



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6971

# **Nachweis, Lokalisation und Quantifizierung von autotrophen Nitrifizierern im Kronenraum der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)**

**M. Teuber**

**Institut für Meteorologie und Klimaforschung**

**Juni 2004**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6971

**Nachweis, Lokalisation und Quantifizierung  
von autotrophen Nitrifizierern im Kronenraum  
der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)**

**Markus Teuber**

**Institut für Meteorologie und Klimaforschung**

von der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2004

Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH**  
**Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-069714



**Nachweis, Lokalisation und Quantifizierung von  
autotrophen Nitrifizierern im Kronenraum  
der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

vorgelegt von

Markus Teuber

Freiburg im Breisgau  
2003

Dekan: Prof. Dr. K.-R. Volz  
Referent: PD Dr. habil. H. Papen  
Korreferent: Prof. Dr. S. Fink  
Betreuer: Dr. R. Gasche

## Zusammenfassung

### Nachweis, Lokalisation und Quantifizierung von autotrophen Nitrifizierern im Kronenraum der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)

Die Gruppe der chemolithoautotrophen Nitrifizierer umfaßt Gram-negative, licht- und säureempfindliche, obligat aerobe Bakterien, die ihren Zellkohlenstoff durch die Fixierung von Kohlendioxid und die hierfür notwendige Energie aus der Oxidation anorganischer Stickstoffverbindungen, insbesondere Ammoniak und Nitrit, gewinnen. Als bisherige Lebensräume wurden die Pedo-, Hydro-, Litho- und Phyllosphäre identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es durch den Einsatz modernster molekularbiologischer Techniken erstmalig auf genetischer Ebene, die autotrophen Nitrifizierer unmittelbar im Nadelblatt-Apoplasten von Fichten des durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteten Standortes „Höglwald“ direkt nachzuweisen und zu lokalisieren. Durch den Einsatz der hochspezifischen PCR-Technik in Verbindung mit der Sequenzierung des genetischen Materials aus dem Kronenbereich der Fichten konnten die Nitrifizierer genetisch direkt nachgewiesen und klassifiziert werden. Die exakte Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer unmittelbar im Fichtennadel-Apoplasten gelang, ebenfalls auf genetischer Ebene, weltweit erstmalig mit Hilfe der molekularbiologischen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungstechnik in Kombination mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop (cLSM). Anhand der Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer über die klassische, mikrobiologische Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl, der sog. „Most Probable Number“-Technik (MPN-Technik), konnten Ammoniak-Oxidierer in einer Größenordnung von  $10^{3-5}$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und Nitrit-Oxidierer mit  $10^{3-4}$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht am Standort „Höglwald“ nachgewiesen werden. An einem durch Stickstofflimitierung gekennzeichneten Fichtenstandort bei Villingen wurden in vergleichenden Untersuchungen autotrophe Nitrifizierer zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen, was darauf schließen läßt, daß die Besiedlung der Fichtenphyllosphäre, insbesondere des Nadelblatt-Apoplasten, durch autotrophe Nitrifizierer an die Stickstoffbelastung der Umgebung gekoppelt sein muß. Eine saisonale Veränderung der Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten durch Nitrifizierer am Standort „Höglwald“ konnte nicht beobachtet werden. Um erste Hinweise über den eigentlichen Besiedlungsweg zu erhalten, wurden im Labor unter sterilen Bedingungen sowohl mit Ammoniak als auch mit Luft begaste sterile Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierer-Kulturen inokuliert. Eine erfolgreiche Etablierung autotropher Nitrifizierer in der Phyllosphäre der Fichtenkeimlinge gelang nicht bei einmaliger, wohl aber nach wiederholter Inokulation.

## Abstract

### **Detection, localisation and quantification of autotrophic nitrifiers within the canopy of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.)**

