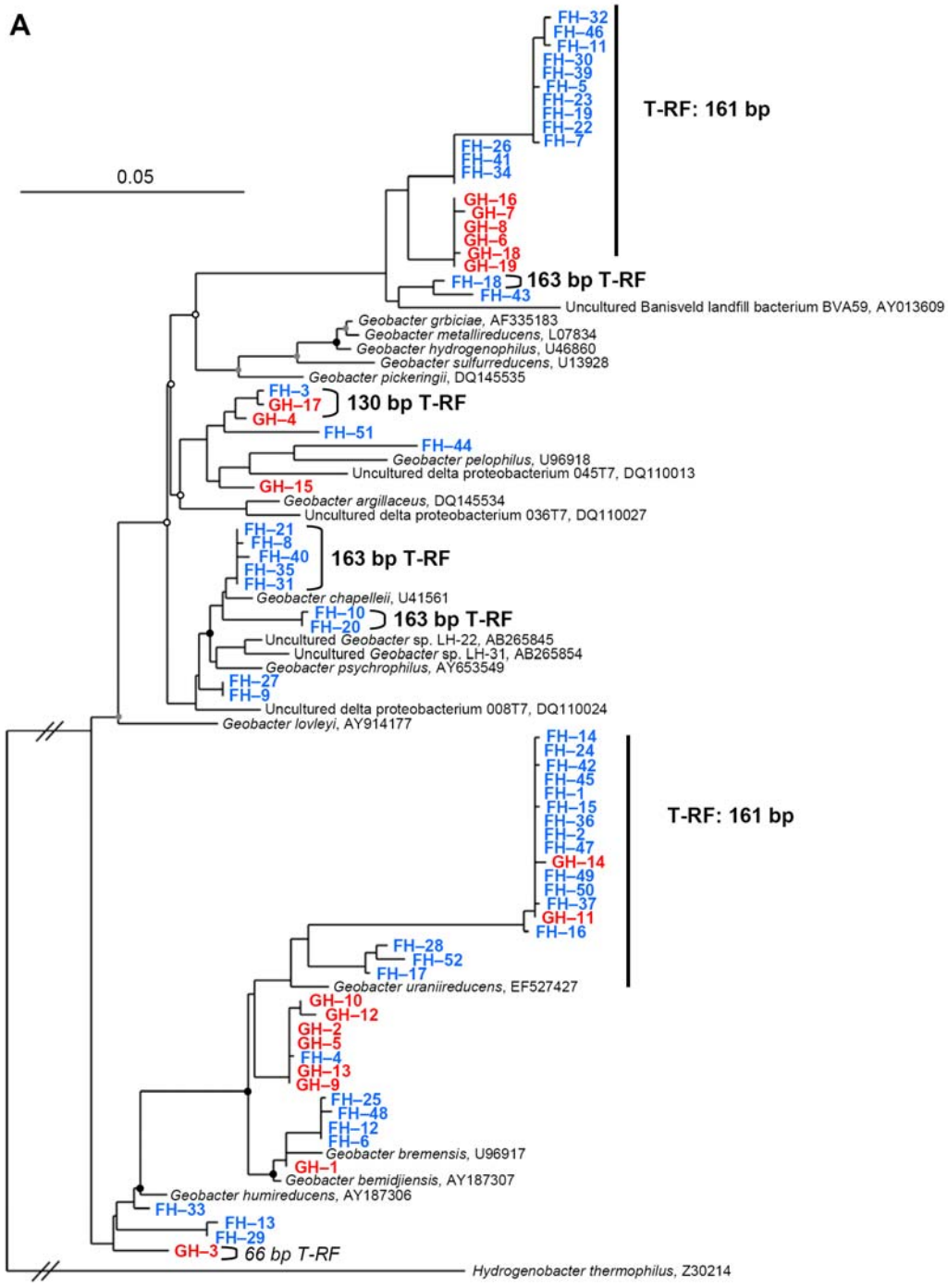
Among the three clone libraries, the most diverse community structure was observed in the control library CH (Fig. 4C), which coincided with the highest diversity of T-RFs. In ferrihydrite and goethite treatments, *Geobacter*-related sequences were predominant (i.e., 85% and 33% of all clones in the FH and GH libraries, respectively). The T-RF sizes of these sequences were 161 bp and 163 bp, which corresponded to dominant peaks in the T-RFLP fingerprints (Fig. 4A, and B). These clones were related to cultivated *Geobacter* spp. (90 to 98% sequence identity) and fell into specific clades partly defined by iron oxide utilization (i.e., ferrihydrite or goethite) (Fig. 6A). In the goethite library, the *Anaeromyxobacter*-related sequences were most numerous (33% of clones), and represented a major T-RF (129 bp; Fig. 4B). More specifically, these clones were affiliated with novel clusters within the radiation of the genus *Anaeromyxobacter* (95-96% sequence identity; Fig. 6B).

Furthermore, a large part of clones in the GH library (i.e., 17% of the total) was related to β-*Proteobacteria*, representing the third T-RF (428, 430 bp) of the 'heavy' fraction (BD of 1.808 g ml^{-1}) from the goethite treatment (Fig. 4C). These sequences formed a novel branch within the phylogenetic radiation of the *Rhodocyclaceae* (Fig. 6C) and were related to *Azonexus fungiphilus* and *Dechloromonas* spp. (~94 to 97% sequence identity).

Table 1. Phylogenetic affiliations and numbers of 16S rRNA clones retrieved from the high-density fractions of bacterial RNA from the ferrihydrite, goethite, and control treatments. Characteristic T-RFs length (bp) for different phylogenetic groups as indicated. T-RF detected for more than one clone within the group is indicated as boldface.

	Ferrihydrite treatment		Goethite treatment		Control treatment	
Phylogenetic group	Clones (n)	T-RF (bp)	Clones (n)	T-RF (bp)	Clones (n)	T-RF (bp)
δ-*Proteobacteria*						
Geobacter	52	**161**, **163**, 130	19	**161**, **130**, 66		
Anaeromyxobacter	3	**129**	19	**129**	3	**129**
Uncultured	1	141	1	167	5	67, 78, 474,
Uncultured						483, 484
β-*Proteobacteria*						
Rhodocyclaceae	1	430	10	**428**, **430**		
Uncultured			2	122, 490		
Acidobacteria			1	152	9	**201**, 73, 144,
						283
Actinobacteria	1	163	1	161	2	132, 139
α-*Proteobacteria*					3	152, 400, 443
Bacteroidetes					1	93
Chloroflexi	2	457, 468	1	164	11	117, 123, 157, **458**, 506, 513, **514**, 515, 523
Cyanobacteria					1	494
Firmicutes	1	137	1	272	3	481, 512, 553
γ-*Proteobacteria*			1	444		
Planctomycetes			1	117	1	154
Thermus/Deinococcus			1	116		
unidentified affiliation					14	82, **68**, 97, **150,** 152, 166, **203**, 265, 520
Total	61		58		53	

In addition, single clones in the goethite library fell into the *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, γ-*Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, and *Thermus* groups, some of which were also represented in the ferrihydrite, and control libraries (Table 1).



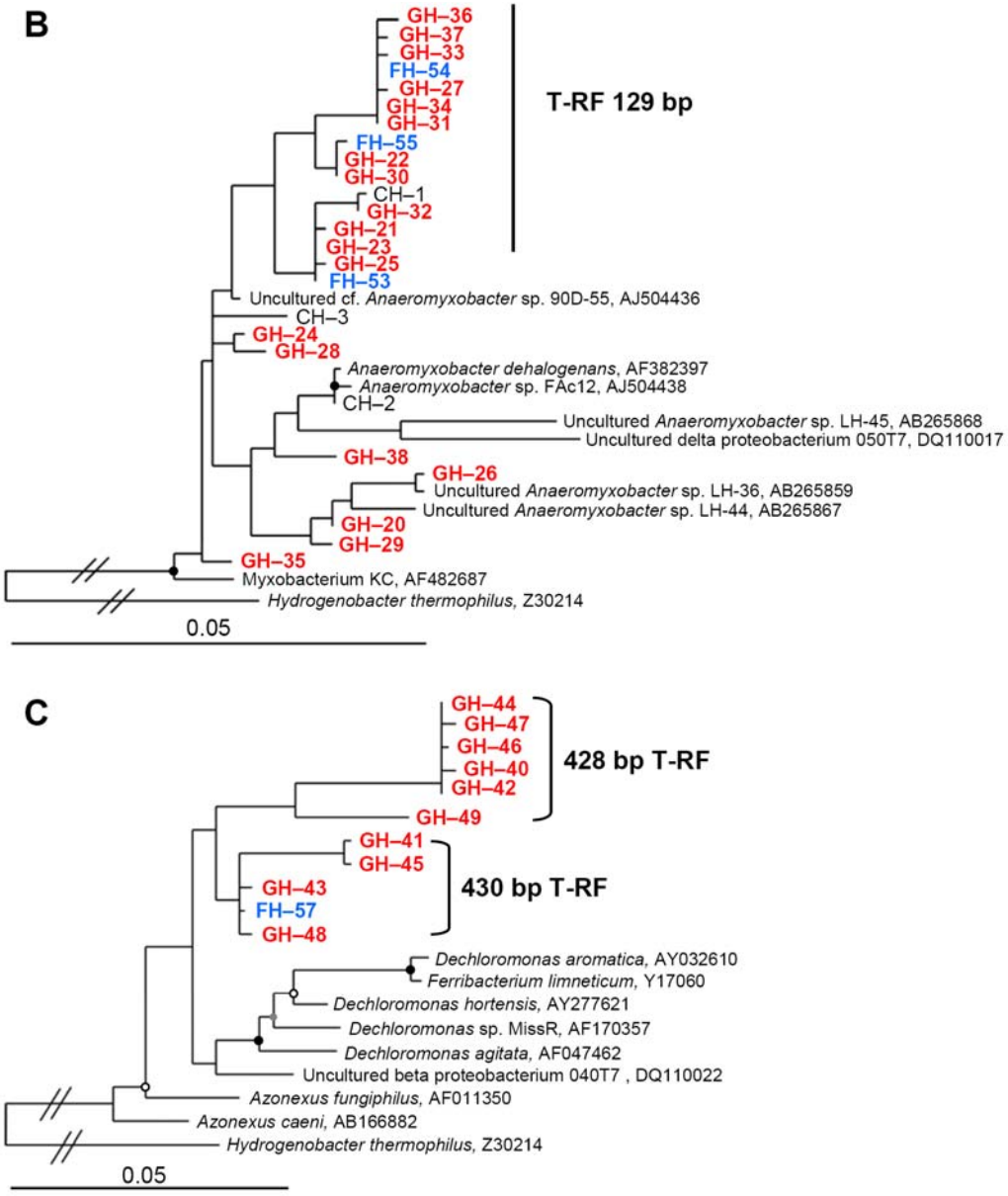


Figure 6. Phylogenetic trees showing the relationships of 16S rRNA clone sequences related to *Geobacter* spp. (A), *Anaeromyxobacter* spp. (B), and β-*Proteobacteria* (C). Clones obtained in this study were indicated by FH ('heavy' RNA fraction of the ferrihydrite treatment; in blue, and boldface), GH ('heavy' RNA fraction of the goethite treatment; in red, and boldface), and CH ('heavy' RNA fraction of the control treatment; in black). The T-RF sizes are as indicated in bps. The core trees with reference sequences (> 1,400 nucleotides) were calculated using the maximum-parsimony algorithm. Bootstrap values were obtained from 1,000 replications, and >90%, 70 to 89%, and <69% are shown with black, grey, and open circles, respectively. The scale bar represents 5% sequence divergence. GenBank accession numbers of reference sequences as indicated.

DISCUSSION

^{13}C-acetate assimilation linked to dissimilatory iron reduction

Ferric iron reduction is a widespread trait in the microbial realm comprising many bacterial lineages and even members of the *Archaea* (Lovley *et al*., 2004; Weber *et al*., 2006a). Conversely, the phylogenetic diversity renders tracking of dissimilatory iron-reducing microorganisms in the environment rather difficult as a universal biosignature or molecular assays for detection, i.e., functional gene markers, are not available. The physiology of dissimilatory iron reducers as anaerobically respiring microorganisms, however, facilitates detection of these microorganisms as a unique guild by SIP when the biogeochemical framework is known, and the labelled substrate is carefully chosen (Friedrich, 2006). Acetate, the most important metabolite of the anaerobic food chain in rice field soils and many other anoxic environments is an ideal substrate for targeting anaerobically respiring microorganisms by SIP. Provided that other electron acceptors have been depleted, anaerobic acetate oxidation to CO_2 is thermodynamically feasible only when coupled to a respiratory process such as Fe(III) oxide reduction or is mediated by syntrophic acetate oxidizing consortia (Kittelmann and Friedrich, 2008a; Schink, 1997); the latter can be ruled out for the Italian rice field soils studied based on careful checks of methane formation from the radiolabelled methyl group of acetate (Achtnich *et al*., 1995b; Chidthaisong and Conrad, 2000). In fact, we have shown recently that ^{13}C-acetate assimilation in RNA-SIP experiments can be linked to specific anaerobic respiratory processes such as chloroethene dehalorespiration (Kittelmann and Friedrich, 2008a; Kittelmann and Friedrich, 2008b); here we show that it can be linked to Fe(III) oxide reduction.

The pre-incubation of soil slurries ensured that inorganic electron acceptors other than CO_2 were depleted prior to initiating SIP. Labelled acetate was added at concentrations (2 mM) relevant to flooded rice paddies (Lueders and Friedrich, 2000), and isotope probing was limited to a rather short time (72 and 48 h), which are prerequisites for specific stable isotope probing (Friedrich, 2006). Under these conditions, ferric iron-reducing bacteria oxidized and assimilated ^{13}C-labelled acetate, which was corroborated by ferrous iron formation (Fig. 1), and a rather specific label incorporation into rRNA (Table 1, Fig. 4 to 6). *Geobacter* spp. accounted for the largest part of the ^{13}C-acetate assimilating populations (~80% of all clones, ~85 % of total T-RF peak height). Members of the genus *Geobacter* are a known clade of dissimilatory iron-reducing bacteria and have

been detected in many other anoxic environments as well (Weber *et al*., 2006a). A second, smaller population (~8%) was closely related to the dissimilatory iron-reducing *Anaeromyxobacter* spp., a genus within the *Myxococcales*, species of which had been isolated from rice field soil previously (Treude *et al*., 2003). Both populations were not detected in 'heavy' gradient fractions of the control (with ^{13}C-acetate only) clearly indicating that acetate assimilation was linked to acetate oxidation by microbial ferrihydrite reduction. *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. were found active also in ferrihydrite reduction coupled to acetate turnover in an experiment with "fresh" flooded Italian rice field by RNA-SIP conducted just after 48 h of incubations. However, *Anaeromyxobacter* spp. were much more active in the fresh soil than in recycled soil (~15 % of T-RF peak heights). In the presence of goethite as electron acceptor, *Geobacter* and *Anaeromyxobacter* spp. became labelled to a similar extent (~30% of all clones, 45 % peak heights). Clearly, *Anaeromyxobacter* spp. were as active in the presence of goethite as *Geobacter* spp.. The mechanisms conveying superiority in acetate utilization to *Geobacter* spp. in the presence of ferrihydrite and competitiveness to *Anaeromyxobacter* spp. in the presence of goethite are presently elusive. It is tempting to speculate that the characteristics of the iron oxides (surface area, mid-redox potential, crystal phase properties) are selecting for distinct populations of iron-reducing bacteria.

Further microbial populations involved in acetate assimilation

Besides *Geobacter* spp. other populations were detected in gradient fractions with 'heavy' rRNA. A relatively large, but so far unidentified population with a T-RF of 504 bp (~19% of total T-RF heights) was detected in 'heavy' RNA fractions from microcosm with fresh soil only (Fig. 5). The duration of isotope probing (only 48 h) might determine which populations can be traced by SIP; hence, it is possible that certain populations are only stimulated intermittently before the more competitive *Geobacter* spp. gain predominance in ferrihydrite-amended soil. A second further population was represented by the β-proteobacterial *Rhodocyclaceae* (T-RFs of 428 and 430 bp) detected in goethite treated microcosms with recycled soil (Table 1, Fig. 4 and 6C), and ferrihydrite-amended samples with fresh soil (Fig. 5) at relative abundances of 7 and 5%, respectively. These novel β-*Proteobacteria* were most closely related to *Dechloromonas* spp. and *Azonexus* spp. (Fig. 6C). In anoxic enrichment cultures with freshwater sediments, it had been suggested that uncultured *Dechloromonas* spp. were involved in the reduction of ferric iron oxides

and nitrate-dependent Fe(II) oxidation (see clone 040T7 in Fig. 5C) but a direct involvement in ferric iron reduction had not been proven (Weber *et al*., 2006b). Our results clearly indicate that ^{13}C-acetate was assimilated by these novel, as-yet-uncultured *Rhodocyclaceae* bacteria when iron-reducing conditions prevailed; in the 'light' of previous and our own findings it is suggestive to hypothesize that these novel *Dechloromonas* spp. might be involved in ferric iron oxide reduction. However, in more extensive experiments with flooded rice field soil microcosms, we found that *Dechloromonas*-related populations were involved in acetate assimilation when iron oxide mineral phases were largely reduced (Müller and Friedrich, unpublished data). Whether less bioavailable Fe(III) mineral phases can be reduced by these *Dechloromonas* spp. as hypothesized previously for *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. (Hori *et al*., 2007) remains to be elucidated.

Suppression of methanogenesis

Large amounts of ferrihydrite amended (140 μmol g^{-1}) reduced $^{13}CH_4$ formation by 77% in recycled soil (Fig. 3D), corroborating a previous study (84% suppression; Lueders and Friedrich, 2002). Stable isotope probing clearly demonstrated that novel and diverse members of *Geobacter* spp. became highly labelled with ^{13}C within 72 hours of the incubation (Fig. 4A, and 5A), indicating that *Geobacter* spp. were preferentially involved in the significant suppression of methane release during the amendment. Several factors might have been involved in the suppression of methanogenesis. According to the thermodynamic theory methanogens might be out-competed for acetate when substrate concentrations are too low to support methanogenesis. However, during the course of SIP, acetate concentrations in slurry pore waters were always above 100 μM (Fig. 1A), and thus, clearly above known thresholds for methanogenesis in rice paddy soil from acetate (>10 μM; Frenzel *et al*., 1999). Besides competition for the carbon source, methanogens might have been directly inhibited by ferric iron as suggested by van Bodegom *et al*., (2004) however, the biochemical mechanism of inhibition is still unknown. When *Methanosarcina barkeri* reduced Fe(III) in pure cultures with H_2/CO_2 and methanol methanogenesis was suppressed, possibly, because hydrogen oxidation was linked to ferric iron reduction rather than CO_2 reduction (Bond and Lovley, 2002; van Bodegom *et al*., 2004). Previously, we had found that rice cluster I (RC-I) methanogens increased their rRNA contents in ferrihydrite amended soil incubations when methanogenesis was

suppressed (i.e., day 0−5), suggesting a possible involvement of these *Archaea* in ferric iron reduction (Lueders and Friedrich, 2002). However, in the present SIP experiments we did not observe a stimulation of hydrogenotrophic methanogens, e.g. the abundant RC-I, suggesting that iron reduction by methanogens was not an important process.

Smaller amounts of ferrihydrite (40 μmol g^{-1}; data not shown) as well as goethite amendment (Fig. 3E) had only a minor effect on the suppression of methane formation (~13, and 9%, respectively) corroborating a previous iron oxide amendment experiment (Qu *et al*., 2004). Apparently, the type and amount of iron oxide amended plays a crucial role in controlling the suppression of methane formation. The pre-incubation of the soil had resulted in the reduction of most of the indigenous ferric iron oxides leaving a high concentration of Fe^{2+} at the beginning of the SIP incubation; under these conditions, added ferric iron oxide might have become coated by the indigenously present Fe^{2+}, and thus, reducing the effective Fe(III) oxide surface available for microbial reduction (Roden, 2003; Roden and Urrutia, 2002). This might also explain why only little Fe^{2+} formation was observed in the goethite treatment. Nevertheless, RNA-SIP clearly demonstrated the activity of distinct populations in the presence of goethite only, suggesting that iron reduction must have occurred albeit to a minor extent compared to the ferrihydrite treatments.

CONCLUSION

The dissimilatory iron-reducing *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. were identified by RNA-SIP as actively iron-reducing bacteria in rice paddy soil. Thus, our study demonstrates that these *Bacteria* can be studied as functional guild of iron-reducing bacteria, when they are actively metabolizing a substrate that can be metabolized by respiratory microorganisms only. This is a major advancement in cultivation independent study of iron-reducing microorganisms enabling a less biased assessment of their role in iron reduction in the environment.

Geobacter spp. were obviously highly competitive with ferrihydrite as electron acceptor. Contrastingly, the less accessible goethite favored *Anaeromyxobacter* spp. as well as other microorganisms detected to be active such as *Rhodocyclaceae* within the β-*Proteobacteria*, not known as iron reducers so far; however, their role in iron oxide mineral phase reduction is not clarified yet and requires further work.

MATERIALS AND METHODS

Soil slurry incubation and geochemical analyses

Two soils were used, both sampled near the Italian Rice Research Institute near Vercelli, Italy (for general soil characteristics see Holzapfel-Pschorn and Seiler, 1986). For the main experiment, "recycled soil" was used, i.e. previously used for growing rice in large microcosms at our greenhouse in Marburg and thus, depleted in organics and nutrients (for details see Conrad and Klose, 1999). In addition, a "fresh soil" was used, which was taken from the Italian field in March 2006, air-dried and stored as dry lumps until the beginning of the experiment. Rice field soil slurry was prepared as described previously (Hori *et al*., 2007). In order to activate the soil microorganisms and reduce endogenous electron acceptors such as available sulfate and ferric iron oxides, the slurry was pre-incubated in the dark at 25ºC (Lueders and Friedrich, 2000; Lueders and Friedrich, 2002; Lueders *et al*., 2004b). Aliquots (10 ml) of the homogenized slurry were transferred into 25-ml serum vials. Different treatments were amended with: (i) ferrihydrite, which was synthesized according to Schwertmann and Cornell, 1991, (ii) goethite (Al-goethite, Fluka, Buchs, Switzerland), and (iii) control without amendment of ferric iron minerals. The iron oxides were supplemented at a final concentration of ~140 and 40 μmol g^{-1} soil dry weight for "recycled" and "fresh" soil, respectively. Vials were sealed with butyl rubber septa, and headspaces were flushed with N_2. Labeling experiments (n=3, each) were started by adding [U-^{13}C]-labelled acetate (99 atom%, Sigma, Taufkirchen, Germany) at a final concentration of 2 mM, and incubated statically for 72 hours at 25ºC. Samples of headspace, pore water, and soil slurry were removed at 0, 8, 16, 24, 48, and 72 h from each vial. Volatile fatty acids from pore water samples were measured by high-pressure liquid chromatography (Krumböck and Conrad, 1991). Total iron and ferrous iron were determined using the ferrozine method (Lovley and Phillips, 1987). Total CH_4 and CO_2 in headspace samples were analyzed by gas chromatography (Roy *et al*., 1997). The ^{13}C atoms percent of CH_4 and CO_2 was determined by GC-isotope ratio mass spectrometry (GC-c-IRMS; Conrad *et al*., 2000). Soil samples were stored at −80ºC for subsequent molecular analyses.

RNA extraction and isopycnic centrifugation

RNA was extracted from 0.5 ml of soil slurry sample from one set of each treatment after 48 (fresh soil) and 72 hours of the incubation as described previously (Noll *et al*., 2005)

and quantified using the Ribogreen RNA-quantification kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacture's instructions. Extracted RNA (500 ng) was density separated by isopycnic centrifugation in cesium trifluoroacetate (CsTFA) (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) (Lueders *et al*., 2004a). Gradients of density-resolved RNA were fractionated, the CsTFA buoyant density (BD) of each fraction determined, and RNA precipitated from fractions as described previously (Lueders *et al*., 2004a).

Terminal restriction fragment length polymorphism analysis

RNA from each density fraction of each treatment was used as a template for reverse transcription-PCR (RT-PCR) using a single step RT-PCR system (Access Quick, Promega, Mannheim, Germany) for terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) profiling. Thermal cycling of RT-PCR (Hori *et al*., 2007) and PCR primers used (Lueders and Friedrich, 2002; Lueders *et al*., 2004c) were as described previously; 20 and 23 cycles were used for amplification of bacterial and archaeal templates, respectively. Amplicons were digested using *Msp*I and *Taq*I for *Bacteria* and *Archaea*, respectively. Digested amplicons were desalted using AutoSeq G-50 columns (Amersham Biosciences). Prior to electrophoresis, 1 µl of the digest was suspended in 12 µl of Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and 0.25 µl of carboxy-X-rhodamine (ROX)-labelled MapMarker 1000 ladder (Bio-Ventures, Murfreesboro, Tenn.). The mixture was denatured at 95ºC for 3 min and immediately cooled on ice. Size separation of terminal restriction fragments (T-RFs) was performed using an ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Cloning and sequencing of 16S rRNA, and phylogenetic analysis

Selected density fractions of bacterial RNA were subjected to cloning and sequencing. The conditions of RT-PCR were as described above. RT-PCR products were ligated into the plasmid vector pGEM-T Easy (Promega), and the ligation mixture was used to transform *Escherichia coli* JM109 cells (Promega) according to the manufacturer's instructions. The 16S rRNA inserts of randomly selected clones were sequenced at the Automatic DNA Isolation and Sequencing facility (ADIS, Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Cologne Germany) using BigDye terminator cycle sequencing chemistry (Applied Biosystems) (Lueders *et al*., 2004c). Sequences of 16S rRNA clones

were compared to the DDBJ nucleotide sequence database by BLASTN searches. Phylogenetic analyses were performed using the software package ARB (http://www.arb-home.de; Ludwig *et al*., 2004). Phylogenetic core trees were constructed from reference 16S rRNA gene sequences (more than 1,400 nucleotides) using neighbor-joining, maximum-likelihood, and maximum-parsimony algorithms. Treeing methods did not have a significant effect on dendrogram topology. Partial 16S rRNA clone sequences (~850 bp) were added to core trees using the ARB parsimony tool. Chimeric sequences were detected by separately determining tree positions of terminal 5' and 3' stretches of each clone (~300 bp, "fractional treeing"; Ludwig *et al*., 1998; Ludwig *et al*., 2004). The nucleotide sequences data have been deposited in the DDBJ nucleotide sequence database under the accession numbers AB293247−AB293418.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Melanie Klose, Bianca Pommerenke, and Peter Claus for their significant technical assistance, and thank Tzu-Chiao Chao for iron oxide determination, and critical reading of the manuscript. We also thank Masaharu Ishii and Shin Haruta (University of Tokyo) for their continuous encouragement. This study was financially supported by the DFG within the special research program SFB395 and the Fonds der Chemischen Industrie. T. Hori received a scholarship from the Max-Planck Society and the University of Tokyo International Academic Exchange Activities Program.

REFERENCES

Achtnich C, Bak F, Conrad R. (1995a) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19:** 65-72.

Achtnich C, Schuhmann A, Wind T, Conrad R. (1995b) Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16:** 61-69.

Bond DR, Lovley DR. (2002) Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environ. Microbiol.* **4:** 115-124.

Chidthaisong A, Conrad R. (2000) Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 73-86.

Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M, Conrad R. (2004) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb. Ecol.* **47:** 59-67.

Conrad R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60:** 609-640.

Conrad R. (2007) Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv. Agron.* **96:** 1-63.

Conrad R, Frenzel P. (2002) Flooded soils. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton,G. (ed). New York: John Wiley & Sons, Inc., 1316-1333.

Conrad R, Klose M. (1999) How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? *FEMS Microbiol. Ecol.* **30:** 47-56.

Conrad R, Klose M, Claus P. (2000) Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 828-831.

Frenzel P, Bosse U, Janssen PH. (1999) Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. *Soil Biol. Biochem.* **31:** 421-430.

Friedrich MW. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17:** 59-66.

Furukawa Y, Inubushi K. (2002) Feasible suppression technique of methane emission from paddy soil by iron amendment. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **64:** 193-201.

Hengstmann U, Chin KJ, Janssen PH, 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.

Holzapfel-Pschorn A, Seiler W. (1986) Methane emission during a cultivation period from an Italian rice paddy. *J. Geophys. Res.* **91:** 11803-11814.

Hori T, Noll M, Igarashi Y, Friedrich MW, Conrad R. (2007) Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 101-109.

Jäckel U, Russo S, Schnell S. (2005) Enhanced iron reduction by iron supplement: A strategy to reduce methane emission from paddies. *Soil Biology & Biochemistry* **37:** 2150-2154.

Jäckel U, Schnell S. (2000) Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **32:** 1811-1814.

Kittelmann S, Friedrich MW. (2008a) Identification of novel perchloroethene-respiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* **10:** 31-46.

Kittelmann S, Friedrich MW. (2008b) Novel uncultured Chloroflexi dechlorinate perchloroethene to trans-dichloroethene in tidal flat sediments. *Environ. Microbiol.* **10:** 1557-1570.

Krumböck M, Conrad R. (1991) Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 247-256.

Lovley DR, Phillips EP. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53:** 2636-2641.

Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology* **49:** 219-286.

Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner, M and Schleifer KH. (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19:** 554-568.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32:** 1363-1371.

Lueders T, Friedrich M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2732-2742.

Lueders T, Friedrich MW. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2484-2494.

Lueders T, Manefield M, Friedrich MW. (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6:** 73-78.

Lueders T, Pommerenke B, Friedrich MW. (2004b) Stable isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 5778-5786.

Lueders T, Wagner B, Claus P, Friedrich MW. (2004c) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* **6:** 60-72.

Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ. (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 5367-5373.

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.

Patrick WH, Jr., Reddy CN. (1978) Chemical changes in rice soils. Los Banos, Phillipines: International Rice Research Institute (IRRI), 361-379.

Ponnamperuma FN. (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv. Agronom.* **24:** 29-96.

Qu D, Ratering S, Schnell S. (2004) Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72:** 1172-1181.

Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403:** 646-649.

Raiswell R, Canfield DE, Berner RA. (1994) A Comparison of Iron Extraction Methods for the Determination of Degree of Pyritisation and the Recognition of Iron-Limited Pyrite Formation. *Chemical Geology* **111:** 101-110.

Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield PF, Conrad R, Friedrich MW. (2001) Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37:** 175-186.

Roden EE. (2003) Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environmental Science & Technology* **37:** 1319-1324.

Roden EE, Urrutia MM. (2002) Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiology Journal* **19:** 209-251.

Roy R, Klüber HD, Conrad R. (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24:** 311-320.

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. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61:** 262-280.

Schwertmann U, Cornell RM. (1991) Iron Oxides in the Laboratory. WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Treude N, Rosencrantz D, Liesack W, Schnell S. (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44:** 261-269.

van Bodegom PM, Scholten JCM, Stams AJM. (2004) Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49:** 261-268.

Weber KA, Achenbach LA, Coates JD. (2006a) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Micro.* **4:** 752-764.

Weber KA, Urrutia MM, Churchill PF, Kukkadapu RK, Roden EE. (2006b) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ. Microbiol.* **8:** 100-113.

Weber S, Lueders T, Friedrich MW, Conrad R. (2001) Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38:** 11-20.

Yao H, Conrad R, Wassmann R, Neue HU. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47:** 269-295.

2. Unterschiedliche Eisen(III)-Oxid-Phasen selektieren auf individuelle eisenreduzierende bakterielle Populationen in anoxischem Reisfeldboden

Alexandra Müller und Michael W. Friedrich

Zusammenfassung. Die mikrobielle Reduktion von Eisen ist nach der Methanogenese der zweitwichtigste biogeochemische Prozess in anoxischem Reisfeldboden. Allerdings ist das Wissen über die Diversität, Struktur und Funktion der dissimilatorischen Eisenreduzierer, besonders in Gegenwart von verschiedenen Eisen(III)-Oxid-Phasen, begrenzt.