The group of chemolithoautotrophic nitrifiers contains Gram-negative, light and acid sensitive, obligate aerobic bacteria, which use carbon dioxide-fixation for gaining cell carbon and use oxidation of inorganic nitrogen compounds, especially ammonia and nitrite, as energy sources. Hitherto identified habitats for nitrifiers were the pedo-, hydro-, litho- and phyllosphere. In this work, by application of the most advanced molecular biological methods it could be unequivocally demonstrated at the genetic level for the first time that autotrophic nitrifiers are present inside spruce needles of a spruce forest ecosystem (The "Höglwald") which is exposed to high levels of atmospheric nitrogen deposition and that they are located within the apoplastic space of the needle leaves (sub-stomatal cavity). By application of the highly specific PCR-technique in conjunction with the sequencing of the genetic material from the canopy of spruce the nitrifiers could be directly genetically verified and classified. The exact localisation of the autotrophic nitrifiers directly within the apoplast of spruce needles at the genetic level succeeded for the first time via the combination of both, the molecular biological fluorescence-*in situ*-hybridization-technique with the modern technique of confocal laser scanning microscopy (cLSM). Quantification of cell numbers of autotrophic nitrifiers was carried out using the „Most Propable Number“ (MPN)-technique. At the „Höglwald“ experimental site ammonia-oxidizers were founded with  $10^{3-5}$  cells g<sup>-1</sup> needle freshweight and nitrite-oxidizers with  $10^{3-4}$  cells g<sup>-1</sup> needle freshweight. In contrast, at a spruce forest site (near the city of Villingen), which is exposed to low levels of atmospheric nitrogen deposition, nitrifiers were never detected. It is concluded that the colonization of the needle apoplast by autotrophic nitrifiers is related to elevated levels of atmospheric N-deposition the Höglwald experimental site is exposed to. A seasonal pattern of the colonization of the needles by nitrifiers at the „Höglwald“ could not be demonstrated to exist. For gaining first insights into the pathway by which needles might be colonized by autotrophic nitrifiers, sterile spruce seedlings, fumigated with both ammonia and air, were inoculated in the laboratory with nitrifier cultures. However, a succesful establishment of the autotrophic nitrifiers in the phyllosphere of the spruce seedlings could not be achieved by a single inoculation event, however was successful after multiple inoculations.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Chemolithoautotrophe Nitrifizierer</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Autotrophe Nitrifikation und ihre ökologische Bedeutung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Autotrophe Nitrifizierer in der Phyllosphäre von Fichten</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Untersuchungsstandorte</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 Höglwald – ein durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteter Standort .....	9
2.1.2 Villingen – ein durch Stickstofflimitierung gekennzeichneter Standort .....	10
<b>2.2 Unter Laborbedingungen herangezogene Fichtenkeimlinge</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Untersuchungszeitraum und Probenahme</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 Charakterisierung der Fichtennadeln</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6 Herkunft und Anzucht der verwendeten Bakterienstämme</b> .....	<b>15</b>
	<b>III</b>

2.6.1 Mikroorganismen .....	15
2.6.2 Nährmedien .....	15
2.6.2.1 LB-Medium (Luria-Bertani) für <i>E. coli</i> TG1 .....	15
2.6.2.2 Glucose-Hefeextrakt-Medium für <i>Rhodococcus rhodochrous</i> .....	16
2.6.2.3 Medium für <i>Nitrosomonas europaea</i> .....	16
2.6.2.4 Medium für <i>Nitrobacter winogradskyi</i> .....	17
2.6.2.5 Medium für Ammoniak-Oxidierer in den MPN-Ansätzen und die Nitrifizierer-Mischkultur aus dem Höglwald .....	17
2.6.2.6 Medium für Nitrit-Oxidierer in den MPN-Ansätzen .....	18
2.6.3 Herstellung der Medien .....	19
2.6.4 Kulturformen .....	19
2.6.5 Bestimmung der Wachstumsparameter .....	20
2.6.5.1 Messung der Optischen Dichte .....	20
2.6.5.2 Gesamtzellzahlen .....	20
2.6.5.3 pH-Wert .....	21
2.6.5.4 Konzentration der Nitrit-Ionen .....	22
2.6.5.5 Nitrat-Ionen-Konzentration .....	23
2.6.5.6 Protein-Konzentration .....	25
2.6.6 Reinheitskontrolle und Stammhaltung .....	27
2.6.7 Inokulation der Fichtenkeimlinge .....	28
<b>2.7 Keimzahlbestimmung mit der „Most Probable Number“-Technik .....</b>	<b>29</b>
2.7.1 „Most Probable Number“-Technik .....	29
2.7.2 Ansatz und Kultivierung .....	29
2.7.2.1 Aufarbeitung der Fichtennadel-Proben .....	29
2.7.2.2 Kulturbedingungen der MPN-Ansätze .....	30
2.7.3 Keimzahlbestimmung .....	30
2.7.3.1 Chemische Nachweise der Stoffwechsellendprodukte .....	30
2.7.3.2 Statistische Auswertung .....	31
<b>2.8 Detektion der autotrophen Nitrifizierer über die Polymeraseketten-Reaktion .....</b>	<b>33</b>
2.8.1 Nukleinsäure-Isolierungen .....	33
2.8.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien .....	33
2.8.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Fichtennadeln .....	35
2.8.1.3 Reinigung und Konzentration der genomischen DNA .....	35

2.8.2 Die Polymeraseketten-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Abschnitten .....	36
2.8.2.1 Auswahl der Oligodesoxynukleotide für die PCR .....	36
2.8.2.2 PCR-Anwendungen .....	39
2.8.2.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate .....	40
2.8.3 Charakterisierung von Nukleinsäuren .....	41
2.8.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren	41
2.8.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit .....	43
2.8.4. Klonierung der PCR-Amplifikate .....	44
2.8.4.1 Ligation .....	44
2.8.4.2 Transformation .....	45
2.8.4.3 Selektion der positiven Klone .....	45
2.8.4.4 Plasmid-Isolierung .....	46
2.8.4.5 Restriktion .....	47
2.8.5 Sequenzierung der PCR-Amplifikate .....	48
2.8.5.1 Sequenzierungsansatz .....	48
2.8.5.2 Aufreinigung des Sequenzierungsansatzes .....	49
2.8.5.3 Durchführung der Sequenzierung .....	50
2.8.5.4 Datenanalyse der Sequenzierung .....	50
<b>2.9 Nachweis der Nitrifizierer mit der Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierungs-Technik</b>	
<b>und dem konfokalem Laserrastermikroskop .....</b>	<b>51</b>
2.9.1 Verwendete Oligodesoxynukleotid-Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe .....	52
2.9.1.1 Oligodesoxynukleotid-Sonden .....	52
2.9.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe .....	53
2.9.2 Hybridisierung von Bakterienzellen .....	53
2.9.2.1 Konservierung der Bakterien .....	53
2.9.2.2 Fixierung der Zellen auf Objektträger .....	54
2.9.2.3 Vorbehandlung der Zell-Präparate .....	54
2.9.2.4 Hybridisierung der Bakterienzellen .....	55
2.9.3 <i>in situ</i> -Hybridisierung des Fichtennadel-Gewebes .....	56
2.9.3.1 Konservierung des Pflanzengewebes .....	56
2.9.3.2 Einbettung und Schnitt des Pflanzenmaterials .....	57
2.9.3.3 Fixierung der Präparate auf Objektträger .....	58
2.9.3.4 Vorbehandlung der Nadelpräparate .....	59
2.9.3.5 Hybridisierung der Fichtennadel-Längsschnitte .....	59
2.9.4 Waschen der Präparaten .....	60

2.9.5 Mehrfachnachweis .....	61
2.9.6 Gegenfärbung .....	62
2.9.6.1 Färbung mit DAPI .....	62
2.9.6.2 Antibleichmittel .....	62
2.9.7 Mikroskopische Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop .....	63
2.9.7.1 Funktionsweise .....	63
2.9.7.2 Bilderstellung und –bearbeitung .....	66
2.9.7.3 Auswertung .....	67
<b>2.10 Geräte, Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>68</b>
2.10.1 Geräte .....	68
2.10.2 Gase und Chemikalien .....	69
2.10.3 Biochemikalien .....	70
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Fichtennadelblätter .....</b>	<b>71</b>
3.1.1 Maße der Fichtennadelblätter .....	71
3.1.2 Erscheinungsbild der Fichtennadeln .....	74
3.1.2.1 Äußeres Erscheinungsbild .....	75
3.1.2.2 Nadelblatt-Oberfläche .....	76
3.1.2.3 Nadelblatt-Apoplast .....	79
<b>3.2 Etablierung der Nachweismethoden .....</b>	<b>82</b>
3.2.1 Optimierung mit Hilfe der Bakterienkulturen .....	82
3.2.1.1 Auswahl der Oligodesoxynukleotide .....	82
3.2.1.2 PCR-Testreihen der ausgewählten Oligodesoxynukleotide .....	90
3.2.1.3 Kontrolle der PCR-Amplifikate durch Sequenzierung .....	93
3.2.1.4 MPN-Ansätze und Kontrolle mit Hilfe der PCR-Technik .....	102
3.2.1.5 Validierung der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	106
3.2.2 Testreihen mit künstlich mit Bakterien inokulierten Fichtennadelproben .....	121
3.2.2.1 PCR-Versuchsreihen der Fichtennadelproben mit Bakterien .....	121