Diese Studie liefert erste Hinweise darauf, dass sich bakterielle Populationen auf die Reduktion von definierten Eisen(III)-Oxid-Phasen spezialisiert haben. Reisfeldboden, verarmt an endogenem Fe(III), wurde mit ^{13}C-Acetat als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Eisen(III)-Oxiden (d.h. Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit und Hämatit) als Elektronenakzeptor beprobt. Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(T-RFLP) Analyse, sowie Klonierung und Sequenzierung bakterieller 16S rRNA zeigten eine Dominanz von *Geobacter* spp. in den Mikrokosmen mit zusätzlichen Eisen(III)-Oxiden. Darüber hinaus konnte eine Stimulation von phylogentisch unterschiedlichen *Geobacter*-Populationen in Gegenwart bestimmter Eisen(III)-Oxide beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Populationen an der Reduktion von Lepidokrokit, Goethit und Hämatit beteiligt waren. In den Mikrokosmen ohne zusätzliche Eisen(III)-Oxide wurde das ^{13}C-Acetat hauptsächlich von β-proteobakteriellen *Rhodocyclales* assimiliert. Diese bisher unkultivierten Mikroorganismen waren möglicherweise an der Reduktion von endogenen Eisen(III)-Oxiden mit geringer Bioverfügbarkeit beteiligt, da diese Population auch in Ansätzen mit Goethit und Hämatit detektiert wurde.

Distinct Fe(III) oxide mineral phases select for individual iron-reducing microbial populations in anoxic rice field soil

(To be submitted to *Environmental Microbiology*)

Alexandra Müller and Michael W. Friedrich

Abstract. Besides methanogenesis, microbial ferric iron reduction is the second most important biogeochemical process in anoxic rice field soils but the diversity, community structure, and function of dissimilatory iron-reducers especially in the presence of distinct Fe(III) oxide mineral phases remain unknown.

Here, we obtained evidence for the specialization of certain bacterial populations for reducing Fe(III) oxides in defined mineral phases. Rice field soil, depleted in endogenous Fe(III) was probed with ^{13}C-acetate as carbon source and distinct synthesized Fe(III) oxides (i.e., ferrihydrite, lepidocrocite, goethite, and hematite) as electron acceptors. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, followed by cloning and sequencing of density-resolved 16S rRNA confirmed the predominance of *Geobacter* spp. in treatments supplemented with Fe(III) oxides. Moreover, phylogenetically distinct populations of *Geobacter* spp. were found to be specifically stimulated by certain Fe(III) oxides suggesting their specific involvement in the reduction of lepidocrocite, goethite, or hematite. The major phylogenetic group assimilating ^{13}C-acetate in microcosms without additional Fe(III) oxides clustered within the β-proteobacterial *Rhodocyclales*. This as yet uncultured population was also detected in microcosms supplemented with goethite and hematite and was potentially involved in the reduction of persistent endogenous Fe(III) oxides with low bioavailability.

INTRODUCTION

In anoxic soils and sediments, the pathway of organic matter degradation depends on the variety of microorganisms and the types of electron acceptors present. The functions of the microorganisms range from hydrolysis, fermentation, syntrophic oxidation, homoacetogenesis, methanogenesis to oxidation and are coupled to the sequential reduction of electron acceptors. This reduction is based on the thermodynamic theory which predicts that the energetically more favorable electron acceptors (e.g., oxygen, nitrate, manganese(IV), iron(III), sulfate) will be utilized first under substrate limiting conditions (Zehnder and Stumm, 1988). Once all electron acceptors apart from CO_2 have been reduced, methanogenesis is the terminal respiratory process (Conrad, 1996).

The reduction of ferric iron [Fe(III)] is the second most important anaerobic process of organic matter mineralization after methanogenesis in rice field soil (Jäckel and Schnell, 2000a; Yao *et al*., 1999). Ferric iron-reducing bacteria can outcompete sulfate-reducing bacteria and methanogens for electron donors (e.g., acetate, H_2; Achtnich *et al*., 1995; Lovley and Phillips, 1987; Roden and Wetzel, 2003; Teh *et al*., 2008). A mitigative potential of amorphous and crystalline ferric iron oxides supplementation has been demonstrated in rice field soil and a suppression of methanogenesis and a reduction in CH_4 emission rates of > 70 % have been reported (Achtnich *et al*., 1995; Chidthaisong and Conrad, 2000; Jäckel and Schnell, 2000b; Lueders and Friedrich, 2002; Qu *et al*., 2004; van Bodegom *et al*., 2004). The iron-reducing activity in flooded rice field soil has been localized by geochemical profile measurement of ferrous and ferric iron oxides (Ratering and Schnell, 2000). The abundance of ferric iron-reducing bacteria was estimated by MPN counts (~10^7 cells per g dry weight; Frenzel *et al*., 1999) but very little is known about the main iron-reducing populations in rice field soil.

Rice field soils are known to contain a range of ferric iron oxide minerals, e.g. ferrihydrite, lepidocrocite, goethite, and hematite (Bacha and Hossner, 1977; Chen *et al*., 1980; Cornell and Schwertmann, 2003; Karim, 1984). These ferric iron oxides have been characterized regarding physical, chemical and thermodynamic properties and it was observed, that these distinct chararcteristics might have a fundamental influence on the susceptibility of Fe(III) oxides to dissimilatory iron reduction (Cornell and Schwertmann, 2003; Roden, 2006). Ferrihydrite is known to be a highly amorphous Fe(III) oxide and seems to be reduced predominantly whereas the Fe(III) minerals lepidocrocite, goethite and hematite exhibit well-defined crystal structures and are less available for microbial reduction

(Munch and Ottow, 1980; Phillips *et al*., 1993; Roden, 2003). In addition to cristallinity, surface area and particle size have been implicated as major factors, controlling the reduction of ferric iron minerals by microorganisms (Lovley, 1987; Roden and Zachara, 1996). Hori and colleagues (2007) have shown that the dissimilatory iron-reducing bacteria, *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp., assimilated acetate under methanogenic conditions, i.e., when Fe(III) oxides had apparently been reduced. However, very little is known about the composition of the microbial community actively involved in the reduction of Fe(III) oxides in rice field soil.

Recently, we traced iron-reducing microorganisms as a functional guild by RNA-based stable isotope probing (RNA-SIP; Manefield *et al*., 2002) with ^{13}C-labelled acetate as carbon source (Hori *et al*., submitted). RNA-based SIP is a powerful approach to directly identify microbial populations active in a defined metabolic process by incorporation of an isotope with low natural abundance (e.g., ^{13}C) into their RNA. *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. have been identified as key players in the assimilation of acetate in rice field slurries, supplemented with ferrihydrite and Aluminum-goethite, respectively (Hori *et al*., submitted). Members of the family *Geobacteraceae* are often the most abundant microorganisms in environments in which Fe(III) reduction is an important process due to their ability to oxidize a wide variety of organic compounds, often completely to CO_2 (Lovley *et al*., 2004).

The aim of this study was to monitor the effects of rice field soil supplementation with ferric iron oxides (i.e. ferrihydrite, lepidocrocite, goethite and hematite), on the iron-reducing community in rice field soil using biogeochemical analyses and RNA-based stable isotope probing.

RESULTS

Biogeochemistry of reduction processes in slurry incubations

Rice field soil was pre-incubated to establish anoxic and in respect to alternative electron acceptors reduced conditions. At the end of the pre-incubation, the concentration of Fe(II) remained constant and no other potential electron acceptor and electron donor was available. Under these conditions, the active Fe(III)-reducing populations were identified by RNA-based SIP with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, cloning and sequencing of bacterial 16S rRNA. Pre-incubated anoxic rice field soil was supplemented with ferric iron oxides as electron acceptor at final concentrations

of 70 µmol g^{-1} (ferrihydrite and lepidocrocite) and 140 µmol g^{-1} (goethite and hematite). The characteristic surface area (m^2 g^{-1}) and the estimated mean particle size (nm) of the synthesized and used ferric iron oxides are shown in Table 1. X-ray diffraction analyses have shown that these synthetic Fe(III) oxides are free from major amorphous impurities.

Table 1. Characteristics of synthetic Fe(III) oxides used in this study.

Oxide phase	Surface area (m^2 g^{-1})[a]	Estimated mean particle size (nm)[b]
2-line Ferrihydrite	308.7 ± 0.3	1-2
Lepidocrocite	112.7 ± 0.5	21
Goethite 70°C	33.86 ± 0.17	42
Hematite	52.09 ± 0.32	42

a. Determined by multi-point BET-N_2 adsorption.

b. Calculated by the Scherrer formula.

Profiling of Fe(II) over time revealed the activity of Fe(III)-reducing microorganisms in the treatment with ferrihydrite and lepidocrocite (Fig. 1). The ferrous iron concentrations increased by 100.1 µmol g^{-1} and 80.7 µmol g^{-1} within 72 hours, indicating the complete reduction of ferrihydrite and lepidocrocite, respectively. In contrast, supplementation with goethite and hematite and also an elongation of incubation time (data not shown) revealed no effect on the Fe(II) concentrations and the time course profiles were comparable to control microcosms (Fig.1). Methane concentrations increased almost linearly with time in incubations with goethite, hematite and the control (Fig. 2A). A suppression of methane production was observed after day 2 in the ferrihydrite and lepidocrocite amended soil compared to the control. During the experiment total methane emissions were reduced by 50.2% under ferrihydrite and by 29.6% under lepidocrocite amendment.

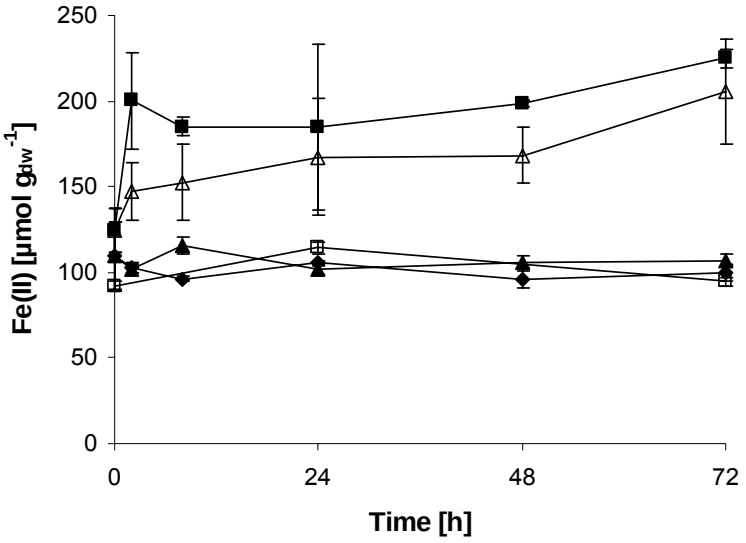


Figure 1. Formation of Fe(II) in unamended (♦ control) and Fe(III)-amended (■ ferrihydrite, Δ lepidocrocite, ▲ goethite, and □ hematite) rice field soil slurries over time. Vertical bars represent standard errors of duplicate or triplicate measurements.

Acetate as a central intermediate in decomposition of organic matter in anoxic rice field soil was added as fully ^{13}C-labelled carbon source and potential electron donor three times during the incubation (0.7 mM final concentration each time). In ferric iron oxide amended and unamended (control) microcosms, ^{13}C-acetate was turned over rapidly to $^{13}CH_4$ and ^{13}C atom percents were in the range of 28% (hematite) and 56-72% (lepidocrocite, ferrihydrite, goethite, and control) (Fig. 2B). In all microcosms, $^{13}CO_2$ was formed at the same rate and to a similar extent (10-12%, data not shown). However, in the treatment with ferrihydrite ^{13}C atom percent of CO_2 increased up to 17% (Fig. 2B). At the end of the experiment, acetate was not detectable in the incubation with ferrihydrite whereas residual acetate (0.4-1.4 mM) was present in treatments with lepidocrocite, goethite and the control (Tab. S1). In incubations with hematite, oxidation of acetate started after 72 hours of incubation and was completed within 168 hours (data not shown). During time of acetate oxidation, ^{13}C atom percent of CH_4 and CO_2 increased up to 39% and 15%, respectively.

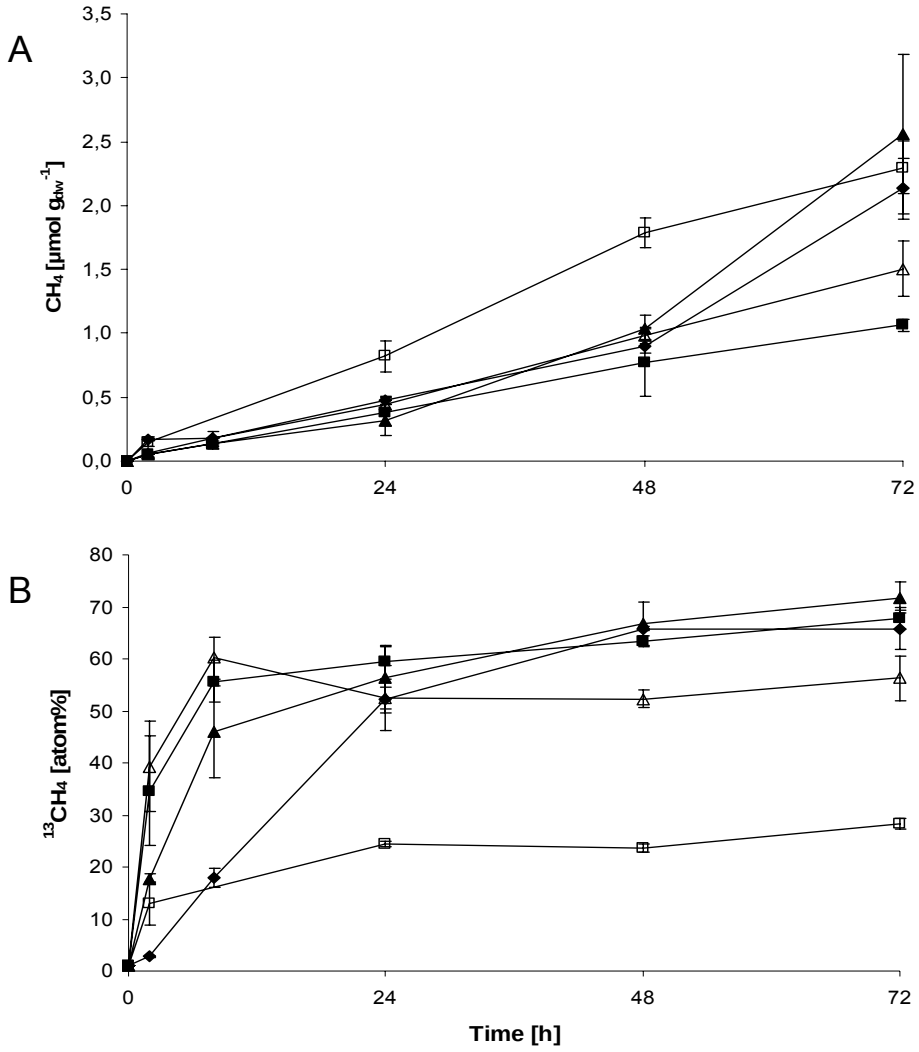


Figure 2. Effect of iron oxide addition on (A) total CH_4 (µmol g_{dw}^{-1}) and production of (B) $^{13}CH_4$ (atom%) from ^{13}C-labelled acetate during incubation over 72 hours. Vertical bars represent standard errors of triplicate measurements (curve symbol ♦ control, ■ ferrihydrite, Δ lepidocrocite, ▲ goethite, and □ hematite).

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprinting of density-resolved bacterial populations

The acetate-metabolising bacterial populations were analyzed by RNA-based SIP combined with terminal restriction fragment length polymorphism analysis, cloning and sequencing of density-resolved bacterial 16S rRNA. After different time points of incubation, total RNA was extracted from microcosms with ferrihydrite, lepidocrocite,

goethite, hematite and the control (Tab. 2). ^{13}C-enriched, 'heavy' RNA was separated from unlabelled, 'light' RNA by isopycnic centrifugation. Bacterial 16S rRNA templates resolved within the gradient fractions were analyzed by polymerase chain reaction (PCR)-based T-RFLP fingerprinting to identify specific community members most efficient in ^{13}C-label incorporation into their rRNA and therefore potentially active in the reduction of ferric iron oxides.

The profiles of bacterial 16S rRNA from all gradient fractions revealed that distinct populations were involved in label assimilation, depending on the iron oxides present as electron acceptor (Fig. 3-6). Typically, fully ^{13}C-labelled rRNA has a buoyant density (BD) between 1.81 and 1.82 g ml^{-1} in cesium trifluoroacetate (CsTFA) (Lueders *et al*., 2004a). A shift in the bacterial community profiles from 'light' fractions (BD < 1.80 g ml^{-1}) to 'heavy' gradient fractions (BD > 1.81 g ml^{-1}) was observed in microcosms with ferrihydrite, lepidocrocite and the control, indicating that ^{13}C-label had been incorporated after 24 hours of incubation (Fig. 3). The 'heavy' fraction of the treatment with ferrihydrite (BD of 1.823 g ml^{-1}) and lepidocrocite (BD of 1.823 g ml^{-1}) were dominated by terminal restriction fragments (T-RFs) of 129 and 161/163 bp (Fig. 3A, B). However, an additional T-RF of 272 bp was detected in the 'heavy' fraction of the control (BD of 1.820 g ml^{-1}) (Fig. 3C), which showed an increasing relative abundance towards the lighter fractions.

Table 2. Overview of incubations and molecular analyses performed in this study.

Molecular analyses	Treatment[a]/Time point analyzed (h)											
	Ferrihydrite (70 µmol g^{-1})		Lepidocrocite (70 µmol g^{-1})		Goethite (140 µmol g^{-1})		Hematite (140 µmol g^{-1})		Control[b]			
	24	72[c]	24	72	72	240	72	168	24	72	168	240
RNA-Extraction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RNA-SIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T-RFLP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clone library[d]			+	+	+		+		+	+		
Designation			LAH24	LAH72	GAH72		HAH72		OEH24	OEH72		

a. ^{13}C-labelled acetate (A) was added at 0, 24 and 48 hours of incubation to a final concentration of 2.1 mM.

b. No additional Fe(III) oxide was added as electron acceptor (OE).

c. Data not shown.

d. Clone libraries were constructed from a heavy fraction (H) of the different treatments.

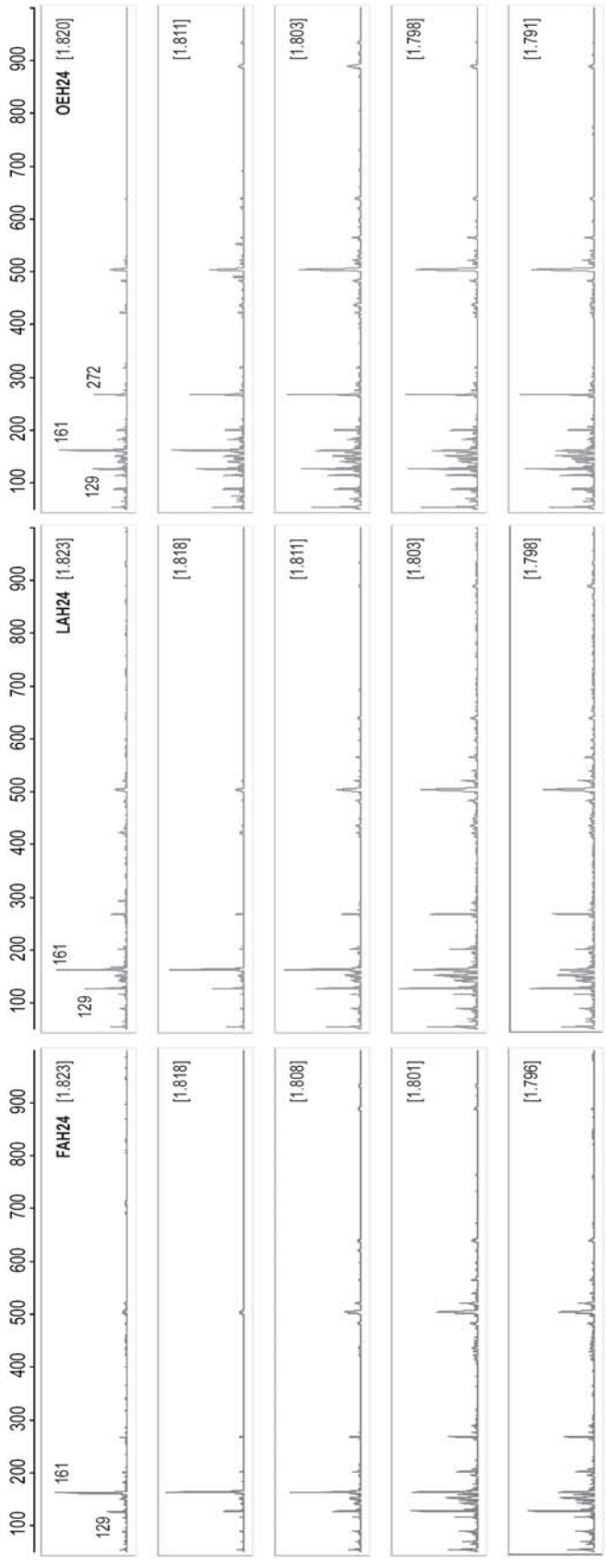


Figure 3. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprints of density-resolved bacterial 16S rRNA generated from selected 'light' and 'heavy' cesium trifluoroacetate (CsTFA) gradient fractions of microcosms incubated with (A) ferrihydrite, (B) lepidocrocite and (C) without additional iron oxide (control) for 24 hours. CsTFA buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets. Clone libraries were generated from fractions LAH24 and OEH24.

After 72 hours of incubation the T-RFs of 129 and 161/163 bp were predominant in the 'heavy' fraction of the lepidocrocite-amended microcosms (BD of 1.828 g ml^{-1}; Fig. 4A). However, both, the 129 bp T-RF as well as the 161/163 T-RFs increased over time (14 to 30% and 23 to 28%, respectively), and accounted for a large proportion of the total bacterial amplicon pool after 24 and 72 hours.

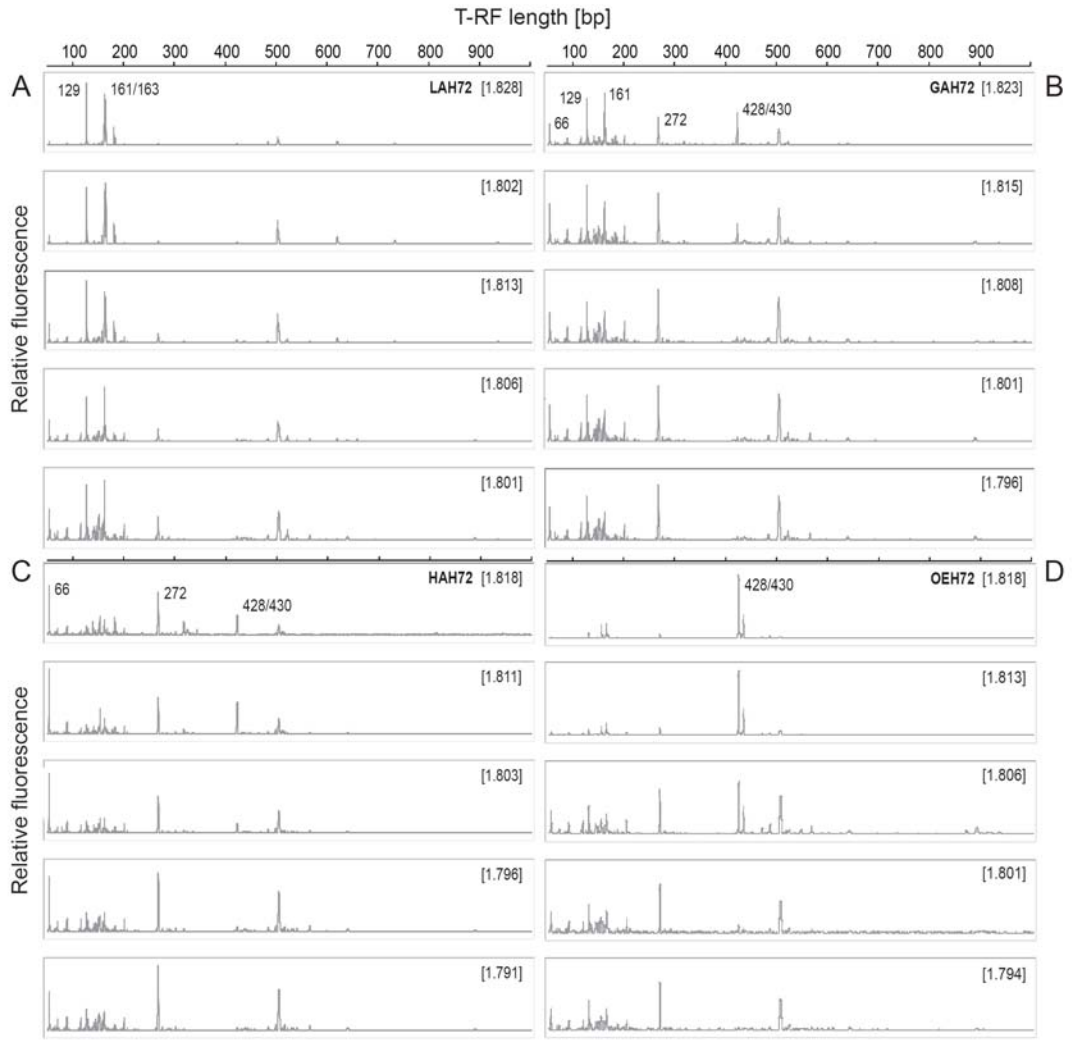


Figure 4. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprints of density-resolved bacterial 16S rRNA generated from selected 'light' and 'heavy' cesium trifluoroacetate (CsTFA) gradient fractions of microcosms incubated with (A) lepidocrocite, (B) goethite, (C) hematite and (D) without additional iron oxide (control) for 72 hours. CsTFA buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets. Clone libraries were generated from fractions LAH72, GAH72, HAH72 and OEH72.

Besides the T-RFs of 129 and 161/163 bp, the 'heavy' fraction (BD of 1.823 g ml^{-1}) of the incubation with goethite showed two additional T-RFs of 272 and 428/430 bp (Fig. 4B). Only a minor shift in the bacterial community profiles from 'heavy' to 'light' fractions was observed in hematite-amended microcosms (Fig. 4C). In comparison to the 'heavy' fractions of the lepidocrocite- and goethite-amended microcosms, the T-RFs of 129 and 161/163 bp became less abundant in 'heavy' fractions of the hematite treatment (BD of 1.818 g ml^{-1}). The T-RF of 428/430 bp was only present in 'heavy' fractions, while the T-RFs of 66 and 272 bp were observed in all gradient fractions but with differences in relative abundance. Unexpectedly, also in the control, a specific incorporation of label into rRNA was detected. The high density bacterial community patterns changed completely over the duration of the experiment (Fig. 3C and 4D). The T-RFs of 129, 161/163 and 272 bp almost disappeared after 72 hours of incubation and exclusively the T-RF of 428/430 bp was detected. This population accounted for altogether 62.9% of the total bacterial amplicon pool based on peak heights.

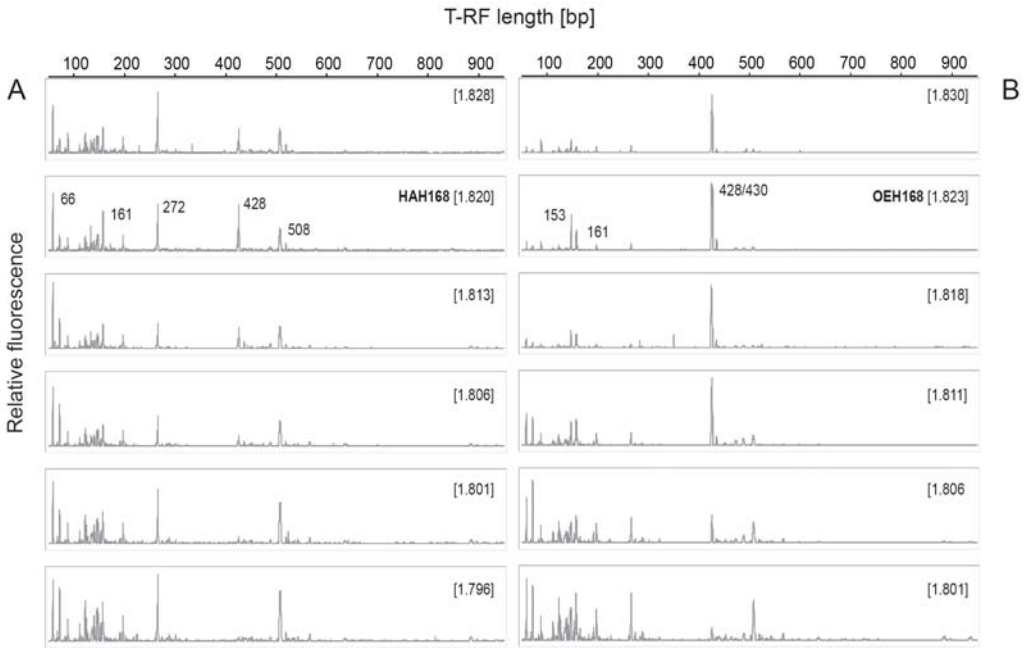


Figure 5. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprints of density-resolved bacterial 16S rRNA generated from selected 'light' and 'heavy' cesium trifluoroacetate (CsTFA) gradient fractions of microcosms incubated with (A) hematite (B) without additional iron oxide (control) for 168 hours. CsTFA buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets.

Due to less bioavailability of hematite and goethite, T-RFLP analysis of density-resolved bacterial 16S rRNA was also performed after 168 and 240 hours of incubation for microcosms supplemented with these Fe(III) oxides (Fig. 5, and 6). The high density bacterial community patterns of the incubation with hematite were highly similar at different time points (Fig. 4C, and 5A). However, the T-RF of 161 bp only appeared after 168 h (Fig. 5A). In the T-RFLP profiles of the microcosms with goethite, the T-RF of 272 bp almost disappeared after 240 h (Fig. 6A) as compared to 72 h of incubation (Fig. 4B) and the relative abundances of the 66 and 129 bp T-RFs increased from 7 to 17% and 13 to 32% over the duration of the experiment, respectively. A shift over time was also detected in T-RFLP patterns of the control treatment, and the T-RFs of 153 and 161 bp only appeared at later time points of the experiment (Fig. 5B and 6B).

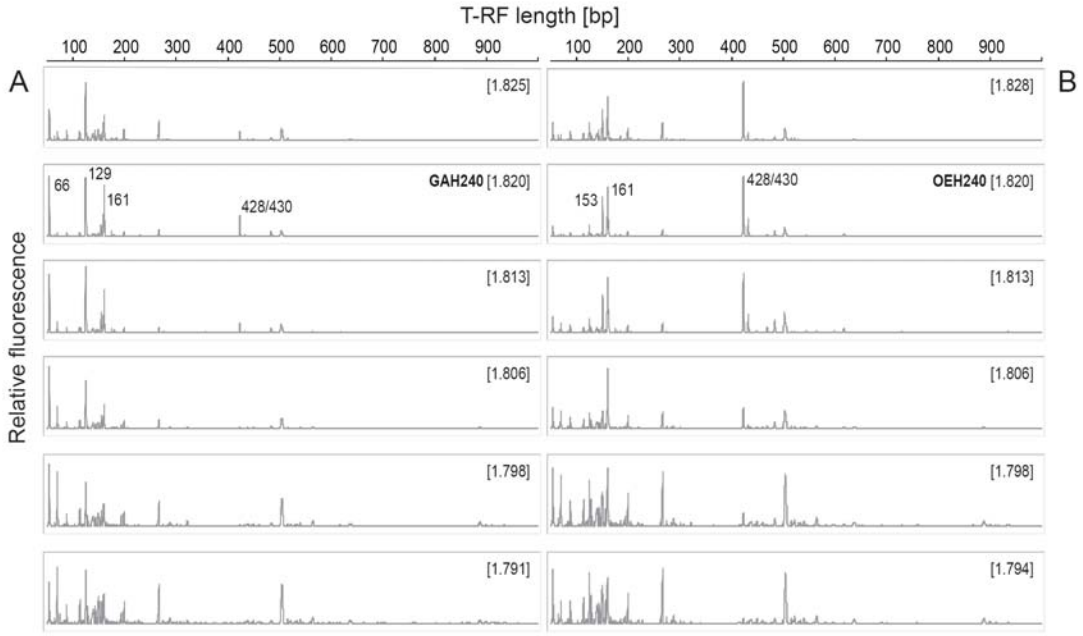


Figure 4. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprints of density-resolved bacterial 16S rRNA generated from selected 'light' and 'heavy' cesium trifluoroacetate (CsTFA) gradient fractions of microcosms incubated with (A) goethite (B) without additional iron oxide (control) for 240 hours. CsTFA buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets.