3.2.2.2 MPN-Ansätze und Kontrolle über die PCR-Technik .....	125
3.2.2.3 Überprüfung der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung in Fichtennadeln ..	130
<b>3.3 Nachweis der autotrophen Nitrifizierer in Fichtennadeln .....</b>	<b>136</b>
3.3.1 Untersuchung der Proben der Standorte Höglwald und Villingen .....	136
3.3.1.1 Indirekter Nachweis über die MPN-Technik .....	137
3.3.1.2 Direkter Nachweis in den Fichtennadelproben .....	152
3.3.1.3 Lokalisation und direkter Nachweis im Fichtennadel-Apoplasten .....	158
3.3.1.4 Quantifizierung autotropher Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten .....	178
3.3.2 Hinweise zum Besiedlungsvorgang des Apoplasten bei Fichtenkeimlingen .....	179
3.3.2.1 Untersuchung der Fichtenkeimlinge über die MPN-Technik .....	180
3.3.2.2 Mikroskopische Untersuchungen der Fichtenkeimlinge .....	197
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>206</b>
<b>4.1 Anforderungen der autotrophen Nitrifizierer an ihre Umwelt .....</b>	<b>206</b>
<b>4.2 Existenz autotropher Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten .....</b>	<b>210</b>
4.2.1 Nachweis der autotrophen Nitrifizierer .....	210
4.2.2 Exakte Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer .....	218
4.2.3 Quantifizierung .....	222
<b>4.3 Ökologische Betrachtungen .....</b>	<b>225</b>
4.3.1 Auswirkungen unterschiedlicher Stickstoffbelastungen .....	225
4.3.2 Saisonale Entwicklung .....	226
<b>4.4 Erste Anhaltspunkte zum Besiedlungsvorgang des Fichtennadel-Apoplasten ....</b>	<b>227</b>
<b>4.5 Ausblick .....</b>	<b>232</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>234</b>

<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	236
-------------------------------------	-----

## Abkürzungsverzeichnis

A	Stromstärke Ampere	CoCl <sub>2</sub>	Kobaltchlorid
A	Nukleotidbase Adenin	CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Abb.	Abbildung		
AG	Aktiengesellschaft	Cu <sup>2+</sup>	Kupfer-Ionen
AO	Ammoniak-Oxidierer	CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikanische Stammkultur-Sammlung)	d	Küvettschichtdicke
		DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
β	beta	ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	ΔG <sup>o</sup>	Änderung der freien Energie zu Standardbedingungen bei einem pH-Wert von pH = 7,0
b	Breite	vgl.	dergleichen
bar	Druckeinheit	d.h.	daß heißt
bes.	besonders	DNA	Desoxyribonukleinsäure
bp	Basenpaar(e)	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
BP	Bandpaßfilter	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
BSA	Bovine serum albumine (eng.: Rinderserumalbumin)		
BTG	Bodentrockengewicht		
bzgl.	bezüglich		
bzw.	beziehungsweise		
°C	Grad Celsius		
C	Kohlenstoff	e <sup>-</sup>	Elektron
C	Nukleotidbase Cytosin	<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
c	Konzentration	<i>EcoR</i> I	Gen einer Restriktions-Endonuklease aus <i>Escherichia coli</i>
ca.	circa		
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat		
cLSM	confocal Laser Scanning Microscope (eng.: konfokales Laserrastermikroskop)	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
cm	Zentimeter	entspr.	entsprechender
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	et al.	et alii (lat.: und andere)
		etc.	et cetera

## Abkürzungsverzeichnis

---

evtl.	eventuell	Jhd.	Jahrhundert
F	Multiplikationsfaktor	k	Kilo
FeSO <sub>4</sub>	Eisensulfat	Karst.	Karsten, G. K.
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	kb	Kilobasenpaar(e)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat	KCl	Kaliumchlorid
		KG	Kommanditgesellschaft
γ	Gamma	kg	Kilogramm
G	Nukleotidbase Guanin	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat
g	Gramm	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Gebr.	Gebrüder	km	Kilometer
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	kV	Kilovolt
		L	L-Stereoisomer eines Proteins
h	Höhe	L.	Linnaeus
h	Stunde	λ	Wellenlänge
ha	Hektar	l	Länge
<i>hamburg.</i>	<i>(N.) hamburgensis</i>	l	Liter
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Proton	LB	Luria-Bertani
HCl	Salzsäure	LP	Langpaßfilter
HFT	Hauptfarbteiler	Ltd.	Limited company (eng.: GmbH)
HNO <sub>2</sub>	salpetrige Säure		
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure		
H <sub>2</sub> O <sub>(bidest.)</sub>	(bidestilliertes) Wasser	μ	Mikro
		M	Mol pro Liter / molar
i. Brsg.	im Breisgau	M	Platzhalter für die Base
i.d.R.	in der Regel		Adenin (A) oder Cytosin (C)
IMK-IFU	Institut für Meteorologie und Klimaforschung - Bereich Atmosphärische Umweltforschung	m	Meter
		m <sup>2</sup>	Quadratmeter
		m <sup>3</sup>	Kubikmeter
Inc.	Incorporated (am.: Aktiengesellschaft)	mg	Miligramm
		MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>in situ</i>	vor Ort	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
<i>in vitro</i>	künstlich	min	Minute
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	mind.	mindestens
		ml	Milliliter
J	Joule	mm	Millimeter

MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid	NH <sub>2</sub> OH	Hydroxylamin
mol	Stoffmenge (6,023 x 10 <sup>23</sup> Teilchen)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
MPN	Most Probable Number (eng.: höchstwahrscheinliche Keimzahl)	nm	Nanometer
		N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
<i>N.</i>	<i>Nitrosomonas / Nitrobacter / Nitrosospira</i>	NO	Nitrit-Oxidierer
		NO	Stickstoffmonoxid
N	Stickstoff	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ionen
N	Platzhalter für die Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) oder Cytosin (C)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	Nitrat-Stickstoff
		NO <sub>x</sub>	Stickstoffoxide
		Nr.	Nummer
N	Normalität	NTG	Nadelrockengewicht
n	Anzahl		
n	Nano	O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
NaCl	Natriumchlorid	OD	Optische Dichte
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat		
NAD <sup>+</sup>	positiv geladenes Nicotinsäureamid- adeninucleotid (Coenzym)	Pa	Pascal
NADP <sup>+</sup>	positiv geladenes Nicotinsäureamid- adeninucleotid-phosphat (Coenzym)	PBS	Phosphate-buffered saline (eng.: Phosphat-gepufferte Salzlösung)
		PCR	Polymerasekettenreaktion
NaEDTA	Natriumsalz des Ethylendinitrilo- tetraessigsäure	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen- konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat	ppm	parts per million (eng.: Teilchen pro Millionen [10 <sup>-6</sup> ])
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat		
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit		
NaOH	Natriumhydroxid	<i>R.</i>	<i>Rhodococcus / Rhodopseu- domonas</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information	R	Platzhalter für die Base
NCIMB	The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Britische Stammkultur-Sammlung)	rDNA	Adenin (A) oder Guanin (G) DNA-Gen für ein Ribosom
		RNA	Ribonukleinsäure
NFT	Nebenfarbteiler	RNase	Ribonuklease
NH <sub>3</sub>	Ammoniak	(5-)ROX	(5-)carboxy-X-rhodamin
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Ionen	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Ammonium-Stickstoff		

## Abkürzungsverzeichnis

---

s	Sekunde	VIS	„visible“, sichtbarer Bereichs
s.	siehe		des Lichts
S.	Seite	Vol.	Volumen
S	Svedberg-Einheit	v/v	Volumen pro Volumen
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sec	Sekunde	W	Platzhalter für die Basen
s.o.	siehe oben		Adenin (A) oder Thymin (T)
sog.	sogenannten	w/v	Masse pro Volumen
sp	species (alle Arten einer Gattung sind gemeint)	wino.	(N.) <i>winogradskyi</i>
SSC	Sodiumchloride-Sodiumcitrate-Buffer (eng.: Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)	x	x-Vektor
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
STE	Saccharose-Tris-EDTA-Puffer	y	y-Vektor
Std.	Größenstandard	y	year (eng.: Jahr)
T	Nukleotidbase Thymin	z	z-Vektor
Tab.	Tabelle	z.B.	zum Beispiel
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat
<i>Taq</i>	Gen einer DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	z.T.	zum Teil
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer	°	Grad
™	Warenzeichen	'	Minute
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	&	und
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	%	Prozent
		®	Eingetragenes Warenzeichen
U	Umdrehung		
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)		
u.	und		
u.a.	unter anderem		
ü. NN	über Normalnull		
USA	Vereinigten Staaten von Amerika		
UV	Ultraviolett		
V	Stromspannung Volt		
V	Verdünnungsfaktor		
vgl.	vergleiche		
XII			