Phylogenetic identification of iron-reducing and acetate-oxidizing bacterial populations

In order to identify bacterial populations found to specifically incorporate ^{13}C-label under Fe(III)-reducing conditions (Fig. 1), and to assign phylogenetic groups to distinct T-RFs, clone libraries were constructed with 16S rRNA templates from 'heavy' fractions (H) of the iron oxide-amended microcosms and the control (LAH72, BD = 1.828; GAH72, BD = 1.823; HAH72, BD = 1.818; OEH72, BD = 1.818) after 72 hours of incubation (Tab. 2). In addition, clone libraries were generated for the lepidocrocite and the control treatment incubated for only 24 hours (LAH24, BD = 1.823; OEH24, BD = 1.820). In total, 673 clones were analyzed from all libraries.

Phylogenetic analysis of the clone libraries LAH24 and OEH24 revealed a very similar and highly diverse bacterial community mainly consisting of *Chloroflexi* (21-22%, Tab. 3), *Firmicutes* (13-16%) and δ-*Proteobacteria* (27-31%). However, within 72 h of incubation the composition of the clone libraries LAH72 and OEH72 changed completely. The majority of clones obtained from the 72 h-treatment with lepidocrocite belonged to the δ-subgroup of the *Proteobacteria* (82%, Tab. 3), whereas the clone library of the 72 h-control was dominated by β-*Proteobacteria* (49%), and only a minor part of sequences was affiliated with the δ-*Proteobacteria* (22%). The sequences of the clone libraries GAH72 and HAH72 were composed of a wide variety of phylogenetic groups including *Chloroflexi* (11-17%), *Firmicutes* (13-19%), and δ-*Proteobacteria* (20-31%).

Table 3. Relative abundance (in per cent) of major phylogenetic groups in the analyzed 'heavy' fractions (H) of the microcosms incubated with lepidocrocite for 24 h (LAH24) and 72 h (LAH72), the corresponding controls (OEH24 and OEH72) and the microcosms incubated with goethite (GAH72) and hematite (HAH72) for 72 h, based on frequencies in 16S rRNA clone library and T-RFLP analysis.

Analyzed fraction/ BD (g ml^{-1})	LAH24 (1.823)		OEH24 (1.820)		LAH72 (1.828)		GAH72 (1.823)		HAH72 (1.818)		OEH72 (1.818)		
Coverage C[a] [%]	37.7		40.4		80.21		48.1		45.5		81.8		
Phylogenetic affiliation	Clone library	T-RFLP	Clone library	T-RFLP	Clone library	T-RFLP	Clone library	T-RFLP	Clone library	T-RFLP	Clone library	T-RFLP	Characteristic T-RF length (bp)[b]
Acidobacteria	9.4	-[c]	4.8	-	1.0	-	3.2	-	4.5	-			149/150, 152, 201
Actinobacteria	8.5	-	4.8	-	3.1	-	8.2	-	5.8	-	3.6	-	
Bacteriodetes	1.9	1.6	1.0	-	1.0	-	0.6	2.4	1.3	3.1			93, 95
Chloroflexi	21.7	-	22.1	-	5.2	-	10.8	-	18.8	-	7.3	-	Diverse
Cyanobacteria	0.9	-			1.0	-	0.6	-	0.6	-			
Firmicutes													
Bacillales	2.8	2.1	1.9	1.9			1.9	3.9	9.1	8.1			145, 153
Clostridiales	10.4	6.9	14.4	8.7	1.0	-	10.8	9.3	9.7	13.3			**272,** 512, 518-520
Planctomycetes	2.8	-	3.8	-			4.4	-	1.9	-			
Proteobacteria													
α-Proteobacteria	4.7	-	2.9	-	1.0	-	3.2	-	4.5	-	9.1	-	152, 439
β-Proteobacteria													
Rhodocyclales			1.0	1.9			8.2	10.4	5.2	6.3	49.1	63.7	**428**, **430**
Diverse	0.9	-	1.9	-			3.2	-	3.1	-	1.8	-	
γ-Proteobacteria	0.9	-			1.0	-							
δ-Proteobacteria													
Geobacteraceae	20.8	31.7	23.1	36.1	68.8	50.4	15.8	24.6	17.5	23.7	21.8	14.5	66, 161, 163
Myxococcaceae	6.6	13.8	7.7	11.8	13.5	30.0	15.2	14.6	2.6	3.1	-	3.6	**129, 133,**
Diverse	7.5	-	8.7	-	3.1	-	9.5	-	5.6	-			
Diverse			1.9	-			4.4	-	7.4	-			

a. Clones were assigned to different OTUs (operation taxonomic units) if they shared less than 97% 16S rRNA gene sequence similarity with each other.

b. Terminal restriction fragments (T-RFs) detected for a major number of clones within a lineage.

c. No determination of relative abundance due to the lack of a distinct assignable T-RF.

Major T-RFs are highlighted in bold.

Among the δ-*Proteobacteria* representatives belonging to the *Geobacteraceae* were most abundant in all analyzed clone libraries (Tab. 3, Fig. 7).

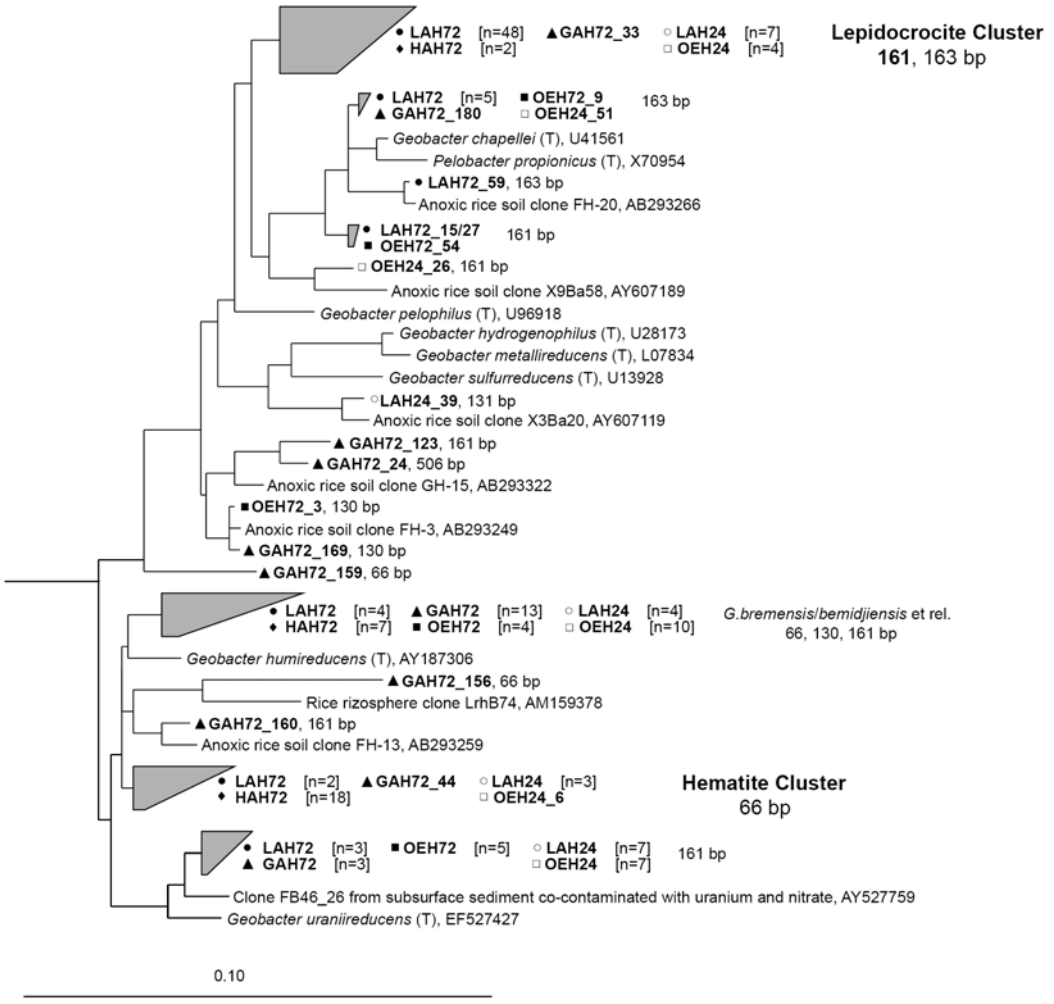


Figure 7. Phylogenetic affiliation of representative 16S rRNA clone sequences related to the *Geobacteraceae* generated from 'heavy' fraction of density-resolved rRNA. Clone libraries from which the clones were retrieved are indicated in bold and marked as follows: LAH24 (○), OEH24 (□), LAH72 (●), GAH72 (▲), HAH72 (♦) and OEH72 (■). Lengths of T-RFs (bp) result from *in silico* digestion of clonal 16S rRNA sequences with the restriction enzyme *Msp*I. The scale bar represents 10% sequence divergence. GenBank accessions numbers of reference sequences are given.

Geobacter-related sequences have an expected T-RF size of 66, 161 and 163 bp, which corresponds to the predominant T-RFs in the 'heavy' fractions of the microcosms with

lepidocrocite (Fig. 3B, 4A), goethite (Fig. 4B, 6A), hematite (Fig. 4C, 5A) and the control (Fig. 3C) at different time points of incubation.

Within the *Geobacteraceae*, the clones obtained in this study formed specific clusters related to *Geobacter* species, depending on the iron oxide used as electron acceptor (Fig. 7): The majority of the *Geobacter*-related sequences of the library LAH72 fell into a distinct cluster designated "Lepidocrocite cluster" (Fig. 7) sharing 93-95% sequence similarity to *Geobacter chapellei* based on 16S rRNA. *Geobacter*-related sequences within the clone library HAH72 also formed a specific cluster ("Hematite cluster", Fig. 7; characteristic T-RF of 66 bp), accounting for 12.4% of all clones. This cluster was affiliated with *G. bremensis*, *G. bemidjiensis* and *G. humireducens* (95-96% sequence similarity). *Geobacter*-related sequences of the other clone libraries were mostly related to *G. metallireducens* (96% sequence similarity), *G. uraniireducens* (95-96% sequence similarity), *G. bremensis* and *G. bemidjiensis* (95-99% sequence similarity). The second largest group within the δ-*Proteobacteria* was closely related to the *Myxococcaceae* (Fig. 8) and was represented by a characteristic T-RF of 129 bp. Among the libraries LAH72 and GAH72, 14% and 15% of the clones were affiliated to *Anaeromyxobacter dehalogenans* and *Anaeromyxobacter* sp. FAc 12 (Treude *et al*., 2003; 94-97% sequence similarity), respectively.

The major ^{13}C-acetate-assimilating bacterial population in the control under methanogenic conditions (represented by the T-RF of 428/430 bp) was affiliated with the β-proteobacterial *Rhodocyclales* (Fig. 9). In addition, clone sequences belonging to this phylogenetic group were also detected in the clone libraries OEH24, GAH72 and HAH72 but at low frequency (Tab. 3). The most closely related isolates of this clone cluster were *Azonexus fungiphilus* (94-97% sequence similarity), and *Dechloromonas* sp. CL (94-95% sequence similarity).

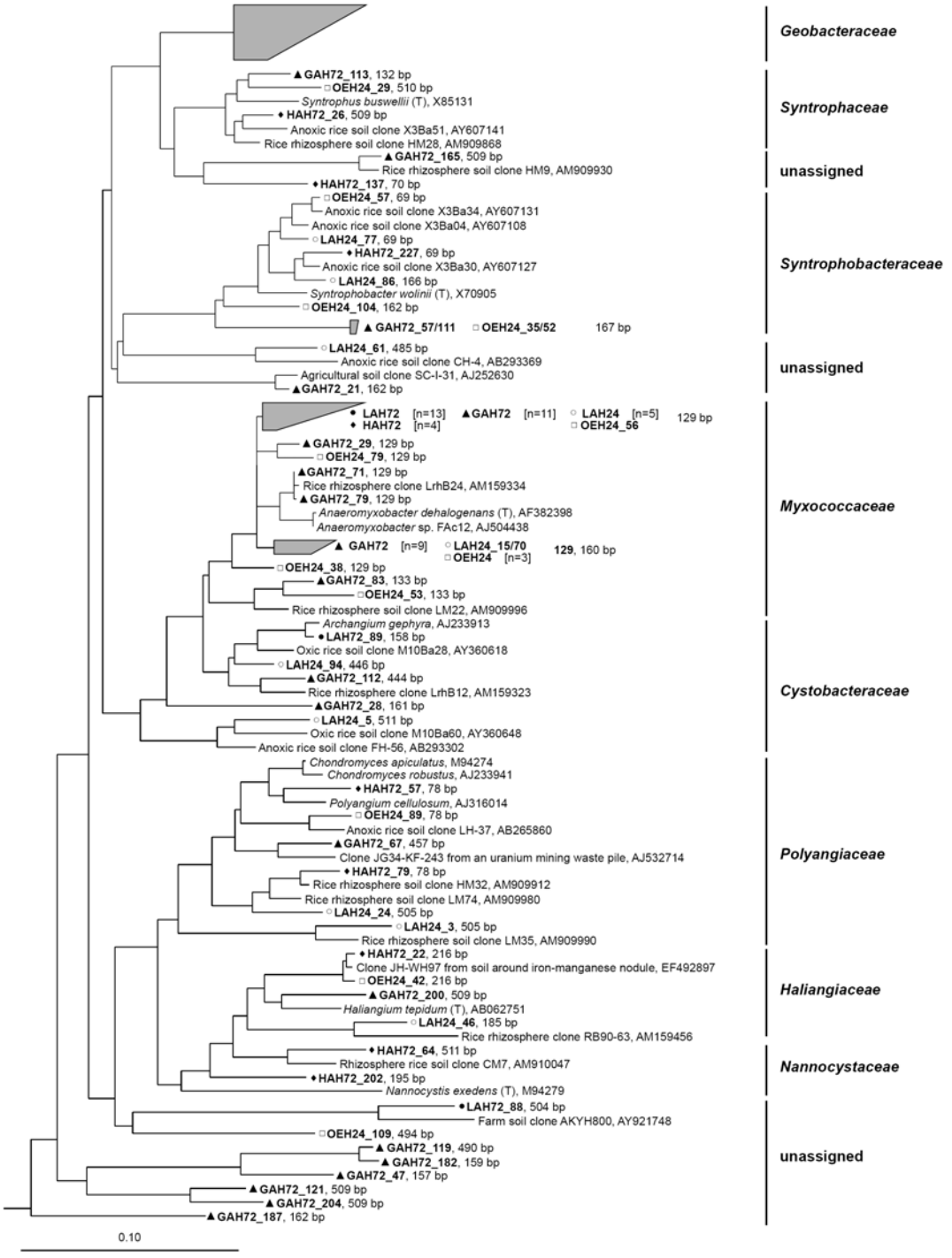


Figure 8. Phylogeny of clone sequences within the δ-*Proteobacteria* based on 16S rRNA. Symbols and scale bar were as described for Fig. 7.

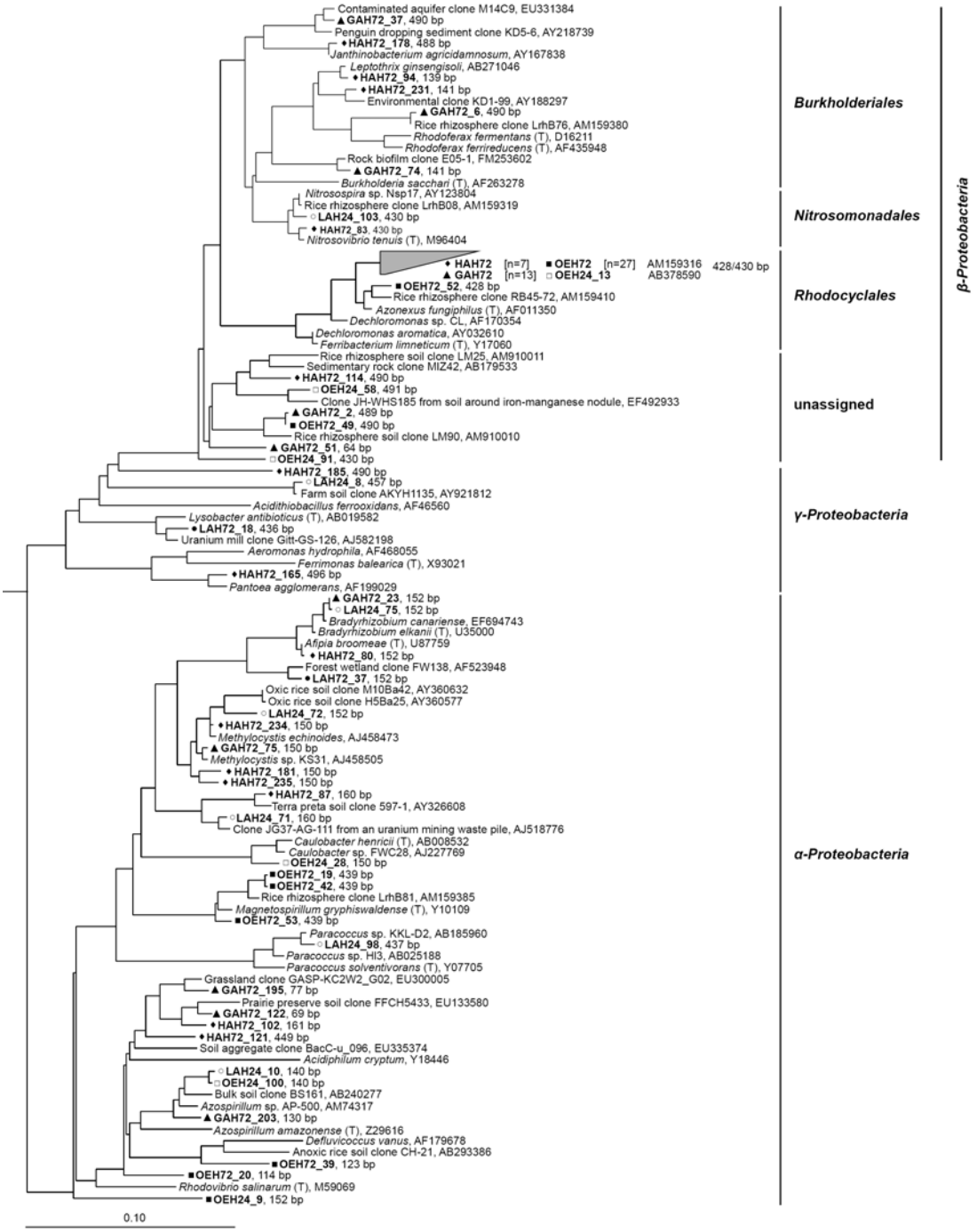


Figure 9. Phylogeny of clone sequences within the α-, β- and γ-subgroup of the *Proteobacteria* based on 16S rRNA. Symbols and scale bar were as described for Fig. 7.

The phylogenetic placement of clones related to the *Firmicutes* (*Clostridiales* and *Bacillales*) is shown in Figure 10. The T-RF of 272 bp, which appeared only in the 'heavy' fractions of the clone libraries OEH24, GAH72 and HAH72, was assigned to the *Clostridiales* (Fig. 10). However, a few clone sequences (theoretically with the same T-RF) were also detected in the clone libraries LAH24 and OEH72. The *Clostridiales*-related sequences formed a specific cluster and were most closely affiliated with three other clone sequences (Fig. 10), e.g. two retrieved from anoxic rice field soil (95-99% sequence similarity; Hengstmann *et al*., 1999; Lueders *et al*., 2004b) and one from the oxic-anoxic interphase of flooded rice field soil (95-98% sequence similarity; Noll *et al*., 2005). Regarding the *Bacillales*, sequences from the hematite library (HAH72) were most abundant (9%) and the clones were affiliated with *Bacillus subterraneus* (96% sequence similarity). In all analyzed clone libraries bacterial lineages known to be represented in the anoxic rice field soil community (e.g. *Actinobacteria*, *Bacteriodetes*, α-*Proteobacteria*; Chin *et al*., 1999; Hengstmann *et al*., 1999) were detected with more or less relative abundance (Tab. 3). However, the relatively low coverage values of the clone libraries LAH24, OEH24, GAH72 and HAH72 demonstrate that the number of analyzed clones were too low to adequately represent the full diversity in the constructed libraries (Tab. 3).

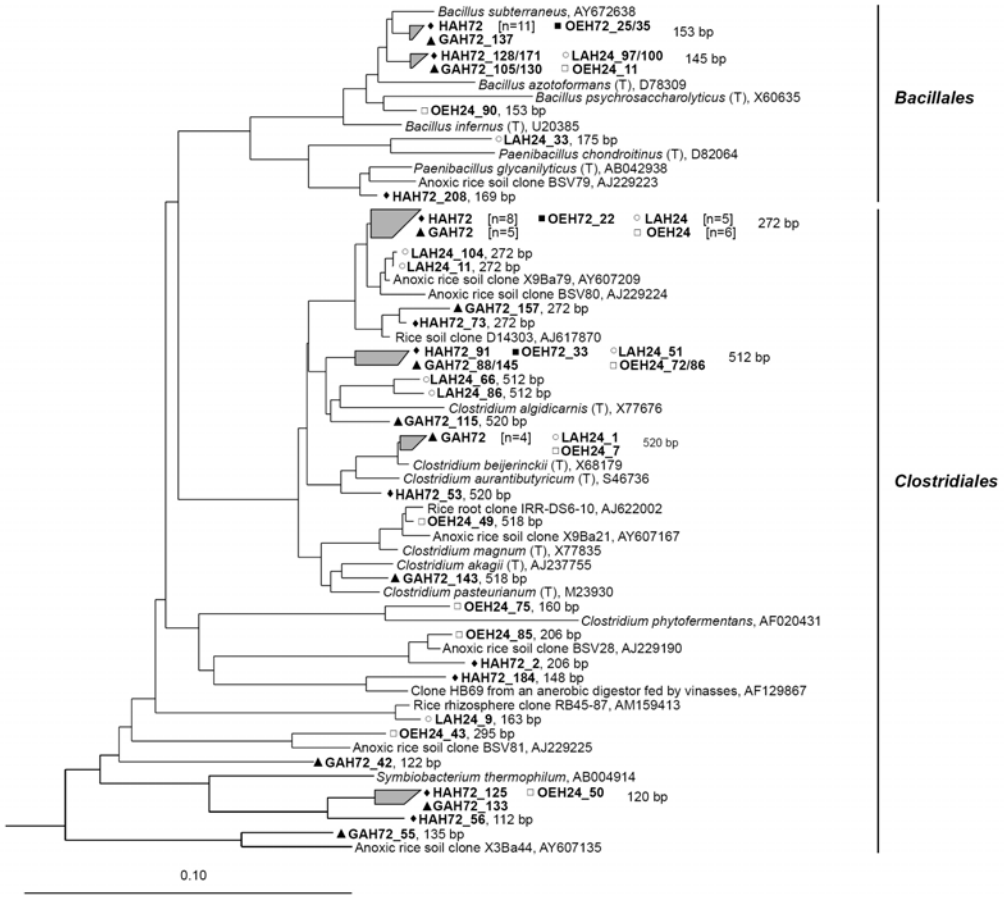


Figure 10. Phylogeny of clone sequences within the *Firmicutes* based on 16S rRNA. Symbols and scale bar were as described for Fig. 7.

DISCUSSION

Ferric iron oxides occur in nature as a spectrum of phases ranging from amorphous phases (e.g. ferrihydrite) to well crystallized minerals such as lepidocrocite, goethite and hematite, and often represent the dominant electron acceptor in many soils and sediment. In rice field soil, ferric iron reduction is the second most important anaerobic process in organic matter mineralization after methanogenesis, accounting for more than half of the electron balance (Yao *et al*., 1999).

In this study, we identified the iron-reducing microbial populations in rice field soil microcosms combining biogeochemical methods and stable isotope probing of RNA. We found that distinct bacterial populations are involved in the assimilation of ^{13}C-acetate in the presence of ferric iron oxides with differing mineral properties (i.e. ferrihydrite,

lepidocrocite, goethite, and hematite). Presumably, few distinct species within the *Geobacteraceae* and *Myxococcaceae* mediate the reduction of ferrihydrite, lepidocrocite and goethite in rice field soil. In addition, novel β-*Proteobacteria* were detected in incubations supplemented with goethite and hematite as well as in the control, only distantly related to the cultured representatives *Azonexus fungiphilus*, and *Dechloromonas* sp. CL (93-97% sequence similarity). This population might be able to couple the oxidation of acetate to the reduction of ferric iron oxides with low bioavailability persistent even after the long pre-incubation period.

Stable isotope probing of iron-reducing bacteria in rice field soil

Previously, stable isotope probing of RNA was successfully applied to target iron-reducing populations as a functional guild by Hori and collegues (submitted). ^{13}C-labelled acetate was used as carbon source to trace iron-reducing microorganisms in the presence of ferrihydrite or Al-goethite as predominant electron acceptor in rice field soil microcosms incubated for 72 hours. Acetate, as an important intermediate in the degradation of organic matter in rice field soil was assimilated mainly by members of the δ-*Proteobacteria*, suggesting that these bacteria were actively involved in the reduction of ferrihydrite or Al-goethite (Hori *et al*., submitted).

In this study, we used a similar labeling approach to identify the iron-reducing populations in the presence of multiple ferric iron oxides with differing characteristics (i.e. ferrihydrite, lepidocrocite, goethite, and hematite) in comparison to a control. ^{13}C-labelled acetate was added to the microcosms in three pulses (0.7 mM final concentration each time). The renewed amendment of label enabled us to analyze the iron-reducing bacterial community at different time points of the incubation. The first effects of label incorporation into the RNA of actively iron-reducing bacteria were already detectable after 24 hours in the microcosms amended with ferrihydrite, lepidocrocite, and in the control (Fig. 3). Cross-feeding was unlikely to occur during this relatively short time of ^{13}C-labeling. Furthermore, low acetate concentrations (0.7 mM) were chosen to avoid potential bias via enrichment, which can be a major limitation of SIP (Friedrich, 2006; Neufeld *et al*., 2007). Most effective in the assimilation of ^{13}C-acetate after 24 hours were *Geobacter*-related populations (characteristic T-RFs of 66/161/163 bp) and *Anaeromyxobacter* spp. (characteristic T-RF of 129 bp) as detected in T-RFLP profiles (Fig. 3) as well as in the clone libraries LAH24 and OEH24 (Tab. 3, Fig. 7 and 8).

Cloning/sequencing and T-RFLP analysis of the bacterial communities derived from microcosms incubated for 72 hours confirmed the dominant capability of *Geobacter*- and *Anaeromyxobacter*-related populations to dissimilatorily reduce different phases of ferric iron oxides (Fig. 4, 7, and 8). However, changes in relative abundances were observed between the different treatments (Tab. 3). Apparently, *Geobacter* spp. were most active in microcosms supplemented with lepidocrocite and hematite, while *Anaeromyxobacter* spp. assimilated ^{13}C-acetate to a similar extent as *Geobacter* spp. in the goethite-amended microcosms. Coexistence of *Geobacter* and *Anaeromyxobacter* spp. in microcosms supplemented with goethite was observed previously (Hori *et al*., submitted). Although profiling of Fe(II) revealed no Fe(III)-reducing activity (Fig. 1), known iron-reducing bacteria were predominantly labelled in the microcosms with goethite and hematite. This finding suggests that goethite as well as hematite must have served as electron acceptor for acetate oxidation.

Other bacterial populations assimilating ^{13}C-acetate

Besides *Geobacter* and *Anaeromyxobacter* spp. additional populations were detected in 'heavy' RNA fractions. These clones belonged to the *Chloroflexi*, *Firmicutes* (*Clostridiales* and *Bacillales*) and β-*Proteobacteria*. The bacterial population related to the *Chloroflexi* was rather diverse and present in all treatments varying relative abundances (Tab. 3), depending on the incubation time of the microcosms. Clone sequences affiliated with the *Clostridiales* (Fig. 10) reflected a part of the bacterial community typically observed in anoxic rice field soil (e.g. Chin *et al*., 1999; Hengstmann *et al*., 1999; Lueders *et al*., 2004b; Noll *et al*., 2005). Although, some species of the genus *Clostridium* are capable of Fe(III) reduction (e.g. *Clostridium beijerinckii*; Dobbin *et al*., 1999) it is unlikely, that this population was involved in Fe(III) reduction in this study because the T-RF of 272 bp showed an increasing relative abundance towards the lighter fractions of all microcosms (Fig. 3, 4, 5, and 6).

Potentially involved in the reduction of hematite were also smaller populations within the *Bacillaceae* (Tab. 3, Fig. 10) closely related to *Bacillus subterraneus* (96% sequence similarity). This species can utilize amorphous Fe(III) as electron acceptor to conserve energy for growth from acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction (Kanso *et al*., 2002). However, this population was not anymore detected in the 'heavy' fraction of the hematite

treatment after 168 hours of incubation (Fig. 5) suggesting that this population was not involved in the reduction of hematite.

A shift over time was observed in the ^{13}C-acetate assimilating population in microcosms without additional ferric iron oxides (control). After 24 hours the bacterial community was quite diverse (Tab. 3, Fig. 3C) while the β-proteobacterial *Rhodocyclales* (T-RF of 428/430 bp) represent the predominant population (~64%) after 72 hours (Fig. 4D) based on combined T-RFLP and cloning/sequencing analysis. Clone sequences formed a distinct cluster within the phylogenetic tree and were most closely related to *Dechloromonas* sp. CL and *Azonexus fungiphilus* (Fig. 9). *Dechloromonas* spp. are strictly respiring microorganisms, known to use (per)chlorate and nitrate as electron acceptor (Achenbach *et al*., 2001) and, have so far not been directly linked to Fe(III)-reducing activity. However, we assume that *Dechloromonas* spp. might be able to couple the assimilation of ^{13}C-acetate to the reduction of ferric iron oxides with low bioavailability, which were still present in rice field soil despite the pre-incubation. In a previous study, these species were detected assimilating ^{13}C-acetate under iron-reducing conditions (goethite) at a relative abundance of ~7% (Hori *et al*., submitted). We have also found label incorporation from ^{13}C-lactate by *Dechloromonas* spp. under methanogenic conditions in rice field soil microcosms (Müller *et al*., unpublished data). Furthermore, uncultured *Dechloromonas* spp. have been identified as significant members of Fe(III)-reducing (high surface area goethite) and nitrate-dependent Fe(II) oxidation in a freshwater enrichment culture (Weber *et al*., 2006a). Also the presence of this population in microcosms supplemented with hematite (Fig. 4C, 5A) or goethite (Fig. 4B, 6A) confirm our hypothesis that these novel, as yet uncultured *Rhodocyclales* can reduce Fe(III) mineral phases with low bioavailability (e.g. goethite and hematite) or other Fe(III) oxide mineral phases.

The predominance of these β-*Proteobacteria* under methanogenic conditions were contradictory to the results obtained previously (Hori *et al*., 2007). In this study, *Geobacter* spp. and *Anaeromyxobacter* spp. were able to assimilate ^{13}C-acetate under methanogenic conditions in rice field soil and the authors therefore assumed that these species can utilize some of the barely accessible Fe(III) oxides as electron acceptor. The shift in the microbial community might be due to different experimental setups, e.g. addition of carbon source at different time points, longer incubation time and also the type of soil used ("recycled" vs. "fresh" rice field soil). In addition, CsTFA BD of the heaviest RNA obtained in the previous study (BD of 1.806 g ml^{-1}) was not as high as that of the

RNA fully labelled with ^{13}C (BD of 1.81-1.82 g ml^{-1}; Lueders *et al*., 2004a). Thus, the active microbial populations were not completely labelled compared to the heaviest RNA obtained in our study (BD of 1.818 g ml^{-1}). However, our results also showed that the duration of SIP might select for *Geobacter* spp. as indicated by T-RFLP profiles of control microcosms incubated for 168 (Fig. 5B) and 240 hours (Fig. 6B). Nevertheless, the role of β-proteobacterial *Rhodocyclales* remains unknown and further investigations are necessary to identify the function of these novel species in rice field soil.