# 1 Einleitung

Die höheren Pflanzen sind mit einer Vielzahl von Mikroorganismen sowohl in der Phyllosphäre (JACQUES et al., 1995) als auch in der Rhizosphäre (BÅÅTH et al., 1988) besiedelt (DOMMERGUES, 1977; HIRANO & UPPER, 2000). Dabei treten zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen und den höheren Pflanzen auf. Besiedeln die Mikroorganismen die Oberflächen der Pflanzen, werden sie als epiphytisch bezeichnet. Dazu zählen auch die Mikroorganismen, welche die substomatären Kammern und Interzellularen der Pflanze besiedeln (PARBERY et al., 1981; JACQUES & MORRIS, 1995; HIRANO & UPPER, 2000). Daneben gibt es Mikroorganismen, die innerhalb von Pflanzenzellen vorkommen. Sie werden als Endophyten bezeichnet (DAVIS et al., 1981; CARROL, 1988; JACQUES & MORRIS, 1995). Der Einfluß der Epi- oder Endophyten auf die Pflanzen reicht von der echten Symbiose der Gattung *Rhizobium* bis zum Parasitismus des Mehltaus (SCHLOTER et al., 1997; BURCHILL, 1978). Neben den Blättern der Laubbäume sind die Mikroorganismen auch auf Nadelblättern zu finden (MILLAR, 1981; STADLER & MÜLLER, 2000). Im Gegensatz zu den Laubblättern ist bei den Nadelblättern die Blattoberfläche deutlich kleiner, und die starke Wachsaufgabe, die das Pflanzengewebe vor hoher Wasserverdunstung schützt, beeinträchtigt die Kolonisierung mit epiphytischen Mikroorganismen (PREECE & DICKINSON, 1971; SCHREIBER, 1996). Die Zahl der Stellen, an denen sich Mikroorganismen auf den Nadelblättern festsetzen können, wie z.B. Blattadern, ist im Vergleich zu den Laubblättern erheblich reduziert. Die Nadeln stellen daher einen selektiven Besiedlungsraum für Mikroorganismen dar (MISHRA & DAS, 1981). Allerdings verbleiben die Nadelblätter im Gegensatz zu den Laubblättern länger am Baum und stehen daher für eine Besiedlung deutlich länger zur Verfügung (STRASBURGER, 1991). Zahlreiche Gram-negative und nichtfilamentäre Gram-positive Bakterien, Hefen, filamentäre Pilze, Mykoplasmen, Actinomyceten und Algen sind in der Phyllosphäre von Pflanzen registriert worden (JACQUES & MORRIS, 1995). Auf Nadelblättern sind etwa 50 Gattungen verschiedener Bakterien, Pilze und Hefen identifiziert worden (MILLAR, 1981). Gewöhnlich besiedeln zuerst die Bakterien die Blätter, während später Hefen und Pilze dominieren (JACQUES & MORRIS, 1995). Die Zusammensetzung der Besiedlungsarten hängt dabei sehr von der jeweiligen Pflanze, der Lage der Blätter und den Umweltbedingungen ab (JACQUES et al., 1995). So ist z.B. die Besiedlung der Nadelblattoberfläche mit Mikroorganismen an der Nadelbasis signifikant höher als an der Nadelspitze und steigt mit zunehmendem Alter der Nadel an (SCHREIBER & SCHÖNHERR, 1993). Während bisher hauptsächlich heterotrophe Bakterien, Pilze und Hefen in der Phyllosphäre nachgewiesen worden sind (JACQUES & MORRIS, 1995), gibt es erste Hinweise, daß die Blattflächen auch mit chemolithoautotrophen Nitrifizierern besiedelt sind. So konnte HEUSER (2002) auf der Oberfläche von Blättern der Stieleiche (*Quercus robur* L.) autotrophe Nitrit-Oxi-

dierer mit Zellzahlen von  $10^3$ - $10^4$  Zellen  $m^{-2}$  Blattfläche detektieren. PAPEN et al. (2002) gelang der Nachweis von autotrophen Nitrifizierern in der Phyllosphäre von Fichten, jedoch blieb unklar, ob diese Bakterien die Blattoberfläche oder aber sogar das Nadelblattinnere besiedeln.