Influence of iron oxide mineral phase on the iron-reducing bacterial community

This is to our knowledge the first study characterizing the influence of different Fe(III) oxides on structure and function of the bacterial community in rice field soil. We could clearly show that the amendment of different phases of Fe(III) oxides selected for distinct ^{13}C-acetate-assimilating bacterial populations in rice field soil (Tab. 3). The Fe(III) oxides used in our experiment differ in cristallinity, surface area and associated particle size (Tab. 1). These factors appear to influence the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) oxides (Roden and Zachara, 1996; Zachara *et al*., 1998) and might play a role in the selection of distinct bacterial populations. Roden (2006) proposed that oxide surface area rather than crystal structure controls rate and extent of Fe(III) reduction. However, we have no clear evidence, which factor mentioned above influenced the reduction of the different Fe(III) oxides and resulted in the development of distinct bacterial populations. In our experimental setup Fe(III) oxides were added in concentrations, high enough for the complete oxidation of acetate. To proof the hypothesis of Roden (2006) equal amounts of each Fe(III) oxide have to be added to the microcosms adapted to the surface area. In addition, the microbial Fe(III) reduction rate may be influenced by sorption of Fe(II) to oxides and Fe(III)-reducing bacterial surfaces (Urrutia *et al*., 1998) and formation of soluble Fe(II)-organic complexes (Urrutia *et al*., 1999). Previous studies showed, that the removal of biogenic Fe(II) by aqueous-phase transport decreased the influence of surface-bound Fe(II) on oxide reduction and thereby allowed for an increase in the extent of Fe(III) reduction (Roden *et al*., 2000; Roden and Urrutia, 1999). The sorption of Fe(II) to oxide surface might be an explanation for the low microbial reducibility of goethite and hematite. The influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction (e.g. goethite) was examined in pure cultures of *Shewanella algae* strain BrY (Roden and Zachara, 1996) and *Geobacter metallireducens* (Roden and Urrutia, 2002). Adsorption

and/or surface precipitation of Fe(II) on Fe(III) oxide and cell surfaces appeared to be primarily responsible for the cessation of goethite reduction activity after only a relatively small fraction (generally < 10%) of the oxides had been reduced. However, further experiments are necessary to elucidate whether the sorption of Fe(II) had an effect on the reducibility of goethite and hematite in rice field soil.

Besides the development of distinct phylogenetic populations a shift within the *Geobacter*-related population was observed after 72 hours of incubation. The obtained clone sequences formed distinct clusters, depending on the iron oxide present as electron acceptor (Fig. 7). *Geobacter*-related sequences in the microcosm with lepidocrocite were only distantly related to *G. chapellei* while the sequences within the microcosms with hematite were affiliated with *G. bremensis*, *G. bemidjiensis* and *G. humireducens* (95-96% sequence similarity). All of these species are known as dissimilatory iron-reducers (Lovley *et al*., 2004). These distinct clusters posses different characteristic T-RFs and therefore we were capable to differentiate between these populations also by T-RFLP analysis. The T-RF of 66 bp (characteristic for the "Hematite cluster") was also detected in the goethite amended microcosms, thus this population might be involved in the reduction of Fe(III) oxides with low bioavailability. The selective reduction of distinct phases of Fe(III) oxides by *Geobacter* spp. might be a result of different electron transfer strategies. So far it is known that *Geobacter* spp. requires direct contact with the Fe(III) oxide mineral for the reduction of insoluble Fe(III) oxides (Nevin and Lovley, 2000) and the pili formed by *Geobacter* spp. function as an electrical conduit for the transfer of electrons to insoluble Fe(III) oxides (Reguera *et al*., 2005). The production of endogenously and exogenously electron shuttles (e.g. humic acids, quinones) and of complexing ligands are two other possibilities for the transfer of electron to insoluble Fe(III) oxides. However, these strategies have been only described for the iron-reducers *Shewanella* spp. and *Geothrix* spp., respectively and have not been verified for *Geobacter* spp. (Weber *et al*., 2006b).

CONCLUSION

In this study we could demonstrate, that the phase of Fe(III) oxides added as electron acceptor is selective for the iron-reducing community in anoxic rice field soil. Using stable isotope probing of RNA we found a predominance of *Geobacter* spp. in microcosms with ferrihydrite, lepidocrocite and hematite and a specialization within this

population in the reduction of these distinct Fe(III) mineral phases. Besides *Geobacter* spp., a population related to *Anaeromyxobacter* spp. was involved in the reduction of goethite.

A phylogenetically novel bacterial population belonging to the *Rhodocyclales* was predominant in the assimilation of ^{13}C-acetate in microcosms without additional iron oxide. The presence of this population in hematite- and goethite-amended microcosms suggests that these as yet uncultured β-proteobacterial *Rhodocyclales* are potentially involved in the reduction of Fe(III) oxides with low bioavailability. However, only the isolation of pure cultures of this population will provide further insights into the function and form of energy metabolism in anoxic rice field soil.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and characterization of ferric iron oxides

Fe(III) oxides (i.e. ferrihydrite, lepidocrocite, goethite and hematite) used as electron acceptors were synthesized according to the method of Schwertmann and Cornell (2000). Due to the synthesis in aqueous systems, iron oxides must be washed (carried out by centrifugation and decantation) in order to remove impurity ions associated with the procedure (e.g., chloride and nitrate). After washing, the supernatant was tested for the presence of these ions by precipitation as AgCl (chloride) or the diphenylamine reaction (nitrate) (Schwertmann and Cornell, 2000). No ions were detected. Subsequently, the Fe(III) oxides were freeze-dried and stored at -20°C.

Iron oxides were characterized using X-ray powder diffraction (XRD) analysis. XRD data were collected with a Philips X´Pert Pro MPD using CoKα radiation. Crystallinity and purity of iron oxides were evaluated by comparison with spectra from reference materials. The particle sizes of the different iron oxides were calculated using the Scherrer formula. The specific surface area of each iron oxide was determined by multi-point BET-N_2 adsorption.

Soil samples and slurry experiments

Rice field soil was collected in 2006 from a field of the Italian Rice Research Institute near Vercelli, Italy. The soil was air dried and stored at room temperature. Preparation of the soil and sieving (mesh size 2 mm) were carried out as previously described (Lueders and Friedrich, 2000). Soil slurry experiments were set up by mixing dry soil in a ratio 1:2

with distilled water. In order to reduce all endogenous electron acceptors, especially ferric iron, the slurry was flushed with N_2 and pre-incubated for 36 days at 25°C in the dark. In the anaerobic glove box a defined amount (20 g) of the homogenized slurry was transferred into 60-ml serum vials containing Fe(III) oxide minerals at a final concentration of 70 µmol g^{-1} or 140 µmol g^{-1}. Four Fe(III) oxides which differ in cristallinity, particle size and the associated surface area were tested as electron acceptors (i.e. ferrihydrite, lepidocrocite, hematite and goethite; Roden, 2003). Ferrihydrite is poorly crystalline in contrast to the well crystalline iron oxides lepidocrocite, hematite and goethite. The following treatments were prepared: (i) ferrihydrite (70 µmol g^{-1}), (ii) lepidocrocite (70 µmol g^{-1}), goethite (140 µmol g^{-1}), (iv) hematite (140 µmol g^{-1}) and (v) a control treatment without the amendment of Fe(III) oxides. The vials were sealed with butyl rubber septa and flushed with N_2. The experiments were started with the supplementation of the carbon source, $^{13}C_2$-labelled acetate (99 atom%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). The carbon source was added in portions of 0.7 mM at 0, 24 and 48 hours to a final concentration of 2.1 mM. Each treatment was run in triplicates with static incubation at 25°C in the dark for 72, 168 (hematite) and 240 (goethite) hours, respectively. Samples of the headspace, the slurry and the porewater were removed at different time points of incubation (0, 8, 24, 48, 72, 168 and 240 hours) from three vials of each treatment. Slurry as well as porewater samples were frozen and stored at -20°C for biogeochemical parameters (fatty acids) and at -80°C for molecular analysis.

Biogeochemical analyses

Pore water samples were filtered through 0.2 µm filters (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Nitrite, nitrate and sulfate were determined by ion chromatography (Bak *et al*., 1991). Acetate concentrations were measured by high performance liquid chromatography on an Aminex HPX-87H ion exclusion column (Bio-Rad Laboratories) equipped with refraction index (ERC-7512; ERMA Cr.Inc., Tokio, Japan) and UV detector (UVIS 200; LINAER Instruments, Reno, USA), with 1 mM H_2SO_4 solution as eluent with a flow rate of 0.5 ml min^{-1}. Gas samples (CO_2 and CH_4) were taken from the headspace of the vials and measured on a GC-8A gas chromatograph (Shimadzu, Japan) using a packed column (2 m by 1/8´´ inner diameter, Hayesep Q, Alltech, Germany) at 80°C and a FID heated to 230°C. Chromatograms were analyzed with the Peak Simple software (SRI Instruments, Torrance, CA). The ^{13}C atoms percent of CO_2 and CH_4 was analyzed by gas

chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-c-IRMS) as described previously (Conrad *et al*., 2000). Ferrous iron was analyzed in slurry samples with ferrozine reagent as detailed (Achtnich *et al*., 1995).

Extraction of nucleic acids and density gradient centrifugation

Total DNA and RNA were extracted simultaneously from one soil sample (1.5 g) of each time point using a direct lysis technique (Lueders *et al*., 2004a). The co-extracted DNA was removed from an aliquot of the RNA by digestion with RNase free DNase I (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the RNA was re-extracted as described elsewhere (Lueders *et al*., 2004a). Complete removal of DNA from the RNA extracts was verified by 16S rRNA gene based PCR using Primers Ba27f (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3´) (Edwards *et al*., 1989) and Ba907r (5´-CAA TCA ATT CCT TTR AGT TT-3´) (Muyzer *et al*., 1995). Total RNA from the treatments was quantified using the Ribogreen RNA quantification kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA extracts (500 ng of RNA) of the labelled treatments were mixed with cesium trifluoroacetate (CsTFA) (Amersham Biosience, Freiburg, Germany) solution. In order to separate the RNA on the basis of the molecular weight, equilibrium density gradient centrifugation was performed under the conditions described previously (Lueders *et al*., 2004a). Gradients of density-resolved RNA were fractionated and the CsTFA buoyant density (BD) of each fraction was determined. Nucleic acids were precipitated over night with 3 M sodium acetate and ethanol for subsequent community analysis.

Reverse transcription and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis

Bacterial 16S rRNA genes were specifically amplified from density-resolved bacterial community RNA using the Access one–tube RT-PCR system (Promega, Mannheim, Germany) and the primer set Ba27f-FAM (6-carboxyfluorescein-labelled) and Ba907r. Two microliter of RNA extract was added as template. Reverse transcription was carried out for 45 min at 48°C, and PCR was started with an initial denaturation step (120 s, 94°C). The thermal profile of amplification consisted of 23 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 52°C; 60 s, 68°C) and a terminal extension step (10 min, 68°C). The bacterial community

dynamics in the density gradient fractions of the different treatments were analyzed by T-RFLP profiling. The analysis was performed as previously described (Lueders and Friedrich, 2002). Briefly, 6´carboxyfluorescein-labelled (FAM) PCR products (~ 120 ng) were digested using the restriction enzyme *Msp*I and the digested amplicons were purified, using Sigma Spin™ Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The digest (1 µl) was mixed with 11 µl deionized formamide (HI-DI; Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and 0.2 µl of GeneScan-1000 (ROX) size standard (x-rhodamine Map Marker® 1000, Bio Ventures, Murfeesboro, USA), denaturated for 3 min at 95°C, and placed immediately on ice. Fluorescently labelled terminal restriction fragments (T-RFs) were size separated on an ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) in GeneScan mode. T-RFLP electropherograms were analyzed using the GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems).

Cloning, sequencing and phylogenetic analysis

Selected density fractions of bacterial RNA were amplified for cloning (Tab. 2). The thermal conditions and the primer set Ba27f/Ba907r for RT-PCR were mentioned above. Fragments were cloned in *Escherichia coli* JM109 using the pGEM®-T Vector System II (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. A total of 673 randomly selected clones [LAH24 (106), OEH24 (104), LAH72 (96), GAH72 (158), HAH72 (154), OEH72 (55)] were checked for correct insert size by vector-targeted PCR using primers M13f (5´-GTA AAA CGA CGG CCA G-3`) and M13r (5´-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3´) and gel electrophoresis. The sequence analysis was performed at the core facility ADIS at the Max Planck Institute for plant breeding research (Cologne, Germany). Clone libraries were screened for chimera by analysis with Mallard software (Ashelford *et al*., 2006) and the Bellerophon server (Huber *et al*., 2004). 13 putative chimera were verified by fractional treeing (Ludwig *et al*., 1997) and excluded from further analysis.

The diversity coverage of libraries was calculated according to the formula $C = [1 - (n_1 \times N^{-1})] \times 100$, where n_1 = number of OTUs consisting of only one species and N = number of all sequences in the 16S rRNA gene library (Wagner *et al*., 2002). The number of OTUs was determined with the DOTUR software using the furthest neighbour sequence assignment (Schloss and Handelsman, 2005). The obtained 16S rRNA gene sequences were compared to sequences in public databases with BLASTN and closely related

sequences from databases were retrieved and added to the alignment. Phylogenetic analysis was conducted by using the ARB software package (http://www.arb-home.de; Ludwig *et al*., 2004). The 16S rRNA gene sequences were added to the database, aligned with the Fast Aligner tool of the ARB software (version corrected January, 2004, released January 2005) and phylogenetic trees were constructed by the fast parsimony and neighbor joining methods. For correlation of clones with their corresponding T-RFs the "T-RF-cut"-tool was used (Ricke *et al*., 2005). Sequence data were deposited with GeneBank under Accession numbers xy.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Bianca Pommerenke and Peter Claus for excellent technical assistance, and thank Prof. Dr. Massa (University of Marburg) for the XRD analysis and the calculation of the particle size of the Fe(III) oxides. We also thank Karin Eusterhues (University of Jena) for multi-point BET-N_2 analysis.

This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the SFB395 "Interactions, adaptations and catalytic capabilities of soil microorganisms" and by the Max-Planck Society.

REFERENCES

Achenbach,L.A., Michaelidou,U., Bruce,R.A., Fryman,J., and Coates,J.D. (2001) *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:** 527-533.

Achtnich,C., Bak,F., and Conrad,R. (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19:** 65-72.

Ashelford,K.E., Chuzhanova,N.A., Fry,J.C., Jones,A.J., and Weightman,A.J. (2006) New Screening Software Shows that Most Recent Large 16S rRNA Gene Clone Libraries Contain Chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72:** 5734-5741.

Bacha,R.E. and Hossner,L.R. (1977) Characteristics of Coatings Formed on Rice Roots As Affected by Iron and Manganese Additions. *Soil Science Society of America Journal* **41:** 931-935.

Bak,F., Scheff,G., and Jansen,K.H. (1991) A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfate reduction-rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 23-30.

Chen,C.C., Dixon,J.B., and Turner,F.T. (1980) Iron Coatings on Rice Roots - Mineralogy and Quantity Influencing Factors. *Soil Science Society of America Journal* **44:** 635-639.

Chidthaisong,A. and Conrad,R. (2000) Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 73-86.

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

Conrad,R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60:** 609-640.

Conrad,R., Klose,M., and Claus,P. (2000) Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 828-831.

Cornell,R.M. and Schwertmann,U. (2003) *The Iron Oxides*. WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Dobbin,P.S., Carter,J.P., San Juan,C.G.S., von Hobe,M., Powell,A.K., and Richardson,D.J. (1999) Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* **176:** 131-138.

Edwards,U., Rogall,T., Blocker,H., Emde,M., and Bottger,E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17:** 7843-7853.

Frenzel,P., Bosse,U., and Janssen,P.H. (1999) Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. *Soil Biology & Biochemistry* **31:** 421-430.

Friedrich,M.W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr. Opinion Biotechnol.* **17:** 59-66.

Hengstmann,U., Chin,K.J., Janssen,P.H., and 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.

Hori,T., Müller,A., Igarashi,Y., and Conrad,R. (submitted) Identification of ferrihydrite- and goethite-reducing microorganisms in anoxic paddy soil by ^{13}C-acetate probing. *ISME Journal*.

Hori,T., Noll,M., Igarashi,Y., Friedrich,M.W., and Conrad,R. (2007) Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 101-109.

Huber,T., Faulkner,G., and Hugenholtz,P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20:** 2317-2319.

Jäckel,U. and Schnell,S. (2000a) Role of microbial iron reduction in paddy soil. In *Non-CO_2 greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation*. van Ham,J., Baede,A.P.M., Meyer,L.A., and Ybema,R. (eds). Dordrecht, NL: Kluwer, 143-144.

Jäckel,U. and Schnell,S. (2000b) Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **32:** 1811-1814.

Kanso,S., Greene,A.C., and Patel,B.K.C. (2002) *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **52:** 869-874.

Karim,Z. (1984) Formation of Aluminum-Substituted Goethite in Seasonally Waterlogged Rice Soils. *Soil Science Society of America Journal* **48:** 410-413.

Lovley,D.R. (1987) Organic-Matter Mineralization with the Reduction of Ferric Iron - A Review. *Geomicrobiology Journal* **5:** 375-399.

Lovley,D.R., Holmes,D.E., and Nevin,K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* **49:** 219-286.

Lovley,D.R. and Phillips,E.J.P. (1987) Competitive Mechanisms for Inhibition of Sulfate Reduction and Methane Production in the Zone of Ferric Iron Reduction in Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53:** 2636-2641.

Ludwig,W., Bauer,S.H., Bauer,M., Held,I., Kirchhof,G., Schulze,R. *et al*. (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153:** 181-190.

Ludwig,W., Strunk,O., Westram,R., Richter,L., Meier,H., Yadhukumar *et al*. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32:** 1363-1371.

Lueders,T. and Friedrich,M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2732-2742.

Lueders,T. and Friedrich,M.W. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2484-2494.

Lueders,T., Manefield,M., and Friedrich,M.W. (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6:** 73-78.

Lueders,T., Pommerenke,B., and Friedrich,M.W. (2004b) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 5778-5786.

Manefield,M., Whiteley,A.S., Griffiths,R.I., and Bailey,M.J. (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 5367-5373.

Munch,J.C. and Ottow,J.C.G. (1980) Preferential Reduction of Amorphous to Crystalline Iron-Oxides by Bacterial-Activity. *Soil Science* **129:** 15-21.

Muyzer,G., Teske,A., Wirsen,C.O., and Jannasch,H.W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164:** 165-172.

Neufeld,J.D., Dumont,M.G., Vohra,J., and Murrell,J.C. (2007) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb. Ecol.* **53:** 435-442.

Nevin,K.P. and Lovley,D.R. (2000) Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2248-2251.

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

Phillips,E.J.P., Lovley,D.R., and Roden,E.E. (1993) Composition of Non-Microbially Reducible Fe(III) in Aquatic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:** 2727-2729.

Qu,D., Ratering,S., and Schnell,S. (2004) Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in Paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72:** 1172-1181.

Ratering,S. and Schnell,S. (2000) Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochem.* **48:** 341-365.

Reguera,G., McCarthy,K.D., Mehta,T., Nicoll,J.S., Tuominen,M.T., and Lovley,D.R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435:** 1098-1101.

Ricke,P., Kolb,S., and 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.

Roden,E.E. (2003) Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environmental Science & Technology* **37:** 1319-1324.

Roden,E.E. (2006) Geochemical and microbiological controls on dissimilatory iron reduction. *Comptes Rendus Geoscience* **338:** 456-467.

Roden,E.E. and Urrutia,M.M. (1999) Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* **33:** 1847-1853.

Roden,E.E. and Urrutia,M.M. (2002) Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiology Journal* **19:** 209-251.

Roden,E.E., Urrutia,M.M., and Mann,C.J. (2000) Bacterial reductive dissolution of crystalline Fe(III) oxide in continuous-flow column reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 1062-1065.

Roden,E.E. and Wetzel,R.G. (2003) Competition between Fe(III)-reducing and methanogenic bacteria for acetate in iron-rich freshwater sediments. *Microb. Ecol.* **45:** 252-258.

Roden,E.E. and Zachara,J.M. (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology* **30:** 1618-1628.

Schloss,P.D. and Handelsman,J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71:** 1501-1506.

Schwertmann,U. and Cornell,R.M. (2000) *Iron Oxides in the Laboratory*. WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Teh,Y.A., Dubinsky,E.A., Silver,W.L., and Carlson,C.M. (2008) Suppression of methanogenesis by dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria in tropical rain forest soils: implications for ecosystem methane flux. *Glob. Change Biol.* **14:** 413-422.

Treude,N., Rosencrantz,D., Liesack,W., and Schnell,S. (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44:** 261-269.

Urrutia,M.M., Roden,E.E., Fredrickson,J.K., and Zachara,J.M. (1998) Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron- reducing bacterium *Shewanella alga*. *Geomicrobiology Journal* **15:** 269-291.

Urrutia,M.M., Roden,E.E., and Zachara,J.M. (1999) Influence of aqueous and solid-phase Fe(II) complexants on microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* **33:** 4022-4028.

van Bodegom,P.M., Scholten,J.C.M., and Stams,A.J.M. (2004) Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49:** 261-268.

Wagner,M., Loy,A., Nogueira,R., Purkhold,U., Lee,N., and Daims,H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81:** 665-680.

Weber,K.A., Urrutia,M.M., Churchill,P.F., Kukkadapu,R.K., and Roden,E.E. (2006a) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ. Microbiol.* **8:** 100-113.

Weber,K.A., Achenbach,L.A., and Coates,J.D. (2006b) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Micro.* **4:** 752-764.

Yao,H., Conrad,R., Wassmann,R., and Neue,H.U. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47:** 269-295.

Zachara,J.M., Fredrickson,J.K., Li,S.M., Kennedy,D.W., Smith,S.C., and Gassman,P.L. (1998) Bacterial reduction of crystalline Fe^{3+} oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* **83:** 1426-1443.

Zehnder,A.J.B. and Stumm,W. (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder,A.J.B. (ed). New York: Wiley, 1-38.

Supplementary material

Table S1. Concentration of CH_4, CO_2, $^{13}CH_4$, $^{13}CO_2$, Fe(II), residual acetate and suppression of CH_4 after 72 hours of incubation (means ± standard deviations [SD]; n = 2 or 3).

Soil treatment	CH_4	Suppression of CH_4	CO_2	$^{13}CH_4$	$^{13}CO_2$	Fe(II)	Acetate
	[µmol g_{dw}^{-1}]	production [%]	[µmol g_{dw}^{-1}]	[atom%]	[atom%]	[µmol g_{dw}^{-1}]	[mM]
No amendment	2.13 ± 0.24	-	25.28 ± 3.27	65.61 ± 3.80	10.72 ± 0.76	99.89 ± 4.89	1.42 ± 0.0003
Ferrihydrite amendment	1.06 ± 0.05	50.2	4.02 ± 0.49	67.80 ± 2.04	17.24 ± 2.16	244.83 ± 5.60	n.d.
Lepidocrocite amendment	1.51 ± 0.21	29.6	15.21 ± 2.01	56.29 ± 4.31	9.88 ± 2.16	205.44 ± 30.39	0.37 ± 0.090
Goethite amendment	2.56 ± 0.62	-	24.63 ± 5.51	71.75 ± 3.01	11.91 ± 1.36	107.11 ± 3.31	1.09 ± 0.03
Hematite amendment	2.30 ± 0.21	-	15.63 ± 1.22	28.39 ± 0.99	9.66 ± 0.99	94.38 ± 2.57	2.30 ± 0.19

3. Identifizierung von ^{13}C-Lactat-verwertenden Populationen unter eisenreduzierenden Bedingungen in Reisfeldboden mittels RNA-basierender Stabiler Isotopenbeprobung

Alexandra Müller, Maike Katharina Fuhr, Bianca Pommerenke und Michael W. Friedrich

Zusammenfassung. Lactat ist ein wichtiges Intermediat im Abbau von organischem Material und eine bedeutende Kohlenstoffquelle für eisenreduzierende Mikroorganismen. In dieser Studie wurde der Abbau von Lactat zu Methan in Reisfeldboden unter Zugabe von Eisen(III)-Oxiden (Ferrihydrit oder Lepidokrokit) mittels biogeochemischer und molekularer Methoden analysiert. Die Inhibierung der Methanbildung wurde in den Ansätzen mit Ferrihydrit und Lepidokrokit bestätigt, während die Reduktion von Eisen nach 48 beziehungsweise 72 Stunden beobachtet wurde. Mittels RNA-basierender Stabiler Isotopenbeprobung wurden sehr unterschiedliche Populationen detektiert, die an der Umsetzung von ^{13}C-Lactat zu Methan beteiligt waren. Terminale-Restrikitonsfragment-Längen-Polymorphismus- (T-TFLP) Analyse, sowie Klonierung und Sequenzierung zeigten, dass Lactat von Mitgliedern der *Clostridiaceae* fermentiert wird. In den Mikrokosmen mit Ferrihydrit wurde die ^{13}C-Markierung hauptsächlich von *Geobacter* spp. eingebaut, was auf eine direkte Beteiligung dieser Spezies an der Assimilierung von Lactat, Acetat oder Propionat gekoppelt an die dissimilatorische Reduktion von Eisen hinweist. Eine weitere Population, die ausschließlich unter Lepidokrokit-reduzierenden Bedingungen detektiert wurde, ist nahe verwandt mit den *Paenibacillaceae* und könnte bisher unbekannte Eisenreduzierer repräsentieren. Unter methanogenen Bedingungen ist eine diverse mikrobielle Gemeinschaft am Abbau von Lactat beteiligt, die den *Firmicutes*, sowie den β- und δ-*Proteobacteria* zugeordnet wird. Allerdings ist der genaue Energiestoffwechsel dieser Mikroorganismen unbekannt und könnte Fermentation, syntrophe Assoziationen sowie die Reduktion von schwer verfügbaren Eisen(III)-Oxiden beinhalten. RNA-SIP erlaubt eine Identifizierung von Lactat-verwertenden Populationen unter eisenreduzierenden und methanogenen Bedingungen.

Identification of ^{13}C-lactate-utilizing populations under iron-reducing conditions in rice field soil by stable isotope probing of RNA

(To be submitted to *Environmental Microbiology*)

Alexandra Müller, Maike Katharina Fuhr, Bianca Pommerenke and Michael W. Friedrich

Abstract. Lactate is an important intermediate in the decomposition of organic matter and a major carbon source for Fe(III)-reducing microorganisms.
Here, we investigated the degradation of lactate to methane via intermediary metabolites in Italian rice field soil supplemented with ferric iron oxides (ferrihydrite or lepidocrocite) by biogeochemical and molecular techniques. An inhibition of methane formation was confirmed in ferrihydrite and lepidocrocite amended microcosms, while iron-reducing activity was observed after 48 and 72 hours, respectively. By means of RNA-based stable isotope probing (SIP), we were able to show that distinct microbial populations were active in the degradation of ^{13}C-labelled lactate to methane. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, cloning and sequencing of 16S rRNA revealed that members of the *Clostridiaceae* were active *in situ* in the fermentation of lactate. In the microcosms supplemented with ferrihydrite, *Geobacter* spp. had incorporated ^{13}C-label, suggesting that these microorganisms were directly involved in lactate and/or acetate and propionate assimilation and dissimilatory iron reduction. Besides *Geobacter* spp., a population belonging to the *Paenibacillaceae* were exclusively detected under lepidocrocite-reducing conditions and might represent as yet-unknown dissimilatory iron reducers. A diverse microbial population, affiliated with the *Firmicutes* and the β- and δ-subgroup of the *Proteobacteria* performed degradation of lactate under methanogenic conditions. However, the form of energy metabolism of these microorganisms remains unknown. It may have implied fermentation, syntrophic associations, or even reduction of ferric iron oxides with low bioavailability. In summary, the application of RNA-based stable isotope probing allows for the identification of the lactate-metabolizing populations under iron-reducing and methanogenic conditions.

INTRODUCTION

Iron is the fourth most abundant element of the Earth´s crust (5.1 mass percent) and is ubiquitous in the atmosphere, biosphere, hydrosphere and lithosphere (Cornell and Schwertmann, 2003). Depending on the environmental conditions, iron exists as ferrous [Fe(II)], ferric [Fe(III)] and mixed Fe(II)-Fe(III) minerals and can be partly used, produced and transformed by microbial activity (Kappler and Straub, 2005). Although ferric iron oxides are widespread in nature, Fe(III) is barely soluble at circumneutral pH with very low concentrations (10^{-9} M) found in solution (Chipperfield and Ratledge, 2000).

Dissimilatory Fe(III) iron-reducing microorganisms gain energy in form of ATP by coupling the oxidation of H_2 or organic compounds to the reduction of ferric iron oxides. Fe(III)-respiring microorganisms are phylogenetically and morphologically diverse and are dispersed throughout the *Bacteria* and *Archaea* (Lovley *et al*., 2004). However, many fermentative microorganisms reduce Fe(III) as a minor side reaction in their metabolism uncoupled from energy conservation; typically, less than 5% of the reducing equivalents are transferred to Fe(III) (Lovley, 1991).

The widespread occurrence of dissimilatory Fe(III)-reducing prokaryotes correlates with the ubiquitous presence of Fe(III) minerals. Many soils and sediments can contain Fe(III) minerals in the range of several 10 mmol per kg dry matter and are therefore often the dominant electron acceptors in such environments (Cornell and Schwertmann, 2003; Thamdrup, 2000). Iron oxides occur in nature as a spectrum of phases ranging from amorphous phases (e.g. ferrihydrite) to well-crystallized minerals such as lepidocrocite, goethite and hematite (Cornell and Schwertmann, 2003). Cristallinity, surface area, and associated particle size are major factors controlling the bioavailability of various ferric iron oxides. In contrast, amorphous iron oxides are more accessible to microbial reduction (Lovley, 1987; Lovley, 1993; Munch and Ottow, 1980; Phillips *et al*., 1993; Roden and Zachara, 1996).

Iron reduction was found to be the second dominant anaerobic process of organic matter mineralization after methanogenesis in rice field soil, accounting for 24-79% of the electron balance (Jäckel and Schnell, 2000a; Yao *et al*., 1999). Rice soils are known to contain ferrihydrite, lepidocrocite, goethite, and hematite (Bacha and Hossner, 1977; Chen *et al*., 1980; Cornell and Schwertmann, 2003; Karim, 1984). Addition of ferrihydrite and lepidocrocite to rice field soil microcosms suppresses methane production, caused by the competition of methanogens and iron-reducers for common electron donors (Achtnich *et*

al., 1995; Chidthaisong and Conrad, 2000; Hori *et al*., submitted; Jäckel and Schnell, 2000b; Lueders and Friedrich, 2002; Müller and Friedrich, in prep.; Qu *et al*., 2004).

Previously, it has been shown that RNA-based stable isotope probing (SIP) with ^{13}C-acetate allows for the identification of iron-reducing bacteria as a functional guild in rice field soil (Hori *et al*., submitted, Müller and Friedrich, in prep.). In these studies, rice field soil, depleted in potential electron acceptors, was incubated in the presence of various phases of ferric iron oxides. *Geobacter* spp. were found to reduce amorphous phases like ferrihydrite and lepidocrocite, whereas data suggest that *Anaeromyxobacter* spp. might be able to reduce well crystalline iron oxides like goethite and hematite. In more detail, it seems that species within the *Geobacteraceae* have developed distinct mechanisms for the respiration of different iron oxides (Müller and Friedrich, in prep). In most environments the source of electron donors for Fe(III) reduction is the complex organic matter deposited within the sediment (Lovley, 1991). Besides acetate and H_2, lactate is an important intermediate of organic matter degradation in rice field soil (Chin *et al*., 1998; Chin and Conrad, 1995; Krumböck and Conrad, 1991; Rothfuss and Conrad, 1993) and a major carbon source for known dissimilatory iron-reducers (Lovley *et al*., 2004).

In this study, we traced ^{13}C-lactate assimilating bacterial populations to reveal the metabolically active functional guild involved in the dissimilatory iron reduction in rice field soil, supplemented with ferrihydrite or lepidocrocite.

RESULTS

Fe(III)-reducing activity during pre-incubation of rice field soil

The reduction of Fe(III) was followed by means of Fe(II) production over ~5 weeks of pre-incubation (data not shown). The concentration of Fe(II) increased by 63 µmol g^{-1} within two weeks and remained constant, indicating that bioavailable Fe(III) was reduced by microbial activity. Further alternative electron acceptors such as nitrate and sulfate were below detection limit.

Physiological processes during the labelling experiment

Pre-incubated rice field soil was supplemented with ferrihydrite or lepidocrocite at final concentration of 140 µmol g^{-1} and the concentration of Fe(II) was monitored over time. The activity of Fe(III)-reducing microorganisms was observed in ferrihydrite and lepidocrocite amended microcosms after 48 and 72 hours of incubation (Fig.1).

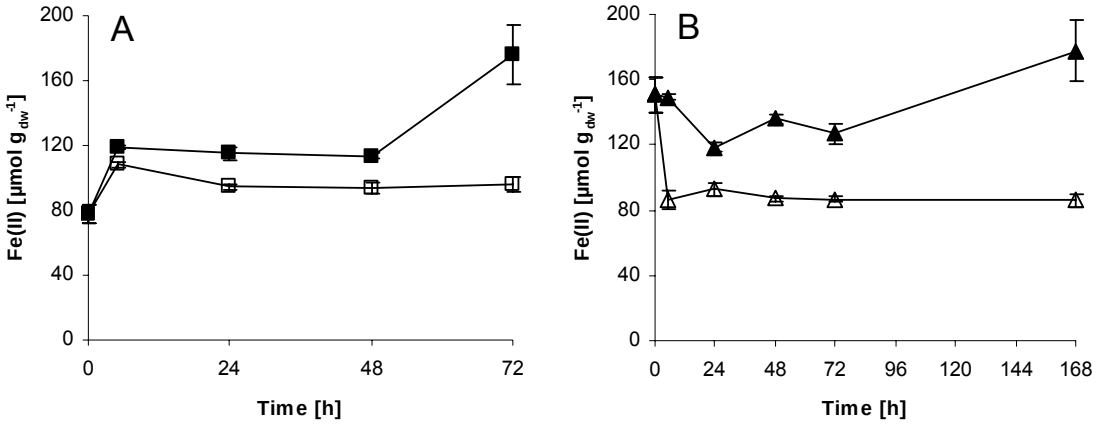


Figure 1. Time course of Fe(II) formation in rice field soil slurries supplemented with (A) ferrihydrite (■) and (B) lepidocrocite (▲). Open symbols describe control incubations without additional Fe(III) oxide. Vertical bars represent standard errors of duplicate or triplicate measurements.

However, the formation of Fe(II) was much higher in incubations with ferrihydrite (98 µmol g^{-1}) than in lepidocrocite treatments (28 µmol g^{-1}). The concentration of Fe(II) remained constant in the control microcosms of both treatments. The addition of ferrihydrite and lepidocrocite influenced CH_4 and CO_2 formation (Fig. 2). During the experiment, total methane production was reduced by 44% under ferrihydrite amendment (Fig. 2A) and by 19% under lepidocrocite amendment (Fig. 2B). Also less CO_2 was produced in the incubations with additional Fe(III) oxide (ferrihydrite: 234.3 µmol l^{-1}, lepidocrocite: 921.1 µmol l^{-1}) than in the control (672.9 µmol l^{-1} and 1182.1 µmol l^{-1}). Lactate was added three times within 48 hours up to 1 mM in the treatment with ferrihydrite and 1.6 mM in the lepidocrocite amended microcosms. The corresponding controls (without additional iron oxides) were treated similarly. In microcosms with and without iron oxides ^{13}C-lactate was turned over rapidly to $^{13}CO_2$ and $^{13}CH_4$ (Fig. 3). The amount of $^{13}CO_2$ was significantly higher in ferrihydrite treatments as compared to the control (16%, Fig. 3A), whereas in the control microcosms $^{13}CH_4$ was produced to a greater extent (43%). The same trend was observed in lepidocrocite amended microcosms and the control, but the differences were less obvious (Fig. 3B).

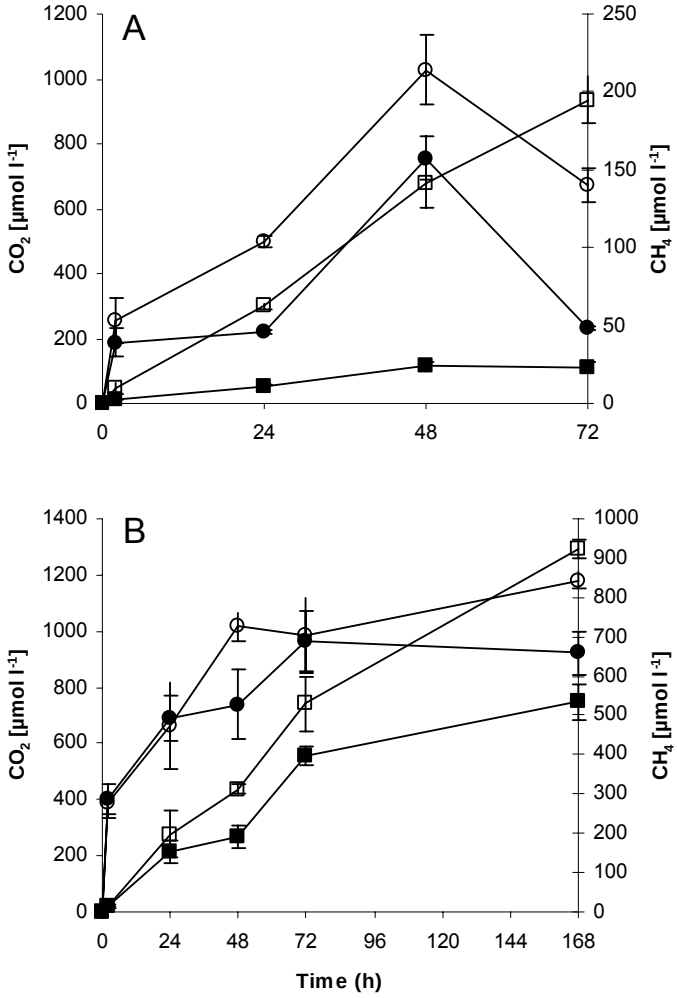


Figure 2. Formation of total CH_4 (µmol l^{-1}; squares) and total CO_2 (µmol l^{-1}; circles) in microcosms amended with (A) ferrihydrite and (B) lepidocrocite. Filled symbols describe incubations with additional Fe(III) oxides, open symbols control incubations. Vertical bars represent standard errors of triplicate measurements.

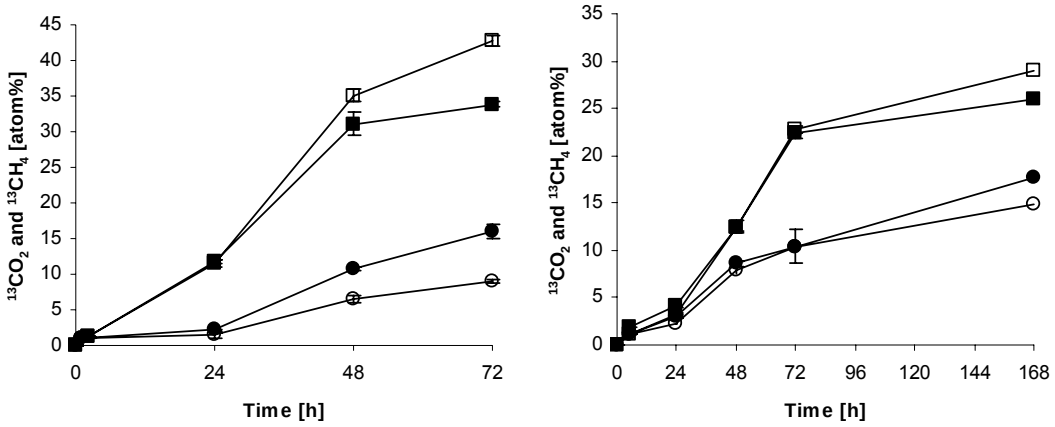


Figure 3. Formation of $^{13}CO_2$ (circles) and $^{13}CH_4$ (squares) from ^{13}C-labelled lactate in microcosms amended with (A) ferrihydrite and (B) lepidocrocite. Filled symbols describe incubations with additional Fe(III) oxides, open symbols control incubations. Vertical bars represent standard errors of triplicate measurements.

The consumption of lactate and the formation of the intermediate products acetate and propionate were monitored over time (Fig. 4). Lactate was turned over rapidly in all microcosms within 24 hours (lepidocrocite treatment, Fig. 4B) and 48 hours (ferrihydrite and control treatments, Fig. 4A and 4B) of incubation and a parallel increase in acetate and propionate concentrations was observed immediately. Both intermediates were consumed in ferrihydrite amended microcosms over time. However, residual concentrations of acetate (18-132 µM) and propionate (608-889 µM) were detected in the incubations with lepidocrocite and without additional Fe(III) oxide.

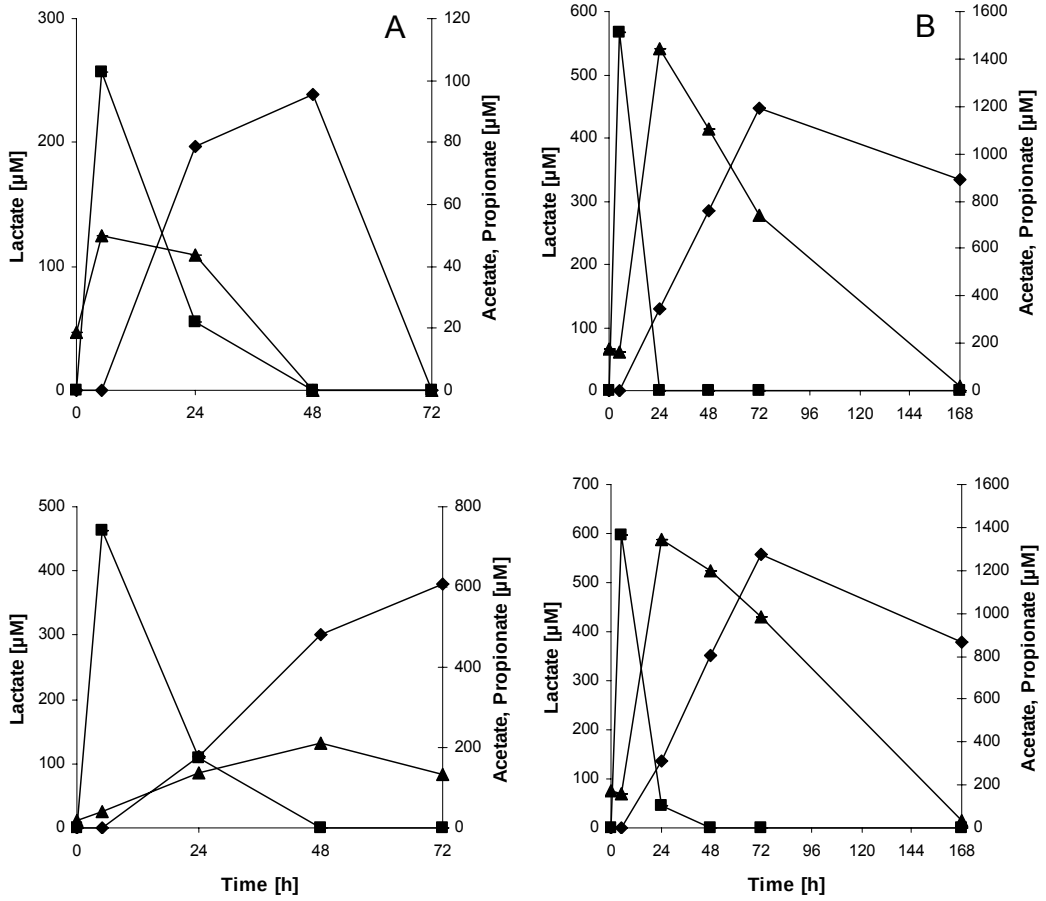


Figure 4. Turnover of ^{13}C-labelled lactate (■) and formation of acetate (▲) and propionate (♦) during incubation with (A) ferrihydrite and (B) lepidocrocite. The graph below displays the corresponding control without additional Fe(III) oxide. Time point 0 hours describes the concentrations of pre-incubated rice field soil before the addition of ^{13}C-labelled lactate and the Fe(III) oxide. ^{13}C-labelled lactate was added to a final concentration of 1 mM (0 h: 0.4 mM; 24 h: 0.4 mM; 48 h: 0.2 mM) in the incubations with ferrihydrite and 1.6 mM (0 h: 0.4 mM; 24 h: 0.6 mM; 48 h: 0.6 mM) in the lepidocrocite amended microcosms, respectively. The corresponding control was treated similarly.

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprinting of bacterial populations

Identification and characterization of lactate-utilizing bacterial populations was carried out by T-RFLP analysis of density-resolved bacterial 16S rRNA from the microcosms with ferrihydrite (FL24), lepidocrocite (LL168) and the corresponding controls after 24 (OF24) and 168 (OL168) hours of incubation, respectively.

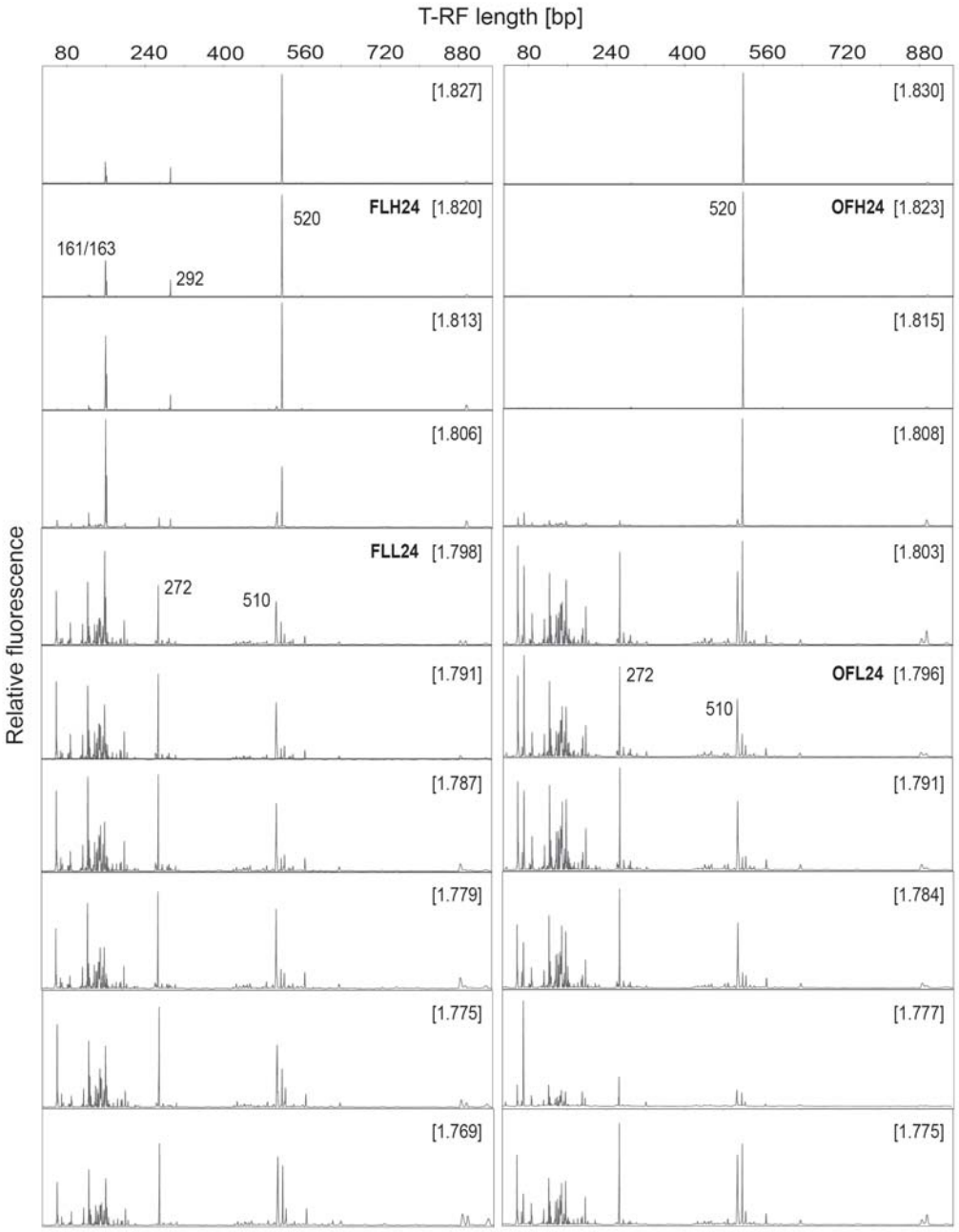


Figure 5. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprinting of density-resolved bacterial 16S rRNA of microcosms supplemented with ferrihydrite (FL24, left) and the control without additional Fe(III) oxide (OF24, right) incubated for 24 hours. Cesium trifluoroacetate buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets. Clone libraries were generated from 'heavy' fractions FLH24 and OFH24.

The T-RFLP fingerprints of the microcosms with ferrihydrite and the control showed a strong shift from 'light' (BD < 1.80 g ml^{-1}) to 'heavy' (BD > 1.81 g ml^{-1}) fractions (Fig. 5) already after 24 hours of incubation. In 'heavy' fractions of the control, exclusively the terminal restriction fragment (T-RF) of 520 bp was present. This T-RF was also predominant in a high density fraction of the ferrihydrite treatment. However, two additional peaks of 161/163 and 292 bp were also detected. In comparison, the bacterial community active in label incorporation was more diverse in the incubation with and without lepidocrocite (Fig. 6). Three major T-RFs of 137, 161/163 and 520 bp were detected in the high density fractions of the lepidocrocite treatment accounting for altogether 45.3% of the total bacterial amplicon pool based on peak heights. In the 'heavy' fractions of the control two additional T-RFs of 292 and 428/430 bp appeared. The low density fractions showed a highly diverse bacterial community and were very similar among the different analyzed microcosms (Fig. 5, 6).

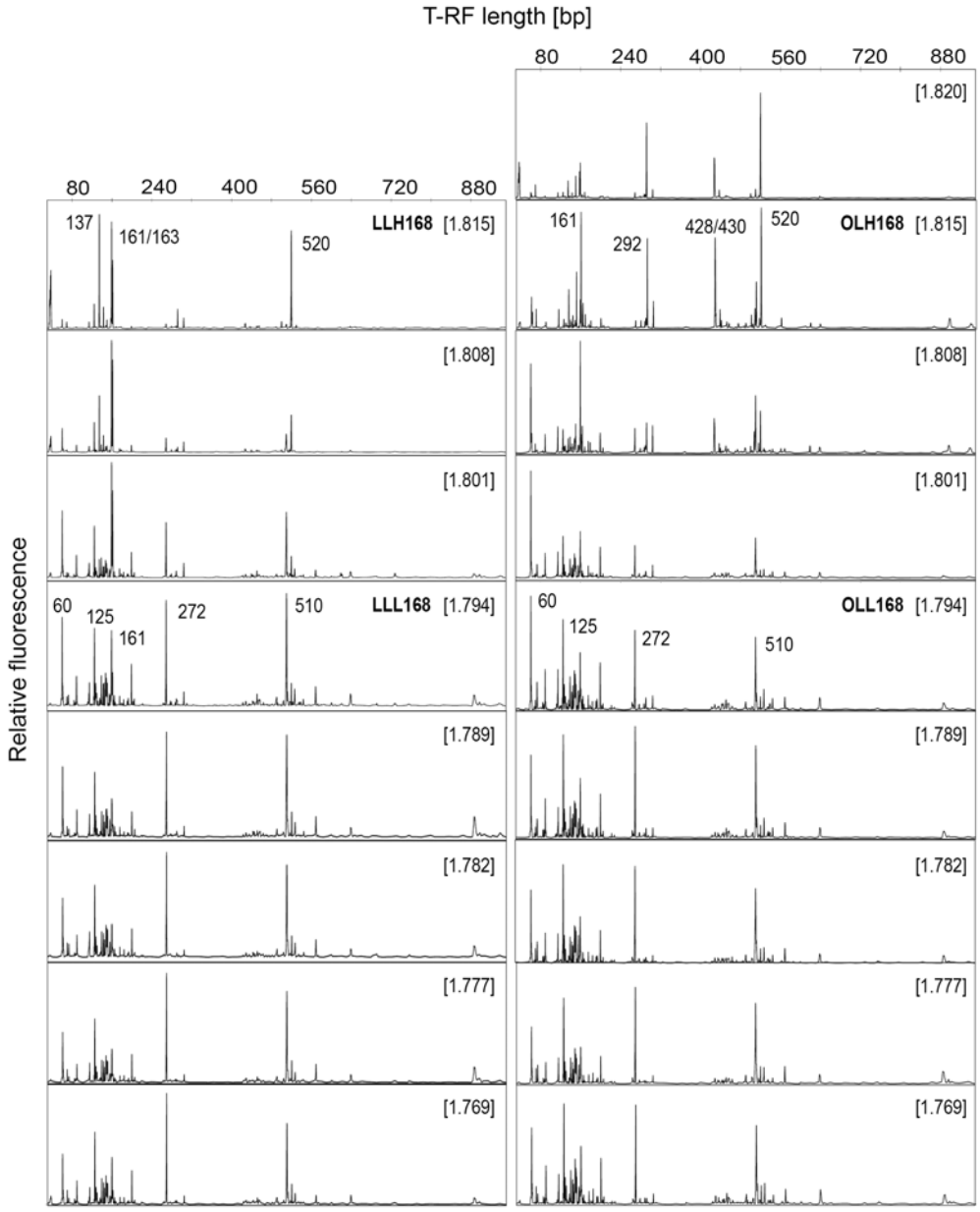


Figure 6. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprinting of density-resolved bacterial 16S rRNA of microcosms supplemented with lepidocrocite (LL168, left) and the control without additional Fe(III) oxide (OL168, right) incubated for 168 hours. Cesium trifluoroacetate buoyant densities of fractions (g ml^{-1}) are given in brackets. Clone libraries were generated from 'heavy' fractions LLH168 and OLH168.

Diversity of bacterial communities

Standard indices of diversity were calculated for comparison of the microbial communities with and without additional Fe(III) oxide (Tab. 1). Simpson´s dominance indices of the 'heavy' fractions of the microcosms with and without lepidocrocite as well as the 'light' fractions of all analyzed samples indicated a relatively high diversity. However, only one phylogenetic group of microorganisms was present in the treatment without ferrihydrite (Simpson` index of 1.0). The two controls (OFL24 and OLL168) showed a very similar bacterial community (Morisita index of 0.89) indicating that incubation time only had neglectable influence on the total bacterial community present in the system. Comparably, the supplementation [Morisita indices of 0.89 (FLL24/OFL24) and 0.92 (LLL168/OLL168)] as well as the phase of iron oxides added [Morisita index of 0.94 (FLL24/LLL168)] barely effected the different incubations.

Table 1. Simpson´s dominance indices were calculated for 'heavy' (H) and 'light' (L) fractions, and the similarity of two analyzed fractions is given by the Morisita index. Indices are based on T-RF length and heights.

Analyzed fraction	Simpson's dominance index	Morisita index
FLH24	0.39	0.72
OFH24	1.0	
FLL24	0.08	0.89
OFL24	0.08	
LLH168	0.13	0.45
OLH168	0.09	
LLL168	0.08	0.92
OLL168	0.07	
FLH24	0.39	0.44
LLH168	0.13	
OFL24	0.08	0.89
OLL168	0.07	
FLL24	0.08	0.94
LLL168	0.08	

However, comparison of the high density fractions of microcosms with and without supplementation of iron oxides and also the phases of iron oxide present demonstrated the

development of very distinct active bacterial populations [Morisita indices of 0.72 (FLH24/OFH24), 0.45 (LLH168/OLH168) and 0.44 (FLH24/LLH168)].

Phylogenetic analysis of bacterial populations and assignment to T-RFs

To identify bacterial populations actively involved in ^{13}C-label incorporation under iron-reducing conditions cloning and sequence analysis were performed. In total 247 clones from four different clone libraries of the high density fractions (H) were generated: FLH24 (ferrihydrite + lactate, 24 hours of incubation), OFH24 (lactate, 24 hours of incubation), LLH168 (lepidocrocite + lactate, 168 hours of incubation) and OLH168 (lactate, 168 hours of incubation). Phylogenetic analysis of the clone libraries FLH24 and OFH24 revealed a highly similar bacterial population with a dominance of sequences affiliated with the phylum *Firmicutes* (73.5 and 100% of total clones, Tab. 2). A second phylogenetic group of clones in the microcosms with ferrihydrite (FLH24) belonged to the *δ-Proteobacteria* (26.6%). In contrast, the composition of the clone libraries LLH168 and OLH168 was more diverse and the clones were associated with a wide variety of phylogenetic groups (Tab. 2). The clone library LLH168 mainly consisted of *Firmicutes* (46.2%) and *δ-Proteobacteria* (31.9%).

Among the *Firmicutes* clone sequences were affiliated with the *Clostridiaceae*, *Veillonellaceae* and *Paenibacillaceae* (Tab. 2, Fig. 7). However, sequences belonging to the *Clostridiaceae* were predominant in the clone libraries FLH24 and OLH24 with an expected T-RF size of 520 bp (Tab. 2, Fig. 7). The *Clostridiaceae*-related sequences formed a specific cluster (Fig. 7), closely related to clone LrhB16 (AM159327; 98-100% sequence similarity), isolated from the rice rhizosphere (Lu *et al*., 2006) and strains *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii* (98-99% sequence similarity).

Table 2. Relative abundance (in per cent) of major phylogenetic groups in the analyzed 'heavy' fractions (H) of the microcosms incubated with ferrihydrite for 24 hours (FLH24), the control (OFH24), the microcosms incubated with lepidocrocite for 168 hours (LLH168) and the control (OLH168), based on frequencies in 16S rRNA clone libraries.

Phylogenetic affiliation	Analyzed fraction/Clone library BD (g ml^{-1})				Characteristic T-RF length[a]
	FLH24 (1.820)	OFH24 (1.823)	LLH168 (1.815)	OLH168 (1.815)	
Acidobacteria			4.4	5.2	
Actinobacteria			3.3	2.6	
Bacteriodetes				2.6	93
Chloroflexi			9.9	11.7	
Cyanobacteria			2.2	3.9	
Firmicutes					
Paenibacillaceae			23.1	7.8	137
Clostridiaceae	64.1	97.6	8.8	6.5	272, 512, **520**
Veillonellaceae	9.4	2.4	5.5	6.5	170, **292**
Diverse			8.8	7.8	
Planctomycetes			1.1		138
Proteobacteria					
β-*Proteobacteria*				14.2	428/430
γ-*Proteobacteria*				1.3	498
δ-*Proteobacteria*					
Geobacteraceae	26.6		22.0	11.7	66, **161**, 163
Divers			9.9	16.9	
WS3			1.1	1.3	174-177
Number of clones per fraction	64	42	91	77	

a. Terminal restriction fragments (T-RFs) detected for a major number of clones within a lineage. Major T-RFs are highlighted in bold.

Within the clone libraries FLH24, LLH168 and OLH168 sequences affiliated with the *Veillonellaceae* were also detected (Fig. 7). This clone group possessed a characteristic T-RF of 292 bp and shared 95-97% sequence similarity to *Pelosinus* sp. UFO1 and *Sporotalea propionica*. The major phylogenetic group (23.1% relative abundance, Tab. 2) in the clone library LLH168 belonged to the *Paenibacillaceae* (major T-RF of 137 bp) and was affiliated with a rice field soil clone (98-100% sequence similarity, AB293307; Hori *et al*., submitted). The most closely related isolate was *Aneurinibacillus terranovensis* (93% sequence similarity).

The phylogenetic placement of clones, related to the δ-*Proteobacteria* is illustrated in Figure 8. The majority of clones belonged to the *Geobacteraceae* and had a characteristic T-RF of 161/163 bp. This corresponds to dominant peaks in the T-RFLP fingerprints of the ferrihydrite and lepidocrocite treatment as well as the control after 168 hours of incubation (Fig. 5, 6). The clone sequences fell into distinct clusters as a result of the different iron oxides present as electron acceptors. Within the clone library LLH168 most *Geobacter*-related sequences (16.5%) were affiliated with *Geobacter chapellei* (93-97% sequence similarity), whereas the sequences of the clone library FLH24 grouped together with *Geobacter chapellei* (98% sequence similarity), *Geobacter bemidjiensis*/*Geobacter bremensis* (98-99% sequence similarity), and *Geobacter uraniireducens* (95-96% sequence similarity). Further sequences belonging to the *Syntrophaceae*, *Myxococcaceae*, *Polyangiaceae* and *Syntrophobacteraceae* were detected in the microcosms with lepidocrocite (LLH168) and the control incubated for 168 hours (OLH168) (Fig. 8).

The T-RF of 428/430 bp (Fig. 6) could be assigned to the *Rhodocyclaceae* within the β-*Proteobacteria*. Clone sequences belonging to this phylogenetic group were only detected in the clone library OLH168 and represented the major ^{13}C-assimilating group in this microcosm beside the *δ-Proteobacteria* (Tab. 2).

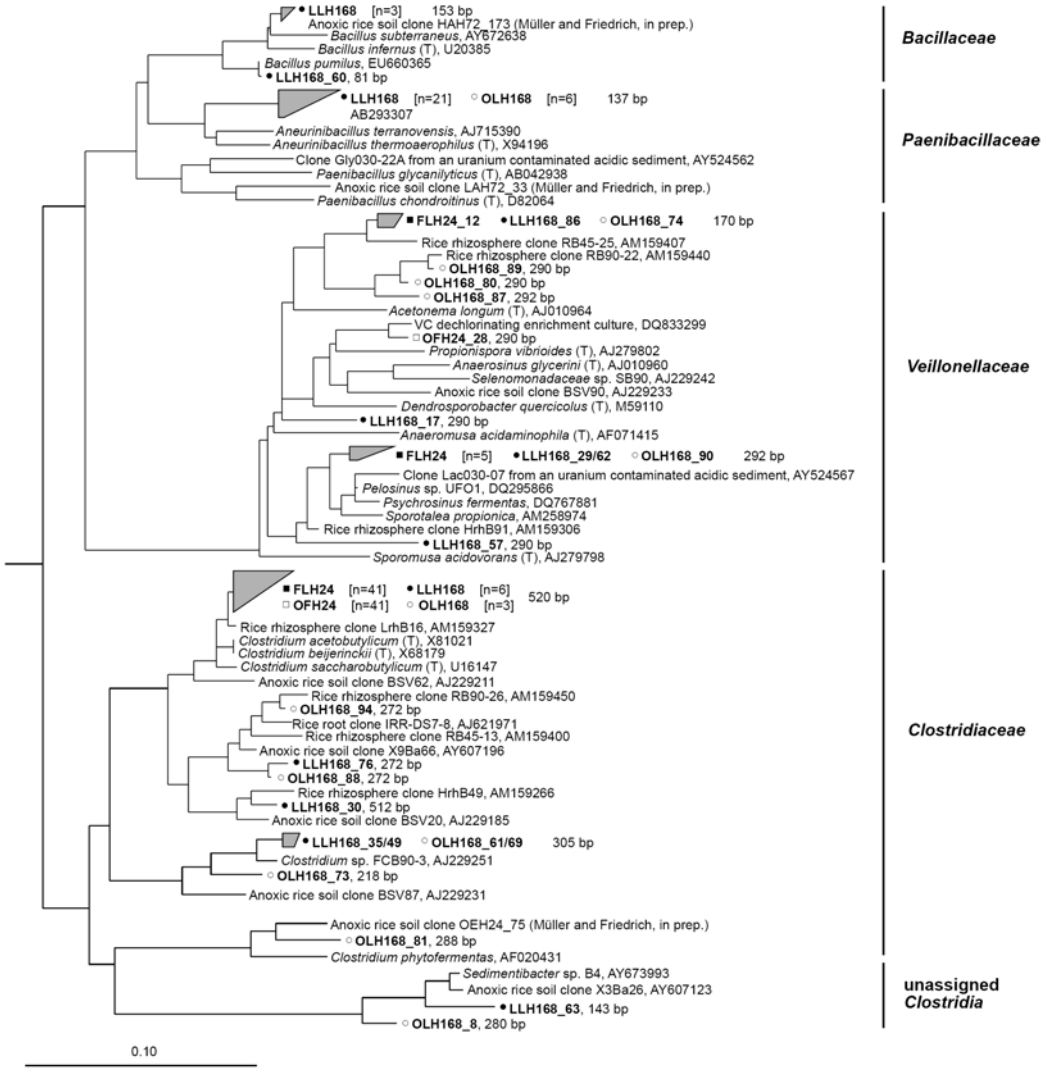


Figure 7. Phylogenetic affiliation of representative 16S rRNA clone sequences related to the *Firmicutes* generated from 'heavy' fraction of density-resolved rRNA. Clone libraries from which the 16S rRNA sequences were retrieved are indicated in bold and marked as follows: FLH24 (■), OFH24 (□), LLH168 (●) and OLH168 (○). Lengths of T-RFs (bp) result from *in silico* digestion of clonal 16S rRNA sequences with the restriction enzyme *Msp*I. The scale bar represents 10% sequence divergence. GenBank accessions numbers of reference sequences are given.

Minor clone groups present in the clone libraries LLH168 and OLH168 belonged to the *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteriodetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Gammaproteobacteria*, and the candidate division WS3 (Tab. 2).

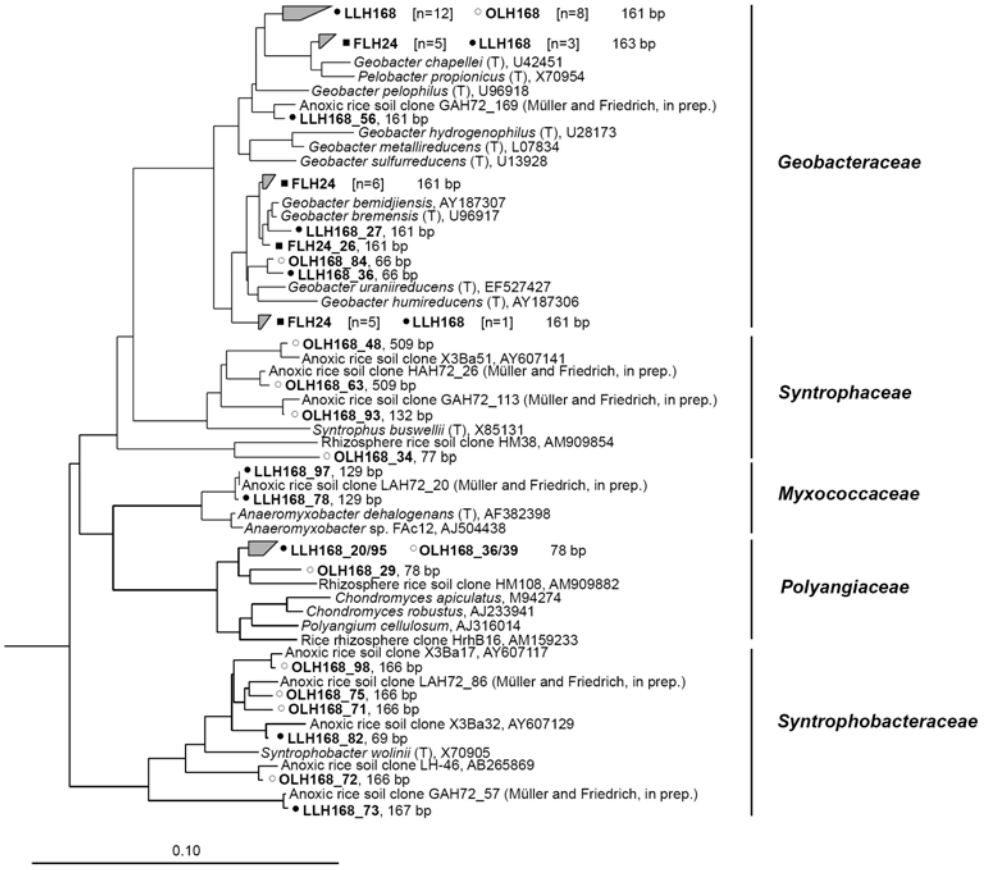


Figure 8. Phylogenetic tree showing the affiliation of 16S rRNA clone sequences within the δ-*Proteobacteria* as detected in density-resolved rRNA of ^{13}C-lactate consuming rice soil microcosms. Symbols and scale bar were as described for Fig. 7.

Rarefaction analysis indicated that only the clone library FLH24 was sufficiently recovered at the species level (97% sequence similarity, Fig. 9). The slope of the curves for the clone libraries LLH168 and OLH168 indicated that new taxa can be expected if additional clones were to be analyzed. Due to the presence of only one phylogenetic group in the clone library OFH24 a rarefaction analysis was not necessary.

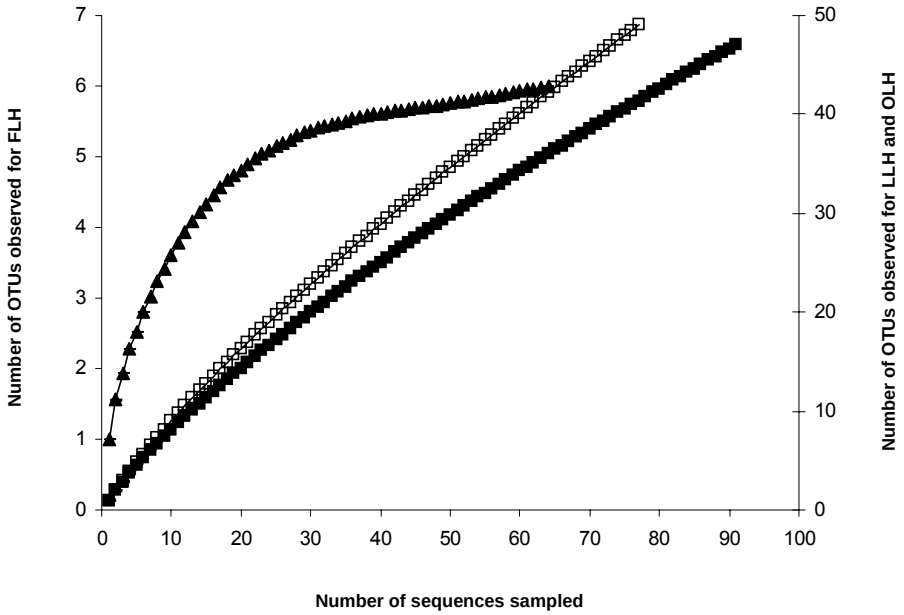


Figure 9. Rarefaction analysis of bacterial 16S rRNA clone sequences retrieved from the high density fractions of the rice field soil incubations with ferrihydrite (▲, FLH24), lepidocrocite (■, LLH168) and the control (□, OLH168). Curves are constructed for clones analyzed on the species level with 97% sequence similarity. The slope of the curves indicates whether the diversity was covered (zero or low slope) or whether new taxa can be expected if additional clones were to be analyzed (steep slope). OTUs, operational taxonomic units.

DISCUSSION

In this study, we present the first results on the bacterial community structure under lactate-assimilating conditions in flooded rice field soil with and without additional iron oxides using biogeochemical and molecular methods. By means of RNA-based stable isotope probing we detected members of the *Clostridiaceae*, mainly involved in the fermentation of the ^{13}C-labelled lactate in the initial phase of the experiment. Iron-reducing activity was observed after 48 and 72 hours of incubation in the microcosms with ferrihydrite or lepidocrocite. However, dissimilatory iron-reducing microorganisms, related to the *Geobacteraceae* (*G. chapellei*, *G. bemidjiensis*, *G. bremensis* and *G. uraniireducens*) were identified in the treatment with ferrihydrite within 24 hours of incubation.

Lactate metabolism in rice field soil

Lactate is an important intermediate in the degradation of organic matter in rice field soil. Under ″steady-state″ conditions lactate concentrations were in the range of 5-60 µM and no differences were observed between planted and unplanted microcosms (Chin *et al*., 1998; Chin and Conrad, 1995; Dannenberg and Conrad, 1999). In this study, ^{13}C-lactate was added discontinuously (200, 400, and 600 µM) to the microcosms at low concentrations, albeit still higher typically found in flooded rice field soil. Overall, the lactate concentrations used here, were among the lowest used so far in SIP experiments, which is a pre-requisite for probing of microorganisms rather than enrichment (Friedrich, 2006).

The degradation of lactate to acetate and propionate was observed immediately in all microcosms after the start of the experiment. Apparently, fermentative bacteria converted lactate to propionate, acetate and CO_2 via the methylmalonyl-CoA or acryloyl-CoA pathway (equation [1]; Buckel, 1999; Seeliger *et al*., 2002):

$$3\ Lactate^- \rightarrow Acetate^- + 2\ Propionate^- + CO_2 + H_2O \qquad [1]$$
$$\Delta G^{0'} = -56.7\ kJ\ mol\ lactate^{-1}$$

Syntrophic oxidation of lactate (equation [2]; Pankhania *et al*., 1988) as well as the complete oxidation of lactate to CO_2 by iron-reducing microorganisms (equation [3]) represent two other possibilities for the dissimilation of lactate:

$$Lactate^- + H_2O \rightarrow Acetate^- + CO_2 + 2H_2 \qquad [2]$$
$$\Delta G^{0'} = -8.8\ kJ\ mol\ lactate^{-1}$$

$$Lactate^- + 12\ Fe(OH)_3 \rightarrow 3\ CO_2 + 12\ Fe(II) + 25\ OH^- + 8\ H_2O \qquad [3]$$
$$\Delta G^{0'} = -167.6\ kJ\ mol\ lactate^{-1}$$

(calculated from Roden, 2003a; Thauer *et al*., 1977). The fermentation products acetate and propionate might have served as potential electron donors for iron-reducing microorganisms in the presence of ferrihydrite or lepidocrocite. In control microcosms without ferric iron oxides, methanogenic *Archaea* might have been involved in the cleavage of acetate. Cross-feeding (Radajewski *et al*., 2003) on intermediates of lactate oxidation (e.g. acetate, propionate) is likely and has to be proven in further experiments.

In control microcosms, propionate might have been degraded by syntrophic cooperation of propionate-oxidizing bacteria and H_2-consuming methanogenic *Archaea*. Propionate is an important intermediate and may account for up to 30% of methanogenesis in rice field soil (Glissmann and Conrad, 2000; Krylova *et al*., 1997). The degradation of propionate to acetate, CO_2 and 3 H_2 is a highly endergonic process under standard conditions ($\Delta G^{0'}$ = +76.1 kJ mol propionate^{-1}) and therefore it becomes thermodynamically only feasible in syntrophic association under methanogenic conditions. By the use of RNA-based SIP, *Syntrophobacter* spp., *Smithella* spp. and *Pelotomaculum* spp. were identified as predominant propionate-oxidizing bacteria in flooded rice field soil (Lueders *et al*., 2004b). However, only smaller clone groups ($n \leq 4$ clones) of the 'heavy' fraction of the incubations with and without lepidocrocite (LLH168 and OLH168) belonged to the S*yntrophobacteraceae* (Fig. 8), sharing 92-93% sequence similarity to known syntrophic propionate oxidizers, e.g. *Syntrophobacter wollinii* (Boone and Bryant, 1980) and 94-95% to propionate-oxidizing populations detected in rice field soil. Potentially, these microbial populations might be involved in the reduction of ferric iron oxides with low bioavailability. In incubations supplemented with ferrihydrite or lepidocrocite intermittently accumulated propionate was assimilated most likely by iron-reducing microorganisms, as propionate was turned over much slower in the absence of Fe(III) oxides added (Fig. 4).

Iron-reducing activity (Fig. 1) and a partial suppression of methanogenesis (Fig. 2) was detected in the microcosms with ferrihydrite and lepidocrocite after 48 and 72 hours of incubation indicative for the presence of ferric iron-reducers. However, suppression of total methane production was lower in comparison to previous studies (Hori *et al*., submitted; Jäckel and Schnell, 2000b; Lueders and Friedrich, 2002; Qu *et al*., 2004). This can be due to different experimental setups, e.g. different carbon sources, longer incubation times and higher concentrations of ferric iron oxides added. The suppression of methanogenesis is usually explained by the competition of iron-reducing bacteria and methanogenic *Archaea* for common substrates like acetate and H_2. Besides, a direct inhibition of methanogenesis by amorphous $Fe(OH)_3$ is also possible as shown in pure culture studies of *Methanosaeta conilii*, *Methanospirillum hungatei*, and *Methansarcina barkeri* (van Bodegom *et al*., 2004).

Identification of lactate-assimilating populations in rice field soil

RNA-based SIP revealed a distinct bacterial community capable of ^{13}C-lactate degradation with and without additional ferric iron oxides. The depletion of potential electron acceptors (especially ferric iron) as well as the following supplementation of ferrihydrite or lepidocrocite to pre-incubated rice field soil were important premises to trace the active iron-reducing populations. In all microcosms lactate was degraded immediately (Fig. 4) and therefore the treatments without ferric iron oxides served as important controls for the identification of the endogenous iron-reducers in rice field soil.

The addition of ^{13}C-labelled lactate resulted in effective label incorporation by distinct bacterial populations. Members of the *Clostridiaceae* accounted for a large portion of the ^{13}C-lactate assimilating community in the 'heavy' fraction of the incubation with (FLH24, 64.1%) and without (OFH24, 97.6%) ferrihydrite as revealed by sequencing analysis (Tab. 2). The T-RFLP profiles (Fig. 5) also reflect the dominance of this population (major T-RF of 520 bp). The closely related representatives *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium acetobutylicum* (98-99% sequence similarity) are capable of sugar fermentation to butanol, acetone and ethanol (Keis *et al*., 2001) but fermentation of lactate is not described for these bacteria. However, other, and distantly related species within the genus *Clostridium* (*C. homopropionicum*, *C. propionicum*, *C. lactatifermentas* and *C. neopropionicum*) are capable of lactate fermentation to acetate via the acrylolyl-CoA pathway (van der Wielen *et al*., 2002; Wiegel *et al*., 2006). Thus, assimilation as well as fermentation may have been possible routes of lactate metabolism by the detected clostridial population. Furthermore, *Clostridium beijerinckii* can reduce Fe(III) in the form of Fe(III)-(Maltol)$_3$ and Fe(III) citrate while metabolizing glucose in a fermentative manner (Dobbin *et al*., 1999). Most probably, Fe(III) served as an electron sink providing a slightly greater energy yield than fermentation alone. This may explain the wide diversity of fermentative microorganisms that can divert a small proportion of their electron flow to Fe(III) reduction. Many of these microorganisms do not appear to conserve energy to support growth from this electron transfer (Lovley, 1987; Lovley, 1991). However, due to the predominance of *Clostridia*-related sequences in the control treatment without ferrihydrite a dissimilatory iron-reduction mediated by this population can be excluded. Small populations related to the *Veillonellaceae* (*Firmicutes*) were detected in the high density fraction of the incubation with ferrihydrite. Clones within this cluster shared 95-97% sequence similarity to *Pelosinus* sp. UFO1 and *Sporotalea*

propionica. *S. propionica* ferments lactate via the methylmalonyl-CoA pathway to propionate and acetate (Boga *et al*., 2007), thus this population might be involved in the production of propionate and acetate. The capability of *Pelosinus fermentas* to reduce ferric iron was so far only observed in the presence of fermentable substrates indicative for the utilization of Fe(III) as electron sink (Shelobolina *et al*., 2007).

Potentially involved in the assimilation of lactate under ferrihydrite and lepdicrocite amendment were populations closely related to *Geobacter chapellei*, *Geobacter bemidjiensis*, *Geobacter bremensis* and *Geobacter uraniireducens* (Tab. 2, Fig. 8). All of these species are known to conserve energy from the complete oxidation of lactate with poorly crystalline iron oxides serving as the sole electron acceptor (Coates *et al*., 2001; Nevin *et al*., 2005; Shelobolina *et al*., 2008; Straub and Buchholz-Cleven, 2001). However, the characteristic T-RF for *Geobacter* of 161/163 bp appeared after 24 and 168 hours of incubation in the microcosms with ferrihydrite (Fig. 5) and lepidocrocite (Fig. 6), respectively. Thus, these organisms might assimilate the acetate and propionate produced by the lactate-fermenting bacteria. The trend within the *Geobacteraceae* to form distinct clusters, depending on the ferric iron oxide added was also observed in a previous study (Müller and Friedrich, in prep.). Furthermore, this population is also present in the control without lepidocrocite (OLH168, Fig. 6) suggesting that the *Geobacteraceae* might be capable of the reduction of less bioavailable ferric iron oxides still present in rice field soil despite the pre-incubation. Similar observations have been made analysing the acetate-assimilating population under methanogenic conditions in rice field soil by RNA-based SIP (Hori *et al*., 2007).

A second population, exclusively detected in the control after 168 hours of incubation grouped within the *Rhodocyclaceae* (major T-RF of 428/430; Fig. 6) and was closely related to the isolates *Azonexus fungiphilus* (96-97% sequence similarity), and *Dechloromonas* sp. CL (94-95% sequence similarity). These species are physiologically diverse, using distinct electron acceptors (e.g. nitrate, (per)chlorate) for the oxidation of a wide variety of carbon sources (Achenbach *et al*., 2001; Reinhold-Hurek and Hurek, 2000). However, this clone cluster was not observed in the initial phase of the control (Fig. 5); therefore, these microorganisms might be involved in the assimilation of the fermentation products propionate and acetate. Members of the *Rhodocyclaceae* were also predominant in a previous study of rice field soil microcosms, representing the main ^{13}C-acetate-assimilating population under methanogenic conditions (Müller and Friedrich, in

prep.). We hypothesized that these bacteria might couple the oxidation of acetate to the reduction of ferric iron oxides with low bioavailability but further experiments are necessary to prove this assumption.

Among the ^{13}C-labelled *Firmicutes*, members of the *Paenibacillaceae* were predominant in the 'heavy' fraction of the lepidocrocite-amended microcosms with a characteristic T-RF of 137 bp. By 16S rRNA sequence analysis, members of this phylogenetic group were also detected in contaminated sediment enrichments amended with glucose and glycerol; moreover, clones were associated to the genus *Paenibacillus* (Petrie *et al*., 2003). However, the clone cluster from our study shared 93-94% sequence similarity to *Aneurinibacillus terranovensis*, a thermoacidophile isolated from geothermal soil (Allan *et al*., 2005). This organism can utilize lactate as carbon source but the reduction of ferric iron has not been observed previously. Although our results provide strong evidence, that members of the *Paenibacillaceae* are involved in the assimilation of lactate under lepidocrocite-reducing conditions, final confirmation of our hypothesis will require isolation of such microorganisms and further characterization of their capability for dissimilatory Fe(III) reduction.

CONCLUSION

Our SIP experiment with pre-incubated rice field soil has shown that ^{13}C-labelled lactate was degraded by a diverse microbial community. In the initial phase of the experiment, lactate was mainly fermented by members of the *Clostridiaceae*. Distinct species of the genus *Geobacter* were detected in ferric iron oxide amended microcosms at different time points of incubation, and most likely, this population coupled the oxidation of acetate and propionate to the reduction of the supplemented iron oxides. A phylogenetically novel bacterial population belonging to the *Paenibacillaceae* was predominant in the lepidocrocite amended microcosms and might be directly involved in the reduction of this ferric iron oxide. Under methanogenic conditions, ^{13}C-labelled lactate was metabolized by diverse microbial populations, clustering within the *Firmicute*s, β- and δ-*Proteobateria*. The data suggest that the populations belonging to the *Proteobacteria* are potentially involved in the reduction of ferric iron oxides with low bioavailability. Our results indicate that the dissimilatory iron-reducing community is more diverse than expected and that carbon source in combination with the phase of iron oxide had an influence on the active microbial populations.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and characterization of ferric iron oxides

Fe(III) oxides used as electron acceptors (i.e. ferrihydrite and lepidocrocite) were synthesized according to the method of Schwertmann and Cornell (2000). All iron oxides were washed (carried out by centrifugation and decantation), freeze-dried and stored at -20°C. Due to the production in aqueous systems, iron oxides were washed after preparation in order to remove chloride impurities associated with the procedure. After washing, the supernatant liquid was tested for the presence of chloride ions by addition of $AgNO_3$ (Schwertmann and Cornell, 2000), but AgCl precipitates were not detected.

Iron oxides were characterized using X-ray powder diffraction (XRD) analysis. XRD data were collected with a Philips X´Pert Pro MPD using CoKα radiation. Crystallinity and purity of Fe(III) oxide minerals were evaluated by comparison with spectra from reference materials. The particle size of the different iron oxides was calculated, using the Scherrer formula. The specific surface area was determined by multi-point BET-N_2 adsorption.

Soil samples and slurry experiments

Rice field soil was collected in 2006 from a field of the Italian Rice Research Institute near Vercelli, Italy. The soil was air dried and stored at room temperature. Preparation of the soil and sieving (mesh size 2 mm) were done as previously described (Lueders and Friedrich, 2000). Soil slurry experiments were set up by mixing the dry soil with distilled water in a 1:2 ratio. In order to reduce available electron acceptors, especially endogenous ferric iron, the slurry was flushed with N_2 and pre-incubated for 42 days at 25°C in the dark. A defined amount (15 ml) of the homogenized slurry was transferred into 60-ml serum vials containing the Fe(III) oxide minerals ferrihydrite or lepidocrocite at a final concentration of 140 µmol g^{-1} in an anaerobic glove box. The two Fe(III) oxides used as electron acceptors differ in cristallinity, particle size and their associated surface area (Roden, 2003b). Ferrihydrite is amorph in contrast to the well-crystalline iron oxide lepidocrocite. The following treatments were prepared: (i) ferrihydrite (140 µmol g^{-1}), (ii) lepidocrocite (140 µmol g^{-1}) and (iii) a control treatment without amendment of ferric iron minerals. The vials were sealed with butyl rubber septa and flushed with N_2. The experiments were started by supplementation of the carbon source, $^{13}C_3$-labelled lactate (99 atom%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). The carbon source was added in portions of 0.2 mM, 0.4 mM or 0.6 mM at 0, 24 and 48 hours to a final concentration of

1 mM for the treatment with ferrihydrite and the corresponding control or 1.6 mM for the lepidocrocite amended microcosm and the control, respectively. Each treatment was run in triplicates with static incubation for 72 hours for the ferrihydrite or 168 hours for the lepidocrocite treatments at 25°C in the dark. The corresponding controls were treated similarly.

Analytical measurements

Gas samples (CH_4, CO_2) were taken from the headspace of the flasks and measured gas chromatographically on a GC-8A gas chromatograph (Shimadzu, Japan) as described previously (Müller and Friedrich, in prep.). $^{13}C/^{12}C$ isotope ratios of CH_4 and CO_2 were determined by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-c-IRMS) as described earlier (Conrad *et al*., 2000). Pore water samples for ion chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) were filtered through 0.2 µm filters (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Determination of nitrite, nitrate, and sulfate dissolved in the pore water was carried out by ion chromatography (Bak *et al*., 1991). Turnover of lactate was monitored by HPLC as described previously (Müller and Friedrich, in prep.). Chromatograms were analyzed with the Peak Simple software (SRI Instruments, Torrance, CA). Ferrous iron was analyzed in slurry samples using the ferrozine reaction method (Achtnich *et al*., 1995).

Nucleic acid extraction and isopycnic centrifugation

Nucleic acids were extracted from ^{13}C-lactate amended microcosms with and without additional Fe(III) oxide using a bead-beating protocol in the presence of sodium phosphate and sodium dodecyl sulfate (Lueders *et al*., 2004a). After digestion of co-extracted DNA with RNase free DNase I (Roche Diagnostics) the RNA was re-extracted and quantified using the Ribogreen RNA quantification kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. For equilibrium density gradient centrifugation 500 ng of RNA extracts of the treatments were transferred into gradient medium containing cesium trifluoroacetate (CsTFA) and formamide. Separation of 'heavy' and 'light' RNA was carried out in an ultracentrifuge at 39,000 rpm (130,000 *g*) and 20°C for 72 hours (Lueders *et al*., 2004a). Gradients of density-resolved RNA were fractionated, the CsTFA buoyant density (BD) of each fraction was determined, and nucleic acids were precipitated over night with 3 M sodium acetate and ethanol for further analysis.

Polymerase chain reaction amplification and T-RFLP analysis

Bacterial 16S rRNA genes were specifically amplified from density-resolved bacterial community RNA as described previously (Müller and Friedrich, in prep.), using the Access one–tube RT-PCR system (Promega, Mannheim, Germany) and the primer set Ba27f-FAM (6-carboxyfluorescein-labelled) and Ba907r (Edwards *et al*., 1989; Muyzer *et al*., 1995). Subsequently, the bacterial community dynamics in the density gradient fractions were analyzed by T-RFLP profiling. The amplicons (~ 120 ng) were digested using the restriction enzyme *Msp*I and the purified restriction fragments were analyzed on an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) in GeneScan mode as previously described by (Lueders and Friedrich, 2002). T-RFLP electropherograms were analyzed using the Gene Mapper software 4.0 (Applied Biosystems).

T-RFLP results were used to evaluate the bacterial community diversity in 'heavy' (H) and 'light' (L) fractions of microcosms with ferrihydrite (FLH24, FLL24), lepidocrocite (LLH168, LLL168) and the controls without additional iron oxides incubated for 24 hours (OFH24, OFL24) and 168 hours (LLH168, LLL168), respectively, by Simpson´s dominance index *l* (Dollhopf *et al*., 2001). A value close to 0 is obtained for a highly diverse bacterial community, while a value of 1, indicates that all individuals of the analyzed sample belong to the same species. The similarity of the bacterial communities in two analyzed fractions was determined using Morisita index of community similarity (I_M), which is based on Simpson´s dominance index (Dollhopf *et al*., 2001). I_M values range from 0 to 1, with 0 indicating that no species are shared between the two communities and 1 indicating complete identity. Values for both indices were calculated using the PAST software (PAlaeontological STatistics, ver. 1.79; http://folk.uio.no/ohammer/past; Hammer *et al*., 2001). For this purpose, only T-RFs with a relative peak height of >1% of the total electropherogram peak height were included.

Cloning, sequencing, and phylogenetic analysis

Bacterial 16S rRNA genes were amplified from one high density fraction of microcosms with Fe(III) oxide (ferrihydrite, FLH24; lepidocrocite, LLH168) and the corresponding control (OFH24, OLH168) using the primer set Ba27f/Ba907r and RT-PCR conditions described previously (see above). Amplicons were cloned in *Escherichia coli* JM109 using the pGEM®-T Vector System II (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. A total of 247 randomly selected clones [FLH24 (64), OFH24

(42), LLH168 (91), OLH168 (77)] were checked for correct insert size by vector-targeted PCR using primers M13f (5´-GTA AAA CGA CGG CCA G-3`) and M13r (5´-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3´) and gel electrophoresis. The sequence analysis was performed at the core facility ADIS at the Max Planck Institute for plant breeding research (Cologne, Germany). A total of 14 putative chimera were detected by analysis with Mallard software (Ashelford *et al*., 2006) and the Bellerophon server (Huber *et al*., 2004), confirmed by fractional treeing (Ludwig *et al*., 1997), and excluded from further analyses. The obtained 16S rRNA gene sequences were compared to sequences in public databases with BLASTN. Sequence data were added to the database and aligned with the Fast Aligner tool using the ARB software package (http://www.arb-home.de; version corrected January, 2004, released January 2005; Ludwig *et al*., 2004). Alignments were corrected manually if necessary. Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene sequences was determined using fast parsimony and neighbor joining methods for tree construction. For correlation of clones with their corresponding T-RFs the "T-RF-cut"-tool was used (Ricke *et al*., 2005). The diversity coverage of libraries was checked by rarefaction analysis with the DOTUR software using furthest neighbor sequence assignment (Schloss and Handelsman, 2005). Sequence data were deposited with GeneBank under Accession numbers xy.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors kindly acknowledge Peter Claus for assistance with the GC-isotope ratio mass spectrometry analysis. This research was funded by the Max Planck Society (MPG) and a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the SFB395 "Interactions, adaptations and catalytic capabilities of soil microorganisms"

REFERENCES

Achenbach,L.A., Michaelidou,U., Bruce,R.A., Fryman,J., and Coates,J.D. (2001) *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:** 527-533.

Achtnich,C., Bak,F., and Conrad,R. (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19:** 65-72.

Allan,R.N., Lebbe,L., Heyrman,J., De Vos,P., Buchanan,C.J., and Logan,N.A. (2005) *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55:** 1039-1050.

Ashelford,K.E., Chuzhanova,N.A., Fry,J.C., Jones,A.J., and Weightman,A.J. (2006) New Screening Software Shows that Most Recent Large 16S rRNA Gene Clone Libraries Contain Chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72:** 5734-5741.

Bacha,R.E. and Hossner,L.R. (1977) Characteristics of Coatings Formed on Rice Roots As Affected by Iron and Manganese Additions. *Soil Science Society of America Journal* **41:** 931-935.

Bak,F., Scheff,G., and Jansen,K.H. (1991) A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfate reduction-rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 23-30.

Boga,H.I., Ji,R., Ludwig,W., and Brune,A. (2007) *Sporotalea propionica* gen. nov. sp. nov., a hydrogen-oxidizing, oxygen-reducing, propionigenic firmicute from the intestinal tract of a soil-feeding termite. *Arch. Microbiol.* **187:** 15-27.

Boone,D.R. and Bryant,M.P. (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov. from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **40:** 626-632.

Buckel,W. (1999) Anaerobic energy metabolism. In *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart: Thieme, 278-326.

Chen,C.C., Dixon,J.B., and Turner,F.T. (1980) Iron Coatings on Rice Roots - Mineralogy and Quantity Influencing Factors. *Soil Science Society of America Journal* **44:** 635-639.

Chidthaisong,A. and Conrad,R. (2000) Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 73-86.

Chin,K.J. and Conrad,R. (1995) Intermediary Metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18:** 85-102.

Chin,K.J., Rainey,F.A., Janssen,P.H., and Conrad,R. (1998) Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **21:** 185-200.

Chipperfield,J.R. and Ratledge,C. (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* **13:** 165-168.

Coates,J.D., Bhupathiraju,V.K., Achenbach,L.A., McInerney,M.J., and Lovley,D.R. (2001) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:** 581-588.

Conrad,R., Klose,M., and Claus,P. (2000) Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 828-831.

Cornell,R.M. and Schwertmann,U. (2003) *The Iron Oxides*. WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Dannenberg,S. and Conrad,R. (1999) Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. *Biogeochem.* **45:** 53-71.

Dobbin,P.S., Carter,J.P., San Juan,C.G.S., von Hobe,M., Powell,A.K., and Richardson,D.J. (1999) Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* **176:** 131-138.

Dollhopf,S.L., Hashsham,S.A., and Tiedje,J.M. (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* **42:** 495-505.

Edwards,U., Rogall,T., Blocker,H., Emde,M., and Bottger,E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17:** 7843-7853.

Friedrich,M.W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr. Opinion Biotechnol.* **17:** 59-66.

Glissmann,K. and Conrad,R. (2000) Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 117-126.

Hammer,O., Harper,D.A.T., and Ryan,P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**.

Hori,T., Müller,A., Igarashi,Y., and Conrad,R. (submitted) Identification of ferrihydrite and goethite reducing microorganisms in anoxic paddy soil by ^{13}C-acetate probing. *ISME Journal*.

Hori,T., Noll,M., Igarashi,Y., Friedrich,M.W., and Conrad,R. (2007) Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 101-109.

Huber,T., Faulkner,G., and Hugenholtz,P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20:** 2317-2319.

Jäckel,U. and Schnell,S. (2000a) Role of microbial iron reduction in paddy soil. In *Non-CO_2 greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation*. van Ham,J., Baede,A.P.M., Meyer,L.A., and Ybema,R. (eds). Dordrecht, NL: Kluwer, 143-144.

Jäckel,U. and Schnell,S. (2000b) Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **32:** 1811-1814.

Kappler,A. and Straub,K.L. (2005) Geomicrobiological cycling of iron. *Molecular Geomicrobiology* **59:** 85-108.

Karim,Z. (1984) Formation of Aluminum-Substituted Goethite in Seasonally Waterlogged Rice Soils. *Soil Science Society of America Journal* **48:** 410-413.

Keis,S., Shaheen,R., and Jones,D.T. (2001) Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:** 2095-2103.

Krumböck,M. and Conrad,R. (1991) Metabolism of position-labeled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 247-256.

Krylova,N.I., Janssen,P.H., and Conrad,R. (1997) Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23:** 107-117.

Lovley,D.R. (1987) Organic-Matter Mineralization with the Reduction of Ferric Iron - A Review. *Geomicrobiology Journal* **5:** 375-399.

Lovley,D.R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiol. Rev.* **55:** 259-287.

Lovley,D.R. (1993) Dissimilatory Metal Reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **47:** 263-290.

Lovley,D.R., Holmes,D.E., and Nevin,K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology, Vol. 49* **49:** 219-286.

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

Ludwig,W., Bauer,S.H., Bauer,M., Held,I., Kirchhof,G., Schulze,R. *et al.* (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153:** 181-190.

Ludwig,W., Strunk,O., Westram,R., Richter,L., Meier,H., Yadhukumar *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32:** 1363-1371.

Lueders,T. and Friedrich,M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2732-2742.

Lueders,T. and Friedrich,M.W. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2484-2494.

Lueders,T., Manefield,M., and Friedrich,M.W. (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6:** 73-78.

Lueders,T., Pommerenke,B., and Friedrich,M.W. (2004b) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 5778-5786.

Müller,A. and Friedrich,M.W. (in preparation) Distinct Fe(III) oxide mineral phases select for individual iron-reducing microbial populations in anoxic rice field soil.

Munch,J.C. and Ottow,J.C.G. (1980) Preferential Reduction of Amorphous to Crystalline Iron-Oxides by Bacterial-Activity. *Soil Science* **129:** 15-21.

Muyzer,G., Teske,A., Wirsen,C.O., and Jannasch,H.W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164:** 165-172.

Nevin,K.P., Holmes,D.E., Woodard,T.L., Hinlein,E.S., Ostendorf,D.W., and Lovley,D.R. (2005) *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55:** 1667-1674.

Pankhania,I.P., Spormann,A.M., Hamilton,W.A., and Thauer,R.K. (1988) Lactate conversion to acetate, CO_2 and H_2 in cell suspensions of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg): Indications for the involvement of an energy driven reaction. *Arch. Microbiol.* **150:** 26-31.

Petrie,L., North,N.N., Dollhopf,S.L., Balkwill,D.L., and Kostka,J.E. (2003) Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium(VI). *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 7467-7479.

Phillips,E.J.P., Lovley,D.R., and Roden,E.E. (1993) Composition of Non-Microbially Reducible Fe(III) in Aquatic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:** 2727-2729.

Qu,D., Ratering,S., and Schnell,S. (2004) Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in Paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72:** 1172-1181.

Radajewski,S., McDonald,I.R., and Murrell,J.C. (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14:** 296-302.

Reinhold-Hurek,B. and Hurek,T. (2000) Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov., and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 2:** 649-659.

Ricke,P., Kolb,S., and 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.

Roden,E.E. (2003a) Diversion of electron flow from methanogenesis to crystalline Fe(III) oxide reduction in carbon-limited cultures of wetland sediment microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 5702-5706.

Roden,E.E. (2003b) Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environmental Science & Technology* **37:** 1319-1324.

Roden,E.E. and Zachara,J.M. (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology* **30:** 1618-1628.

Rothfuss,F. and Conrad,R. (1993) Vertical profiles of methane concentrations dissolved substrates and processes involved in methane production in a flooded Italian rice field. *Biogeochem.* **18:** 137-152.

Schloss,P.D. and Handelsman,J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71:** 1501-1506.

Schwertmann,U. and Cornell,R.M. (2000) *Iron Oxides in the Laboratory*. WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Seeliger,S., Janssen,P.H., and Schink,B. (2002) Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol. Lett.* **211:** 65-70.

Shelobolina,E.S., Nevin,K.P., Blakeney-Hayward,J.D., Johnsen,C.V., Plaia,T.W., Krader,P. *et al.* (2007) *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* **57:** 126-135.

Shelobolina,E.S., Vrionis,H.A., Findlay,R.H., and Lovley,D.R. (2008) *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58:** 1075-1078.

Straub,K.L. and Buchholz-Cleven,B.E.E. (2001) *Geobacter bremensis* sp. nov. and *Geobacter pelophilus* sp. nov., two dissimilatory ferric-iron-reducing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:** 1805-1808.

Thamdrup,B. (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Adv. Microb. Ecol.* **16:** 41-84.

Thauer,R.K., Jungermann,K., and Decker,K. (1977) Energy conservation in chemotropic anaerobic Bacteria. *Bacteriological Reviews* **41:** 100-180.

van Bodegom,P.M., Scholten,J.C.M., and Stams,A.J.M. (2004) Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49:** 261-268.

van der Wielen,P.W.J.J., Rovers,G.M.L.L., Scheepens,J.M.A., and Biesterveld,S. (2002) *Clostridium lactatifermentans* sp. nov., a lactate-fermenting anaerobe isolated from the caeca of a chicken. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52:** 921-925.

Wiegel,J., Tanner,T., and Rainey,F.A. (2006) An Introduction to the Family *Clostridiaceae*. In *Prokaryotes*. 654-678.

Yao,H., Conrad,R., Wassmann,R., and Neue,H.U. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47:** 269-295.

IV. Zusammenfassende Diskussion

Die mikrobielle Eisenreduktion ist nach der Methanogenese der zweitwichtigste anaerobe Mineralisationsprozess im Reisfeldboden und hat einen wesentlichen Einfluss auf die ablaufenden biogeochemischen Prozesse in diesem Habitat. Erste Erkenntnisse über den Eisenzyklus und die Lokalisation der damit verbundenen Redoxprozesse sowie über die numerische Abundanz der eisenreduzierenden Mikroorganismen im Reisfeldboden konnten in einzelnen Studien gewonnen werden und ermöglichten einen ersten Einblick in die Eisenreduktion in diesem Habitat. Allerdings ist bisher wenig über die funktionelle Gilde der eisenreduzierenden Bakterien im Reisfeldboden bekannt und das Wissen über Diversität und Struktur dieser Mikroorganismen im natürlichen System begrenzt.
In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Eisenreduktion im Reisfeldboden mittels biogeochemischer und molekularbiologischer Methoden analysiert. Ziel war es, ein detailliertes Verständnis der Diversität und Funktion der primär an der dissimilatorischen Eisenreduktion beteiligten Populationen im Ökosystem Reisfeld zu erhalten und Kenntnisse über die Zusammensetzung der eisenreduzierenden mikrobiellen Gemeinschaft unter diversen physiologischen Bedingungen zu erlangen. Der Fokus lag dabei auf der Charakterisierung der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft in Anwesenheit unterschiedlicher Eisen(III)-Oxide und Kohlenstoffquellen mit Hilfe der Stabilen Isotopenbeprobung (SIP). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente spiegeln weitgehend die natürlichen Bedingungen im Reisfeldboden wider, da die verwendeten Eisen(III)-Oxide und Kohlenstoffquellen in vorherigen Studien als natürlich vorkommende Komponenten des Reisfeldbodens und potentielle Substrate für dissimilatorische Eisenreduzierer identifiziert wurden.

1. Diversität und Struktur eisenreduzierender Mikroorganismen

In vielen anoxischen Habitaten ist Fe(III) der am häufigsten vorkommende natürliche Elektronenakzeptor (Lovley, 1991). In bisherigen Studien wurde die dissimilatorische Eisenreduktion hauptsächlich unter dem Aspekt der biologischen Sanierung von kontaminierten Böden und Grundwasserleitern untersucht und Mitglieder der Familie *Geobacteraceae* stellen dabei oftmals die dominierende mikrobielle Population dar (einen Überblick gibt Lovley *et al*., 2004). Trotz dieser globalen Relevanz und der Interaktion

und Konkurrenz mit anderen physiologischen Gruppen (z.B. sulfatreduzierenden Bakterien, methanogenen *Archaea*) ist bisher wenig über dissimilatorische eisenreduzierende Populationen im natürlichen System bekannt. Durch Anreicherung, Kultivierung und Isolierung konnten eine Reihe von Mikroorganismen isoliert werden, die phylogenetisch sehr divers sind (siehe Kapitel I.2.3, Abb. 2) und ein breites Spektrum an Elektronendonoren und -akzeptoren nutzen können. Bisher wurden diese metabolischen Unterschiede zwischen den dissimilatorischen Eisenreduzierern verwendet, um die Physiologie dieser Mikroorganismen mit der Funktion in ihrer natürlichen Umgebung zu verknüpfen. So wurden z.B. *Geobacter* species oftmals mit der Reduktion von Fe(III) und der gleichtzeitigen Oxidation von Acetat in Verbindung gebracht (Lovley *et al*., 2004).

In dieser Arbeit wurde die Methode der Stabilen Isotopenbeprobung erstmalig zur Identifizierung der eisenreduzierenden Gemeinschaft als funktionelle Gilde angewandt. Die RNA-basierende Stabile Isotopenbeprobung ermöglichte dabei einen detaillierten Einblick in die Diversität und Zusammensetzung der dissimilatorischen Eisenreduzierer im Reisfeldboden und erlaubte die Identifizierung von bisher unbekannten eisenreduzierenden Populationen. Nach der Reduktion von alternativen Elektronenakzeptoren wurden die Mikrokosmen mit unterschiedlichen Eisen(III)-Oxiden versetzt (Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit oder Hämatit) und $^{13}C_2$-markiertes Acetat (siehe Kapitel III.1 und III.2) oder $^{13}C_3$-markiertes Lactat (siehe Kapitel III.3) dienten als Kohlenstoffquelle und potentieller Elektronendonor für eisenreduzierende Mikroorganismen. Das schwere Isotop des Kohlenstoffs wurde durch Assimilation in die Biomasse der metabolisch aktiven Zellen inkorporiert. Über die Auftrennung der schweren und leichten RNA mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Amplifikation, Klonierung und vergleichender Sequenzanalyse der bakteriellen 16S rRNA konnten eisenreduzierende Populationen im Reisfeldboden unter variierenden physiologischen Bedingungen identifiziert werden. Auch in Abwesenheit von Eisen(III)-Oxiden wurden die Assimilation von Acetat und Lactat nachgewiesen, weshalb diese Mikrokosmen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden, wichtige Kontrollen zur Identifizierung tatsächlicher Eisenreduzierer darstellten.

In allen Inkubationen, die Eisen(III)-Oxide als potentielle Elektronenakzeptoren enthielten, konnten Mitglieder der *Geobacteraceae* als dominierende bakterielle Population identifiziert werden. Diese Klone bilden spezifische Cluster, die durch die verschiedenen Eisen(III)-Oxide definiert wurden. Dies konnte besonders in den Ansätzen

mit Lepidokrokit („*Lepidocrocite Cluster*“) und Hämatit („*Hematite Cluster*“) beobachtet werden (siehe Kapitel III.2, Fig. 7 und Kapitel III.3, Fig. 8). Vertreter des „*Lepidocrocite Cluster*“ besitzen auf Ebene der 16S rRNA-Gene eine Sequenzähnlichkeit von 93-95% zu *Geobacter chapellei*, während Klone des „*Hematite Cluster*“ mit einer Sequenzähnlichkeit von 95-96% nah verwandt mit den kultivierten Vertretern *G. bremensis*, *G. bemidjiensis* und *G. humireducens* sind. Damit stellen diese beiden Cluster möglicherweise neue Gattungen innerhalb der Familie der *Geobacteraceae* dar. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass *Pelobacter propionicus* der nächste Verwandte von *G. chapellei* ist (Sequenzähnlichkeit von 94%), aber aufgrund der physiologischen Eigenschaften der Gattung *Geobacter* zugeordnet wird (Holmes *et al*., 2004b; Lonergan *et al*., 1996). Die Klone, die in den Ansätzen mit Ferrihydrit detektiert wurden, zeigten keine direkte Zugehörigkeit zu einer bestimmten *Geobacter* species und bildeten mehrere Cluster innerhalb der phylogenetischen Gattung der *Geobacter* (siehe Kapitel III.1, Fig. 6A und Kapitel III.3, Fig. 8). Die Fähigkeit zur Reduktion von Ferrihydrit scheint daher innerhalb der Eisenreduzierer weit verbreitet zu sein, da Ferrihydrit aufgrund seiner Eigenschaften für Mikroorganismen leicht zugänglich ist und oftmals die dominierende Eisen(III)-Phase in natürlichen Habitaten repräsentiert (Lovley und Phillips, 1986; Thamdrup, 2000).

Ein weiteres neues Cluster von Klonen aus den Inkubationen mit Lepidokrokit und Goethit konnte der Familie der *Myxococcaceae* (δ-*Proteobacteria*) zugeordnet werden (siehe Kapitel III.1, Fig. 6B und Kapitel III.2, Fig. 8). Dieses Cluster wies eine enge Verwandtschaft zu dem Stamm *Anaeromyxobacter* sp. FAc12 auf, der aus Reisfeldboden isoliert wurde und unter anderem zum Wachstum mit Ferrihydrit und Acetat befähigt ist (Treude *et al*., 2003). In Anwesenheit von Goethit zeigten *Anaeromyxobacter* spp. und *Geobacter* spp. eine vergleichbare metabolische Aktivität, was auf die Ausbildung von unterschiedlichen ökologischen Nischen innerhalb des Systems hindeutet. Eine Koexistenz dieser beiden Spezies wurde in Anreicherungskulturen aus sauren Sedimenten nachgewiesen, die mit Uran verunreinigt waren (Petrie *et al*., 2003). Die Autoren postulieren, dass die Abundanz und die Struktur der eisenreduzierenden Gemeinschaft von geochemischen Faktoren, wie z.B. pH-Wert und Nitratkonzentration, bestimmt werden. Diese beiden Parameter spielten in den Experimenten dieser Arbeit keine wesentliche Rolle, da die Nitratkonzentrationen unterhalb des Detektionslimits lagen und der pH-Wert sich in allen Versuchen in einem konstanten Bereich (7,2-7,3) bewegte. Experimente mit Reinkulturen könnten erste Hinweise über die Faktoren liefern, die der

Konkurrenzfähigkeit von *Anaeromyxobacter* spp. und *Geobacter* spp. in Anwesenheit von Goethit zugrunde liegen. Basierend auf diesen Ergebnissen könnten Rückschlüsse auf die Lebensweise und Interaktionen dieser beiden Gattungen gezogen und anschließend die Gültigkeit dieser Hypothese im Reisfeldboden überprüft werden.

Neben *Geobacter* spp. und *Anaeromyxobacter* spp., die eindeutig an der Reduktion der verschiedenen Eisen(III)-Oxid-Phasen im Reisfeldboden beteiligt waren, konnten weitere Klongruppen in den schweren Fraktionen der untersuchten Mikrokosmen detektiert und diversen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Clostridien-verwandte Populationen wurden nach einer Inkubation von 24 Stunden mit hoher Abundanz (64,1% aller Klone) in den Ansätzen mit Ferrihydrit und Lactat nachgewiesen. Die direkte Beteiligung dieser Populationen an der Reduktion von Ferrihydrit ist allerdings aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich (ausführliche Diskussion siehe Kapitel III.3). In den Mikrokosmen mit Lactat und Lepidokrokit (siehe Kapitel III.3) konnte eine neuartige eisenreduzierende Population identifiziert werden, die der Familie der *Paenibacillaceae* zugeordnet wurde. Dieses Cluster zeigt auf Ebene der 16S rRNA eine Sequenzähnlichkeit von nur 93-94% zu *Aneurinibacillus terranovensis* und kann damit als eine neue Gattung innerhalb der Familie der *Paenibacillaceae* angesehen werden. *A. terranovensis* kann Lactat als Kohlenstoffquelle verwerten (Allan *et al*., 2005), wurde bislang aber nicht mit der dissimilatorischen Eisenreduktion in Verbindung gebracht. Die direkte Beteiligung dieser Population an der Reduktion von Lepidokrokit ist dennoch sehr wahrscheinlich, weil dieses Cluster in der mitgeführten Kontrolle (d.h. ohne Lepidokrokit) nicht detektiert wurde.

Ein Einbau der ^{13}C-Markierung konnte auch in den mitgeführten Kontroll-Mikrokosmen beobachtet werden, denen keine Eisen(III)-Oxide hinzugefügt wurden. Die Konzentrationen anderer potentieller Elektronenakzeptoren (z.B. Fe^{3+}, NO_3^-, SO_4^{2-}) waren aufgrund der Vorinkubation des Reisfeldbodens zum Zeitpunkt der ^{13}C-Zugabe erschöpft und lagen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methoden. Aus thermodynamischen Gründen kann Acetat unter anaeroben Bedingungen nur gekoppelt an einen respiratorischen Prozess (z.B Nitratreduktion, Eisenreduktion) oder in syntrophen Gemeinschaften oxidiert werden (Schink, 1997). Basierend auf früheren Studien (Achtnich *et al*., 1995b; Chidthaisong und Conrad, 2000) kann eine syntrophe Interaktion für den hier verwendeten Reisfeldboden ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch vermuten, dass die in den Kontrollen detektierte Population die

Oxidation von Acetat an die Reduktion von Eisen(III)-Oxiden mit geringer Bioverfügbarkeit koppelt. Die dominierende Population konnte β-proteobakteriellen *Dechloromonas* spp. zugeordnet werden, die unter anderem (Per)Chlorat und Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen und bisher nicht als dissimilatorische Eisenreduzierer beschrieben wurden (Coates *et al*., 1999b; Coates *et al*., 2001). Bisher ist die Fähigkeit zur dissimilatorischen Eisenreduktion innerhalb der β-*Proteobacteria* nur für *Ferribacterium limneticum* bekannt (Cummings *et al*., 1999). Allerdings konnte in einer Anreicherungskultur gezeigt werden, dass *Dechloromonas*-verwandte Populationen eine wesentliche Rolle bei der Reduktion von Goethit und der Nitrat-abhängigen Oxidation von Fe(II) in Süßwasser-Sedimenten spielen (Weber *et al*., 2006a). Die Aktivität dieser Population in den Mikrokosmen mit Goethit und Hämatit unterstützt unsere Hypothese, dass diese bisher nicht kultivierten *Dechloromonas* spp. an der Reduktion von Eisen(III)-Oxiden mit geringer Bioverfügbarkeit beteiligt sein könnten. Neben Goethit und Hämatit könnte z.B. Magnetit (Fe_3O_4) eine solche Eisen(III)-Oxid-Phase darstellen. Magnetit ist ein natürlich vorkommendes Fe(II)-Fe(III)-Mineral, dass u.a. durch strukturelle Umwandlungen von Ferrihydrit entstehen kann (Hansel *et al*., 2005) und außerdem als Nebenprodukt bei der dissimilatorischen Reduktion von Ferrihydrit gebildet wird (z.B. Coker *et al*., 2008; Lovley *et al*., 1987). Über Vorkommen und Bedeutung von Magnetit in dem verwendeten Reisfeldboden ist nichts bekannt. Ob Magnetit während der Vorinkubation des Reisfeldbodens gebildet wurde (z.B. durch die Adsorption von Fe(II) an amorphe Eisen(III)-Oxide) und dieses dann möglicherweise mikrobiell reduziert wurde, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Diversität eisenreduzierender Populationen im natürlichen System bisher stark unterschätzt wurde. Häufig wurden *Geobacter* spp. mit der Eisenreduktion in Böden und Sedimenten in Verbindung gebracht und als bedeutende eisenreduzierende Population angesehen (z.B. Snoeyenbos-West *et al*., 2000). Diese Dominanz kann darauf zurückgeführt werden, dass *Geobacter* spp. ein breites Spektrum an Substraten oxidieren können und zur Identifizierung der Eisenreduzierer oftmals Primer verwendet wurden, die auf Ebene der 16S rRNA spezifisch für *Geobacter* spp. sind (Anderson *et al*., 1998; Cummings *et al*., 2003; Holmes *et al*., 2002). Des Weiteren sind *Geobacter* spp. neben *Shewanella* spp. die am besten untersuchten Eisenreduzierer und stellen damit Modellorganismen innerhalb dieser phylogenetischen Gruppe dar. Da es sich bei den dissimilatorischen Eisenreduzierern um

keine monophyletische Gruppe handelt, ist ein funktionelles Markergen als wesentliches molekulares Werkzeug zur umfassenden Analyse dieser funktionellen Gilde notwendig. Hier besteht jedoch noch erheblicher Forschungsbedarf, und das Wissen ist auch in diesem Kriterium auf Mitglieder der *Geobacter* beschränkt.

2. Einfluss der Eisen(III)-Oxide auf die mikrobielle Reduktion

Ziel dieser Arbeit war es, neben der Diversität und Zusammensetzung eisenreduzierender Populationen im Reisfeldboden auch den Einfluss charakteristischer Eigenschaften der Eisen(III)-Oxid-Phasen auf die mikrobielle Reduzierbarkeit zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die Zugabe von verschiedenen Eisen(III)-Oxiden einen selektiven Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft der Eisenreduzierer hat. Die synthetisierten Eisen(III)-Oxide, die als Elektronenakzeptor zur Verfügung standen, unterscheiden sich in ihrer Kristallinität und in ihrer Oberflächen- und der Partikelgröße (siehe Kapitel III.2, Tab. 1). Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse und der Bestimmung der spezifischen Oberflächengröße sind vergleichbar mit Literaturangaben (z.B. Roden, 2003; Schwertmann und Cornell, 2000), wobei leichte Abweichungen auf Varianzen und unterschiedliche Handhabungen bei der Synthese zurückzuführen sind. Kristallinität, Oberflächen- und Partikelgröße scheinen den Grad und das Ausmaß der mikrobiellen Eisenreduktion zu beeinflussen (Roden und Zachara, 1996; Zachara *et al*., 1998) und könnten für die in dieser Arbeit beschriebene Selektion von individuellen eisenreduzierenden Populationen verantwortlich gewesen sein. Ferrihydrit ist ein amorphes Eisen(III)-Oxid und aus thermodynamischen Gründen ein energetisch günstiger Elektronenakzeptor für Mikroorganismen ($E^{\circ\prime}$ = +78 mV; Thamdrup, 2000). Die zunehmende Kristallinität (Ferrihydrit < Lepidokrokit < Goethit < Hämatit) hat eine Abnahme des Redoxpotentials zur Folge, was mit einer verminderten mikrobiellen Reduzierbarkeit der Eisen(III)-Oxide verbunden ist. Dies konnte auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Allerdings muss berücksichtig werden, dass eine direkte Reduktion von Goethit und Hämatit nicht nachgewiesen wurde und Rückschlüsse auf den Unterschieden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften in den verschiedenen Ansätzen beruhen. In Experimenten mit *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella putrefaciens* konnte beobachtet werden, dass die mikrobielle Reduzierbarkeit der Eisen(III)-Oxide hauptsächlich durch die Oberflächengröße der Eisen(III)-Oxide und

weniger durch mineralogische (z.B. Kristallinität) und thermodynamische Eigenschaften kontrolliert wird (Roden, 2006). Diese Beobachtungen wurden in dieser Arbeit nur teilweise bestätigt. Goethit hat eine kleinere Oberfläche als Hämatit und müsste somit schwerer zu reduzieren sein. Allerdings lassen die biogeochemischen Parameter (z.B. Acetat-Konzentration, $^{13}CH_4$ und $^{13}CO_2$) auf eine geringere Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft in den Hämatit-Inkubationen im Vergleich zu den Ansätzen mit Goethit schließen, was auf eine verzögerte Reduktion von Hämatit hindeuten würde (siehe Kapitel III.2, Tab. S1). Außer Kristallinität und Oberflächengröße, scheint auch die Adsorption von Fe(II) an die Eisen(III)-Oxide und an die Zelloberfläche von Eisenreduzierern Einfluss auf die mikrobielle Reduktion zu nehmen (Urrutia *et al*., 1998). So konnte in Experimenten mit *Shewanella* spp. und *Geobacter metallireducens* gezeigt werden, dass die Entfernung von Fe(II) mittels „*Aqueous-phase*"-Transport oder die Zugabe von Fe(II)-komplexierenden Substanzen (z.B. Al-Oxide, NTA, EDTA) zu einem Anstieg der mikrobiellen Eisenreduktion führt (Roden *et al*., 2000; Roden und Urrutia, 1999; Roden und Urrutia, 2002; Urrutia *et al*., 1999). Die Adsorption von Fe(II) könnte eine Erklärung für die geringe mikrobielle Reduktion von Goethit und Hämatit sein. Das während der Vorinkubation gebildete Fe(II) (ca. 100 µmol g^{-1}) konnte nach Zugabe der Eisen(III)-Oxide an deren Oberfläche binden, die Verfügbarkeit von funktionellen Fe(III)-Gruppen verringern und somit die Reduktions-Rate herabsetzen. Aufgrund des verwendeten Versuchaufbaus kann nicht eindeutig bestimmt werden, welcher der beschriebenen Faktoren die mikrobielle Reduktion von Fe(III) kontrollierte.

Neben der Ausbildung von phylogenetisch diversen Populationen konnten auch innerhalb der *Geobacter*-verwandten Population unterschiedliche Reduktionspotentiale für die verwendeten Eisen(III)-Oxide beobachtet werden (siehe Kapitel III.2 und III.3). Eine mögliche Erklärung für diese selektive Reduktion könnten verschiedene Elektronentransport-Strategien sein. Bisher ist bekannt, dass *Geobacter* spp. direkten Kontakt für die Reduktion von schwer löslichen Eisen(III)-Oxiden benötigen (Nevin und Lovley, 2000a). Die von *Geobacter* spp. gebildeten Flagellen und Pili dienen dabei der Anheftung (Childers *et al*., 2002), bzw. dem Elektronentransport auf die Oberfläche der Eisen(III)-Oxide (Reguera *et al*., 2005) und ermöglichen somit die Reduktion von Fe(III). Die Verwendung von „Elektronen-Shuttle-Molekülen" und Eisen-Chelatoren stellen weitere Möglichkeiten des Elektronentransports zwischen Mikroorganismen und den Eisen(III)-Oxiden dar. Diese Strategien wurden jedoch bislang nur für die

dissimilatorischen Eisenreduzierer *Shewanella* spp. und *Geothrix* spp. beschrieben und sind für *Geobacter* spp. noch nicht bestätigt (Lovley *et al*., 2004; Weber *et al*., 2006b).

3. Methanogenese und Eisenreduktion

Reisfelder sind eine bedeutende anthropogene Quelle des Treibhausgases Methan und daher von globaler Relevanz. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Ferrihydrit und Lepidokrokit zu einer deutlichen Verminderung der Methanemission führt, während kristalline Eisen(III)-Oxide (z.B. Goethit und Hämatit) keinen Einfluss auf die Methanogenese haben (Jäckel und Schnell, 2000b; Lueders und Friedrich, 2002; Qu *et al*., 2004). Diese Ergebnisse konnten in den Arbeiten dieser Studie bestätigt und ein direkter Zusammenhang zwischen der Eisen(III)-Konzentration und der Suppression der Methanogenese beobachtet werden: je höher die eingesetzte Eisen(III)-Konzentration, desto geringer die Methanemission. Wurde den Mikrokosmen Acetat und 140 µmol g^{-1} Ferrihydrit zugefügt, war die Verminderung, bezogen auf die Gesamtemission im Untersuchungszeitraum (72 h), um ca. 1/3 höher im Vergleich zur Verwendung von nur 70 µmol g^{-1} Ferrihydrit. Auch die Kohlenstoffquelle hat einen Einfluss auf die Inhibierung der Methanogenese, was möglicherweise auf die Physiologie der mikrobiellen eisenreduzierenden Population zurückzuführen ist, die diese Kohlenstoffquelle verwenden kann. Die Ansätze mit Lactat zeigten sowohl unter Ferrihydrit- als auch unter Lepidokrokit-reduzierenden Bedingungen eine geringere Inhibierung, als in den Mirkokosmen mit Acetat, trotz vergleichbarer und im Fall von Lepidokrokit sogar höheren Eisen(III)-Konzentrationen. Das Lactat wurde vermutlich innerhalb der ersten Stunden von Vertretern der Clostridien fermentiert und die gebildeten Abbauprodukte (Propionat und Acetat) standen dann den eisenreduzierenden Populationen als Elektronendonor zur Verfügung. Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft zeigte, dass *Geobacter* spp. vorzugsweise an der Suppression der Methanogenese beteiligt waren und die Eisenreduktion wahrscheinlich an die Oxidation von Acetat gekoppelt ist, auch wenn die komplette Oxidation von Lactat durch diese Spezies bekannt ist (Lovley *et al*., 2004).

Die genauen Faktoren, die zur Verminderung der Methanemission führen sind bisher nicht bekannt, aber mehrere Gründe werden diskutiert. Zum einen könnte die Kompetition zwischen eisenreduzierenden Populationen und methanogenen *Archaea* um gemeinsame Substrate (z.B. Acetat und H_2) eine Rolle spielen. Fe(III) stellt einen energetisch

günstigeren Elektronenakzeptor dar als CO_2 und es wird vermutet, dass die thermodynamisch bevorzugte funktionelle Gilde einen niedrigeren Schwellenwert für gemeinsame Substrate hat (Achtnich *et al*., 1995a; Conrad, 1999; Frenzel *et al*., 1999). Die Acetat-Konzentrationen wurden in dieser Studie nicht unter den Schwellenwert von acetoklastischen Methanogenen abgesenkt, was auch durch die Detektion von *Methanosarcina* spp. und *Methanosaeta* spp. in den Inkubationen mit Ferrihydrit und Acetat belegt wurde (siehe Kapitel III.1, Fig. 4). Eine direkte Inhibierung der Methanogenese durch Fe(III) wie es in Experimenten mit methanogenen Reinkulturen beobachtet wurde (van Bodegom *et al*., 2004), ist ebenfalls vorstellbar. Dabei reagierten Methanogene, die H_2/CO_2 als Substrat verwendeten (z.B. *Methanosarcina barkeri*) sensitiver auf die Zugabe von amorphem $Fe(OH)_3$ als Kulturen, die Acetat als Elektronendonor verwendeten. Ein erhöhtes Redoxpotential, die Beteiligung unterschiedlicher Enzyme innerhalb der Methanogenese oder die Adsorption von Fe(III) an Ko-Faktoren und Proteine an der äußeren Membran werden als mögliche Faktoren diskutiert. Der genaue biochemische Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass methanogene *Archaea* Eisen(III)-Oxide anstelle von CO_2 als Elektronenakzeptor verwenden. Für *Methanosarcina barkeri* konnte die Reduktion von amorphen Eisen(III)-Oxiden nachgewiesen werden, was sich in einem Anstieg der Fe(II)-Konzentration und in einer verminderten Bildung von CH_4 äußerte (Bond und Lovley, 2002; van Bodegom *et al*., 2004). Allerdings wurde in diesen Reinkultur-Experimenten H_2, und nicht wie in dieser Arbeit Acetat als Elektronendonor verwendet. Ob *Methanosarcina* spp. und *Methanosaeta* spp. die Reduktion von Fe(III) direkt an die Energiegewinnung koppeln, oder ob dieser Prozess als Elektronensenke dient, ist bisher noch nicht bekannt.

In anoxischen Reisfeldbodeninkubationen wurde unter Zugabe von Ferrihydrit ein vorübergehender Anstieg der rRNA-Mengen von Rice Cluster I (RC-I) beobachtet, was vermuten ließ, dass hydrogenotrophe Methanogene die Oxidation von H_2 an die Reduktion von Fe(III) koppeln (Lueders und Friedrich, 2002). Diese Annahme wurde aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht bestätigt. Die Reduktion von Fe(III) durch methanogene *Archaea* spielte in diesen Ansätzen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. RC-I konnte in den Mikrokosmen mit 70 µmol g^{-1} Ferrihydrit mittels T-RFLP-Analyse detektiert werden, aber es konnten keine Unterschiede in der relativen Abundanz zwischen leichten und schweren Gradientenfraktionen detektiert

werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigten die T-RFLP-Profile keine Unterschiede zur mitgeführten Kontrolle (ohne Ferrihydrit).

Die Eisendüngung stellt eine mögliche Strategie zur Verminderung der Methanemission aus Reisfeldern dar (Inubushi *et al*., 1997; Jäckel *et al*., 2005). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass zu hohe Eisen(II)-Konzentrationen einen toxischen Effekt auf Reispflanzen ausüben können. Durch die Ausbildung von sogenannten Eisenplaques können sich die Pflanzen vor einer erhöhten Aufnahme von Fe(II) schützen. Dies wurde bereits an Reispflanzen beobachtet (Bacha und Hossner, 1977; Chen *et al*., 1980). Des Weiteren ist die direkte Anwendung von reinen Eisen(III)-Oxiden im Feld sehr kostspielig und wird deshalb noch nicht praktiziert. In einigen Studien wurde jedoch Hochofenschlacke verwendet, die als Abfallprodukt der Stahlindustrie anfällt und ca. 20% Eisen enthält (Furukawa und Inubushi, 2002; Furukawa und Inubushi, 2004a; Furukawa und Inubushi, 2004b). Die Autoren dieser Studien vermuten, dass die Zugabe von Hochofenschlacke zu bepflanztem Reisfeldboden die Methanemission für einen längeren Zeitraum (bis zu 50 Jahre) vermindern kann. Inwieweit diese Form der Düngung die mikrobielle Gemeinschaft der Eisenreduzierer beeinflusst, wurde bisher noch nicht untersucht. Neben dem Einfluss der Eisendüngung auf Reispflanzen und die damit verbundenen Kosten, konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Reduktion von Fe(III) zu einer temporären Stimulierung der N_2O-Produktion führt (Huang *et al*., 2009). Distickstoffoxid (N_2O) ist ein 310 Mal klimawirksameres Treibhausgas als CO_2 und die aktuellen atmosphärischen Konzentrationen liegen bei ca. 320 ppb (IPCC, 2007). Auch wenn die Eisendüngung zu einer Verminderung der Methanemission führt, müssen die hier aufgeführten Nachteile in weiteren Studien berücksichtigt und kritisch betrachtet werden.

4. Ausblick

Die in dieser Dissertation vorgelegten Arbeiten ermöglichen einen umfangreichen Einblick in den Prozess der Eisenreduktion und in die Diversität und Zusammensetzung eisenreduzierender Populationen im Modellsystem Reisfeldboden. Die Methode der Stabilen Isotopenbeprobung erlaubte dabei die Identifizierung von bereits bekannten und neuartigen eisenreduzierenden Mikroorganismen als funktionelle Gilde unter eisenreduzierenden und methanogenen Bedingungen. Zusammenfassend zeigen die

Ergebnisse, dass sowohl die Eisen(III)-Oxid-Phase als auch die Kohlenstoffquelle einen Einfluss auf die aktiven mikrobiellen Populationen der Eisenreduzierer hat.

Die genauen Faktoren, die diesen selektiven Effekt der Eisen(III)-Oxide auf die mikrobielle Gemeinschaft beeinflussen, sind nach wie vor offen. Die charakteristischen Eigenschaften der Eisen(III)-Oxide (z.B. Kristallinität, Oberflächengröße, Redoxpotential) und die Adsorption von biogenem Fe(II) an die Oberfläche von Mikroorganismen und Fe(III) sollten daher im Fokus zukünftiger Untersuchungen stehen. Des Weiteren sollte der Elektronentransport-Mechanismus intensiv analysiert werden, da dieser einen möglichen Selektionsvorteil im natürlichen Habitat darstellt, und damit die unterschiedlichen Reduktionspotentiale innerhalb der *Geobacteraceae* sowie zwischen *Anaeromyxobacter* spp. und *Geobacter* spp. erklären könnte.

Die Funktion der neuartigen β-proteobakteriellen *Dechloromonas* spp. unter methanogenen Bedingungen ist bisher nicht bekannt. Wichtige Folgeschritte wären Anreicherung, Isolierung und Kultivierung dieser Mikroorganismen, um die physiologischen Eigenschaften zu charakterisieren und daraus potentielle Funktionen im Reisfeldboden ableiten zu können.

V. Literaturverzeichnis

Achtnich, C., Bak, F., and Conrad, R. (1995a) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19:** 65-72.

Achtnich, C., Schuhmann, A., Wind, T., und Conrad, R. (1995b) Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate aonsumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16:** 61-69.

Akasaka, H., Izawa, T., Ueki, K., und 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.

Allan, R. N., Lebbe, L., Heyrman, J., De Vos, P., Buchanan, C. J., und Logan, N. A. (2005) *Brevibacillus levickii* sp. nov., and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55:** 1039-1050.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215:** 403-410.

Amann, R. I., Ludwig, W., und Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59:** 143-169.

Anderson, R. T., Rooney-Varga, J. N., Gaw, C. V., und Lovley, D. R. (1998) Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* **32:** 1222-1229.

Anderson, R. T., Vrionis, H. A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C. T., Long, P. E., Dayvault, R. *et al.* (2003) Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 5884-5891.

Arth, I. und Frenzel, P. (2000) Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: the detection of processes by a new multi-channel electrode. *Biol. Fertil. Soils* **31:** 427-435.

Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., und Weightman, A. J. (2006) New Screening Software Shows that Most Recent Large 16S rRNA Gene Clone Libraries Contain Chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72:** 5734-5741.

Atlas, R. M. (1984) Diversity of microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* **7:** 1-47.

Bacha, R. E. und Hossner, L. R. (1977) Characteristics of coatings formed on rice roots as affected by iron and manganese additions. *Soil Science Society of America Journal* **41:** 931-935.

Bak, F., Scheff, G., und Jansen, K. H. (1991) A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfate reduction-rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 23-30.

Balashova, V. V. und Zavarzin, G. A. (1979) Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria. *Microbiology* **48:** 635-639.

Bale, S. J., Goodman, K., Rochelle, P. A., Marchesi, J. R., Fry, J. C., Weightman, A. J., und 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.

Benz, M., Brune, A., und Schink, B. (1998) Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **169:** 159-165.

Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., und Lovley, D. R. (2002) Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295:** 483-485.

Bond, D. R. und Lovley, D. R. (2002) Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environ. Microbiol.* **4:** 115-124.

Boone, D. R., Liu, Y. T., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O., und Aldrich, H. C. (1995) *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45:** 441-448.

Boschker, H. T. S., Nold, S. C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R. *et al.* (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C-labelling of biomarkers. *Nature* **392:** 801-805.

Brand, W. A. (1996) High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **31:** 225-235.

Brune, A., Frenzel, P., und Cypionka, H. (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* **24:** 691-710.

Canfield, D. E., Thamdrup, B., und Hansen, J. W. (1993) The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: Iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **57:** 3867-3883.

Chao, T. T. und Zhou, L. (1983) Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron-oxides from soils and sediments. *Soil Science Society of America Journal* **47:** 225-232.

Chaudhuri, S. K. und Lovley, D. R. (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology* **21:** 1229-1232.

Chen, C. C., Dixon, J. B., und Turner, F. T. (1980) Iron Coatings on Rice Roots - Mineralogy and Quantity Influencing Factors. *Soil Science Society of America Journal* **44:** 635-639.

Chidthaisong, A. und Conrad, R. (2000) Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 73-86.

Childers, S. E., Ciufo, S., und Lovley, D. R. (2002) *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416:** 767-769.

Childs, C. W. (1992) Ferrihydrite - a review of structure, properties and occurrence in relation to soils. *Z. Pflanz. Bodenk.* **155:** 441-448.

Chin, K. J., Hahn, D., Hengstmann, U., Liesack, W., und Janssen, P. H. (1999) 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., Rainey, F. A., Janssen, P. H., und Conrad, R. (1998) Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **21:** 185-200.

Chipperfield, J. R. und Ratledge, C. (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* **13:** 165-168.

Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M., Cole, K. A., Bender, K. S., und Achenbach, L. A. (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* **411:** 1039-1043.

Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V., und Lovley, D. R. (1999a) *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49:** 1615-1622.

Coates, J. D., Michaelidou, U., Bruce, R. A., O'Connor, S. M., Crespi, J. N., und Achenbach, L. A. (1999b) Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 5234-5241.

Coker, V. S., Bell, A. M. T., Pearce, C. I., Pattrick, R. A. D., van der Laan, G., und Lloyd, J. R. (2008) Time-resolved synchrotron powder X-ray diffraction study of magnetite formation by the Fe(III)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *American Mineralogist* **93:** 540-547.

Conrad, R. (1993) Mechanisms controlling methane emission from wetland rice fields. S. 317-335. In: *The biogeochemistry of global change: radiative trace gases.* Oremland, R. S. (Hrsg.). Chapman & Hall, New York, N.Y.

Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28:** 193-202.

Conrad, R. und Frenzel, P. (2002) Flooded soils. S. 1316-1333. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton, G. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Cornell, R. M. and Schwertmann, U. (2003) *The Iron Oxides.* WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Cummings, D. E., Caccavo, F., Spring, S., und Rosenzweig, R. F. (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* **171:** 183-188.

Cummings, D. E., Snoeyenbos-West, O. L., Newby, D. T., Niggemyer, A. M., Lovley, D. R., Achenbach, L. A., und Rosenzweig, R. F. (2003) Diversity of *Geobacteraceae* species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microb. Ecol.* **46:** 257-269.

Dobbin, P. S., Carter, J. P., San Juan, C. G. S., von Hobe, M., Powell, A. K., und Richardson, D. J. (1999) Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* **176:** 131-138.

Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A., und Tiedje, J. M. (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* **42:** 495-505.

Drechsel, H. und Winkelmann, G. (1997) Iron chelation and siderophores. S. 1-49. In: *Transition Metals in Microbial Metabolism.* Winkelmann, G. und Carrano, C. J. (Hrsg.). Harwood academic publishers, Amsterdam, The Netherlands.

Dumont, M. G. und Murrell, J. C. (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nat. Rev. Microbiol.* **3:** 499-504.

Dunbar, J., Ticknor, L. O., und Kuske, C. R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:** 190-197.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., und Bottger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17:** 7843-7853.

Ehrenreich, A. und Widdel, F. (1994) Anaerobic Oxidation of Ferrous Iron by Purple Bacteria, A New-Type of Phototrophic Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **60:** 4517-4526.

Ehrlich, H. L. (2002) Geomicrobiology of Iron. S. 345-428. In: *Geomicrobiology.* Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences - a maximum-likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17:** 368-376.

Finneran, K. T., Johnsen, C. V., und Lovley, D. R. (2003) *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53:** 669-673.

Finneran, K. T. und Lovley, D. R. (2001) Anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci Technol.* **35:** 1785-1790.

Fitch, W. M. (1971) Toward defining course of evolution - minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20:** 406-416.

Frenzel, P., Bosse, U., und Janssen, P. H. (1999) Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 421-430.

Friedrich, M. W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr. Opinion Biotechnol.* **17:** 59-66.

Fuchs, G. (2006) Assimilation der Elemente N, P, S und der Spurenelemente. S. 233-242. In: *Allgemeine Mikrobiologie.* Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.

Furukawa, Y. und Inubushi, K. (2002) Feasible suppression technique of methane emission from paddy soil by iron amendment. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* **64:** 193-201.

Furukawa, Y. und Inubushi, K. (2004a) Effect of application of iron materials on methane and nitrous oxide emissions from two types of paddy soils. *Soil Science and Plant Nutrition* **50:** 917-924.

Furukawa, Y. und Inubushi, K. (2004b) Evaluation of slag application to decrease methane emission from paddy soil and fate of iron. *Soil Science and Plant Nutrition* **50:** 1029-1036.

Großkopf, R., Janssen, P. H., und Liesack, W. (1998) Diversity and structure 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.

Gutell, R. R., Larsen, N., und Woese, C. R. (1994) Lessons from an evolving ribosomal-RNA - 16S and 23S ribosomal-RNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58:** 10-26.

Hammer, O., Harper, D. A. T., und Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4.

Hansel, C. M., Benner, S. G., und Fendorf, S. (2005) Competing Fe(II)-induced mineralization pathways of ferrihydrite. *Environmental Science & Technology* **39:** 7147-7153.

He, Q. und Sanford, R. A. (2003) Characterization of Fe(III) reduction by chlororespiring *Anaeromxyobacter dehalogenans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 2712-2718.

Hengstmann, U., Chin, K. J., Janssen, P. H., und 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.

Hernandez, M. E., Kappler, A., und Newman, D. K. (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 921-928.

Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., und Moffett, B. F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43:** 1-11.

Holmes, D. E., Bond, D. R., und Lovley, D. R. (2004a) Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 1234-1237.

Holmes, D. E., Nevin, K. P., und Lovley, D. R. (2004b) Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54:** 1591-1599.

Holmes, D. E., Finneran, K. T., O'Neil, R. A., und Lovley, D. R. (2002) Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal Reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2300-2306.

Hori, T., Noll, M., Igarashi, Y., Friedrich, M. W., und Conrad, R. (2007) Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 101-109.

Huang, B., Yu, K. W., und Gambrell, R. P. (2009) Effects of ferric iron reduction and regeneration on nitrous oxide and methane emissions in a rice soil. *Chemosphere* **74:** 481-486.

Huber, T., Faulkner, G., und Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20:** 2317-2319.

Inubushi, K., Hori, K., Matsumoto, S., und Wada, H. (1997) Anaerobic decomposition of organic carbon in paddy soil in relation to methane emission to the atmosphere. *Water Science and Technology* **36:** 523-530.

IPCC (2001) Climate Change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Houghton,J.T., Ding,Y., Griggs,D.J., Noguer,M., van der Linden,P.J., und Xiaosu,D. (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge, England.

IPCC (2007) Climate Change 2007: Synthesis Report. An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Allali, A., Bojariu, R., Diaz, S., Elgizouli, J., Griggs, D., Hawkins, D., Hohmeyer, O., Jallow, B. P., Kajfez-Bogataj, L., Leavy, N., Lee, H. und Watts, D. (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge, England.

Ishii, S., Hotta, Y., und Watanabe, K. (2008) Methanogenesis versus electrogenesis: Morphological and phylogenetic comparisons of microbial communities. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72:** 286-294.

Jäckel, U., Russo, S., und Schnell, S. (2005) Enhanced iron reduction by iron supplement: A strategy to reduce methane emission from paddies. *Soil Biology & Biochemistry* **37:** 2150-2154.

Jäckel, U. und Schnell, S. (2000a) Role of microbial iron reduction in paddy soil. S. 143-144. In: *Non-CO_2 greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation.* van Ham, J., Baede, A. P. M., Meyer, L. A., und Ybema, R. (Hrsg.). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

Jäckel, U. und Schnell, S. (2000b) Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **32:** 1811-1814.

Jehmlich, N., Schmidt, F., Hartwich, M., von Bergen, M., Richnow, H. H., und Vogt, C. (2008a) Incorporation of carbon and nitrogen atoms into proteins measured by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP). *Rapid Communication in Mass Spectrom.* **22:** 2889-2897.

Jehmlich, N., Schmidt, F., von Bergen, M., Richnow, H. H., und Vogt, C. (2008b) Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME. Journal* **2:** 1122-1133.

Jensen, M. M., Thamdrup, B., Rysgaard, S., Holmer, M., und Fossing, H. (2003) Rates and regulation of microbial iron reduction in sediments of the Baltic-North Sea transition. *Biogeochem.* **65:** 295-317.

Jones, J. G., Gardener, S., und Simon, B. M. (1984) Reduction of ferric iron by heterotrophic bacteria in lake sediments. *Journal of General Microbiology* **130:** 45-51.

Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y., und Watanabe, K. (2008) Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79:** 43-49.

Kaplan, C. W. und Kitts, C. L. (2003) Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J. of Microbiol. Methods* **54:** 121-125.

Kappler, A. und Straub, K. L. (2005) Geomicrobiological cycling of iron. *Molecular Geomicrobiology* **59:** 85-108.

Karim, Z. (1984) Formation of aluminum-substituted goethite in seasonally waterlogged rice soils. *Soil Science Society of America Journal* **48:** 410-413.

Kashefi, K. und Lovley, D. R. (2000) Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 1050-1056.

Kashefi, K., Tor, J. M., Holmes, D. E., Van Praagh, C. V. G., Reysenbach, A. L., und Lovley, D. R. (2002) *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52:** 719-728.

Klüber, H. D. (1996) Wechselwirkung zwischen Nitratreduktion und Methanogenese in anoxischen Reisbodenaufschlämmungen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Kreader, C. A. (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 1102-1106.

Krumböck, M., und Conrad, R. (1991) Metabolism of positon-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 247-256.

Krylova, N. I., Janssen, P. H., und Conrad, R. (1997) Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23:** 107-117.

Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., und Stackebrandt, E. (1999) Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 3633-3640.

Laverman, A. M., Blum, J. S., Schaefer, J. K., Phillips, E. J. P., Lovley, D. R., und Oremland, R. S. (1995) Growth of Strain Ses-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 3556-3561.

Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., und Stackebrandt, E. (1997) Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. S. 375-439. In: *Modern Soil Microbiology.* van Elsas, J. D., Trevors, J. T., und Wellington, E. M. H. (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Liesack, W., Schnell, S., und Revsbech, N. P. (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* **24:** 625-645.

Lin, B., Van Verseveld, H. W., und Roling, W. F. M. (2002) Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. *Biomedical and Environmental Sciences* **15:** 130-144.

Lin, W. C., Coppi, M. V., und Lovley, D. R. (2004) *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 2525-2528.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., und 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.

Lonergan, D. J., Jenter, H. L., Coates, J. D., Phillips, E. J. P., Schmidt, T. M., und Lovley, D. R. (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *Journal of Bacteriology* **178:** 2402-2408.

Lovely, D. R. (2006) Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, 2nd edition. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., und Stackebrandt, E. (Hrsg.). Springer Verlag, New York, N. Y.

Lovley, D. R. (1987) Organic Matter Mineralization with the Reduction of Ferric Iron - A Review. *Geomicrobiology Journal* **5:** 375-399.

Lovley, D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiol. Rev.* **55**: 259-287.

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

Lovley, D. R. (1997a) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **20:** 305-313.

Lovley, D. R. (1997b) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum- contaminated aquifers. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.* **18:** 75-81.

Lovley, D. R. (2003) Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. *Nat. Rev. Microbiol.* **1:** 35-44.

Lovley, D. R. (2004) Potential role of dissimilatory iron reduction in the early evolution of microbial respiration. In: *Origins, Evolution and Biodiversity of Microbial Life.* Seckbach, J. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Lovley, D. R. und Anderson, R. T. (2000) Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the subsurface. *Hydrogeology Journal* **8:** 77-88.

Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt, H. L., Phillips, E. P., und Woodward, J. C. (1996a) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382:** 445-448.

Lovley, D. R., Fraga, J. L., Blunt-Harris, E. L., Hayes, L. A., Phillips, E. J. P., und Coates, J. D. (1998) Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **26:** 152-157.

Lovley, D. R., Fraga, J. L., Coates, J. D., und Blunt-Harris, E. L. (1999) Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **1:** 89-98.

Lovley, D. R., Holmes, D. E., und Nevin, K. P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* **49:** 219-286.

Lovley, D. R. und Phillips, E. J. P. (1986) Availability of Ferric Iron for Microbial Reduction in Bottom Sediments of the Freshwater Tidal Potomac River. *Appl. Environ. Microbiol.* **52:** 751-757.

Lovley, D. R. und Phillips, E. J. P. (1987) Rapid Assay for Microbially Reducible Ferric Iron in Aquatic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53:** 1536-1540.

Lovley, D. R. und Phillips, E. J. P. (1988) Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron Or Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **54:** 1472-1480.

Lovley, D. R., Stolz, J. F., Nord, G. L., und Phillips, E. J. P. (1987) Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* **330:** 252-254.

Lovley, D. R., Woodward, J. C., und Chapelle, F. H. (1994) Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature* **370:** 128-131.

Lovley, D. R., Woodward, J. C., und Chapelle, F. H. (1996b) Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 288-291.

Lüdemann, H. (1999) Bakterielle Besiedlung des Rhizosphärenbodens und der Flutwasser/Boden-Grenzschicht in Reisfeldbodensystemen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Lüdemann, H., Arth, I., und 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.

Ludwig, W. (1995) Sequence databases. S. 1-22. In: *Molecular Microbial Ecology Manual.* Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., und de Bruijn, F. J. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R. *et al.* (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153:** 181-190.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J. *et al.* (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19:** 554-568.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32:** 1363-1371.

Lueders, T. und Friedrich, M. W. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2484-2494.

Lueders, T., Manefield, M., und Friedrich, M. W. (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6:** 73-78.

Lueders, T., Pommerenke, B., und Friedrich, M. W. (2004b) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 5778-5786.

Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., und Friedrich, M. W. (2004c) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* **6:** 60-72.

Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I., und Bailey, M. J. (2002a) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 5367-5373.

Manefield, M., Whiteley, A. S., Ostle, N., Ineson, P., und Bailey, M. J. (2002b) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16:** 2179-2183.

Methe, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F. *et al.* (2003) Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal reduction in subsurface environments. *Science* **302:** 1967-1969.

Minami, K. und Neue, H. U. (1994) Rice paddies as a methane source. *Climatic Change* **27:** 13-26.

Minamikawa, K., Sakai, N., und Yagi, K. (2006) Methane Emission from Paddy Fields and its Mitigation Options on a Field scale. *Microbes Environ.* **21:** 135-147.

Munch, J. C. und Ottow, J. C. G. (1980) Preferential Reduction of Amorphous to Crystalline Iron-Oxides by Bacterial-Activity. *Soil Science* **129:** 15-21.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C. O., und Jannasch, H. W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164:** 165-172.

Myers C. R und Nealson, K. H. (1988) Microbial reduction of manganese oxides interactions with iron and sulphur. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52:** 2727-2732.

Nealson, K. H. und Saffarini, D. (1994) Iron and Manganese in Anaerobic Respiration - Environmental Significance, Physiology, and Regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48:** 311-343.

Neue, H. U. (1993) Methane emission from rice fields. *Bioscience* **43:** 466-474.

Neue, H. U. (1997) Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. *Soil Use Manage.* **13:** 258-267.

Neufeld, J. D., Dumont, M. G., Vohra, J., und Murrell, J. C. (2007) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb. Ecol.* **53:** 435-442.

Nevin, K. P. und Lovley, D. R. (2000a) Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2248-2251.

Nevin, K. P. und Lovley, D. R. (2000b) Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments. *Environmental Science & Technology* **34:** 2472-2478.

Nevin, K. P. und Lovley, D. R. (2002a) Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2294-2299.

Nevin, K. P. und Lovley, D. R. (2002b) Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiology Journal* **19:** 141-159.

Newman, D. K. und Kolter, R. (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* **405:** 94-97.

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

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., und Stahl, D. A. (1986) Microbial ecology and evolution: A ribosomal-RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40:** 337-365.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., und Olsen, G. J. (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal-RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9:** 1-55.

Petrie, L., North, N. N., Dollhopf, S. L., Balkwill, D. L., und Kostka, J. E. (2003) Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium(VI). *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 7467-7479.

Phillips, E. J. P., Lovley, D. R., und Roden, E. E. (1993) Composition of Non-Microbially Reducible Fe(III) in Aquatic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:** 2727-2729.

Ponnamperuma, F. N. (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* **24:** 29-96.

Qu, D., Ratering, S., und Schnell, S. (2004) Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in Paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72:** 1172-1181.

Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., und Murrell, J. C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403:** 646-649.

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

Ratering, S. und Schnell, S. (2000) Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochem.* **48:** 341-365.

Ratering, S. und Schnell, S. (2001) Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. *Environ. Microbiol.* **3:** 100-109.

Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., und Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435:** 1098-1101.

Reiche, M., Torburg, G., und Küsel, K. (2008) Competition of Fe(III) reduction and methanogenesis in an acidic fen. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65:** 88-101.

Ricke, P., Kolb, S., und 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.

Roden, E. E. (2003) Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environmental Science & Technology* **37:** 1319-1324.

Roden, E. E. (2006) Geochemical and microbiological controls on dissimilatory iron reduction. *Comptes Rendus Geoscience* **338:** 456-467.

Roden, E. E. und Urrutia, M. M. (1999) Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* **33:** 1847-1853.

Roden, E. E. und Urrutia, M. M. (2002) Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiology Journal* **19:** 209-251.

Roden, E. E., Urrutia, M. M., und Mann, C. J. (2000) Bacterial reductive dissolution of crystalline Fe(III) oxide in continuous-flow column reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 1062-1065.

Roden, E. E. und Wetzel, R. G. (1996) Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnology and Oceanography* **41:** 1733-1748.

Roden, E. E. und Zachara, J. M. (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology* **30:** 1618-1628.

Rossellomora, R. A., Ludwig, W., Kampfer, P., Amann, R., und Schleifer, K. H. (1995) *Ferrimonas balearica* gen. nov., sp. nov., a new marine facultative Fe(III)-reducing bacterium. *System. Appl. Microbiol.* **18:** 196-202.

Roy, R., Klüber, H. D., und Conrad, R. (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24:** 311-320.

Saitou, N. und Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method - A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* **4:** 406-425.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74:** 5463-5467.

Scheid, D., Stubner, S., und 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. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61:** 262-280.

Schloss, P. D. und Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71:** 1501-1506.

Schnell, S. (1997) Mikrobielle Methanoxidation und Eisenreduktion - Zwei biogeochemische Prozesse von globaler Bedeutung. Habilitation, Philipps-Universität Marburg.

Schwertmann, U. and Cornell, R. M. (2000) *Iron Oxides in the Laboratory.* WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Snoeyenbos-West, O. L., Nevin, K. P., Anderson, R. T., und Lovley, D. R. (2000) Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments. *Microb. Ecol.* **39:** 153-167.

Stackebrandt, E. und Goebel, B. M. (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44:** 846-849.

Stookey, L. L. (1970) Ferrozine - A New Spectrophotometric Reagent for Iron. *Analytical Chemistry* **42:** 779-781.

Straub, K. L., Benz, M., Schink, B., und Widdel, F. (1996) Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 1458-1460.

Thamdrup, B. (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Adv. Microb. Ecol.* **16:** 41-84.

Tor, J. M., Kashefi, K., und Lovley, D. R. (2001) Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:** 1363-1365.

Tor, J. M. und Lovley, D. R. (2001) Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environ. Microbiol.* **3:** 281-287.

Towe, K. M. und Bradley, W. F. (1967) Mineralogical Constitution of Colloidal Hydrous Ferric Oxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **24:** 384-392.

Treude, N., Rosencrantz, D., Liesack, W., und Schnell, S. (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44:** 261-269.

Urrutia, M. M., Roden, E. E., Fredrickson, J. K., und Zachara, J. M. (1998) Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron- reducing bacterium *Shewanella alga*. *Geomicrobiology Journal* **15:** 269-291.

Urrutia, M. M., Roden, E. E., und Zachara, J. M. (1999) Influence of aqueous and solid-phase Fe(II) complexants on microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* **33:** 4022-4028.

van Bodegom, P. M., Scholten, J. C. M., und Stams, A. J. M. (2004) Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49:** 261-268.

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L., und Lovley, D. R. (1998) Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* **395:** 65-67.

Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., und Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81:** 665-680.

Wassmann, R. und Aulakh, M. S. (2000) The role of rice plants in regulating mechanisms of methane missions. *Biol. Fertil. Soils* **31:** 20-29.

Wassmann, R. und Rennenberg, H. (1996) Die Methanemission aus Reisfeldern. *Biologie in unserer Zeit* **26:** 272-281.

Weber, K. A., Urrutia, M. M., Churchill, P. F., Kukkadapu, R. K., und Roden, E. E. (2006a) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ. Microbiol.* **8:** 100-113.

Weber, K. A., Achenbach, L. A., und Coates, J. D. (2006b) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Micro.* **4:** 752-764.

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

Whiteley, A. S., Manefield, M., und Lueders, T. (2006) Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17:** 67-71.

Widdel, F., Schnell, S., Heising, S., Ehrenreich, A., Assmus, B., und Schink, B. (1993) Ferrous Iron Oxidation by Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Nature* **362:** 834-836.

Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51:** 221-271.

Woese, C. R. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 8392-8396.

Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R., und Neue, H. U. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47:** 269-295.

Zachara, J. M., Fredrickson, J. K., Li, S. M., Kennedy, D. W., Smith, S. C., und Gassman, P. L. (1998) Bacterial reduction of crystalline Fe^{3+} oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* **83:** 1426-1443.

Zehnder, A. J. B. und Stumm, W. (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. S. 1-38. In: *Biology of anaerobic microorganisms.* Zehnder, A. J. B. (Hrsg.). Wiley, New York.

Zinder, S. H. (1993) Physiological ecology of methanogens. S. 128-206. In: *Methanogenesis*. Ferry, J. G. (Hrsg.). Chapman & Hall, New York, N.Y.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael W. Friedrich für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Professor Dr. W. Buckel möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Herrn Professor Dr. M. Bölker und Herrn Professor Dr. P. Galland danke ich für Ihr Einverständnis, Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Ein herzliches Dankeschön geht an Bianca Pommerenke für ihre kompetente Einführung in die molekularbiologischen Methoden und ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ohne ihren ansteckenden Humor und die vielen aufmunternden Worte wäre die Zeit nur halb so schön gewesen.

Meiner Arbeitsgruppe (auch den Ehemaligen) danke ich für eine unvergessliche Zeit und die vielen lustigen Stunden auch außerhalb des Labors. Maike Fuhr danke ich zusätzlich für die gute Zusammenarbeit an unserem Thema. Ein besonderes Dankeschön geht an meine ehemalige Kollegin Sandra Kittelmann, die mich auch vom anderen Ende der Welt unterstützt hat.

Jana Glöckner danke ich ganz herzlich für ihre Freundschaft, die netten Gespräche, jegliche Ablenkungen von der Wissenschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit .

Der gesamten Abteilung Biogeochemie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Melanie Klose für ihre kompetente Hilfe bei analytischen Fragen und Peter Claus für die GC-c-IRMS-Analysen.

Ich danke meinen Freunden, insbesondere Eva und Charlott, die in den letzten Jahren meine Launen ertragen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern danke ich von ganzem Herzen für ihre fortwährende Unterstützung, und dafür, dass sie in jeder Lebenslage zu mir stehen und für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Alexandra Müller
Geburtsdatum:	13. November 1980
Geburtsort:	Lich, Hessen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/1987 – 06/1991	Grundschule Langsdorf
08/1991 – 07/1997	Dietrich-Bonhoeffer-Schule, Lich; Gymnasialzweig
09/1997 – 06/2000	Gesamtschule Hungen Abschluss: Abitur

Studium

10/2000 – 07/2002	Eberhard Karls Universität Tübingen **Grundstudium der Biologie** Abschluss: Vordiplom
10/2002 – 09/2005	Phillips-Universität Marburg **Hauptstudium der Biologie** Abschluss: Diplom-Biologin
11/2004 – 09/2005	Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg (Abteilung Biogeochemie) **Diplomarbeit:** Charakterisierung der acetogenen Bakteriengemeinschaft in Reiswurzelinkubationen mit Hilfe des funktionellen Markergens Formyltetrahydrofolat-Synthetase

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Identifizierung eisenreduzierender Mikroorganismen in anoxischem Reisfeldboden mit Hilfe stabiler Isotope“

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

Marburg, im April 2009

_____

Alexandra Müller