### 1.1 Chemolithoautotrophe Nitrifizierer

Die ersten Untersuchungen über autotrophe Nitrifizierer stammten vom russischen Forscherhepaar Winogradsky Ende des 19. Jhd. (WATSON et al., 1989). Durch entsprechende Versuche und die Anzucht von Bakterien in einem rein anorganischen Medium konnten Winogradsky aufzeigen, daß es sich um chemolithoautotrophe Nitrifizierer handelt, die ihre Energie zum Leben aus der Oxidation anorganischer Stickstoffverbindungen gewinnen und den Zellkohlenstoff aus der Fixierung von Kohlendioxid ( $CO_2$ ) beziehen. Es konnten sowohl Ammoniak-oxidierende als auch Nitrit-oxidierende Bakterien isoliert werden. Damit wurden zugleich erste Hinweise auf den Dualismus des Stickstoffumsatzes über die Nitrifikation aufgezeigt (WINOGRADSKY, 1891). Die chemolithoautotrophen Nitrifizierer bilden eine sehr diverse Gruppe stäbchen-, vibrio-, kokken- und spirillenförmiger Bakterien, die polar oder peritrich begeißelt sein können. Sie weisen einen Gram-negativen Zellwandaufbau auf, und zahlreiche Stämme besitzen im Zellinneren ein sehr komplex angeordnetes, intracytoplasmatisches Membransystem. Alle Stämme sind obligat auf aerobe Bedingungen angewiesen, vertragen aber auch z.T. niedrige Sauerstoffkonzentrationen (WATSON et al., 1989). Die Vertreter der Ammoniak-Oxidierer sind als Nitritproduzenten durch das Präfix *Nitroso-* gekennzeichnet. Die Nitrit-Oxidierer tragen als Nitratproduzenten das Präfix *Nitro-*. Die Nitrifizierer wurden in der Vergangenheit aufgrund ihres übereinstimmenden Stoffwechsels zur Ordnung der *Nitrobacteraceae* zusammengefaßt (WATSON et al., 1989). Neuere phylogenetische Untersuchungen anhand des Gens für das 16S rRNA-Molekül haben jedoch ergeben, daß es sich bei den autotrophen Nitrifizierern taxonomisch gesehen um eine sehr heterogene Gruppe handelt, die verschiedenen Stämmen bzw. Untergruppen der *Proteobacteria* zugeordnet wird. Die Nitrifizierer sind phylogenetisch also nicht direkt miteinander verwandt (WOESE et al., 1984 a, b). Die Ammoniak-Oxidierer werden derzeit folgenden Gattungen zugeordnet: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* und *Nitrosococcus*. *Nitrosomonas* und *Nitrosospira* werden in die Klasse der  $\beta$ -*Proteobacteria* eingruppiert, *Nitrosococcus* in die Klasse der  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Die Gattung *Nitrosovibrio* wurde der Gattung *Nitrosospira* zugefügt. Die Gattungen *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* und *Nitrospina* beherbergen die Nitrit-Oxidierer (GARRITY, 2001). Nitrifizierende Bakterien sind in aeroben Lebensräumen zu finden, in denen organisches Material mineralisiert wird, so im Boden, Süß-, Brack- und Salzwasser sowie in Abwassersystemen (WATSON et al., 1981). Bisher wurden autotrophe Nitrifizierer in der Pedo-, Hydro- und Lithosphäre nachgewiesen (BOCK et al., 1987). Besonders die artenreichen Gattun-

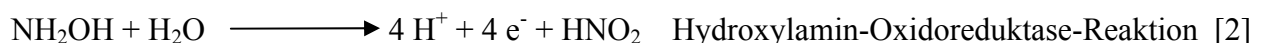


gen *Nitrosospira* und *Nitrosomonas* sind weit verbreitet und treten überwiegend im Boden oder in Gewässern auf. Bei den Nitrit-Oxidierern ist bisher nur die Gattung *Nitrobacter* auf dem Land anzutreffen, die übrigen Gattungen beherbergen Arten, die aus Gewässern isoliert wurden (WATSON et al., 1989). Die Besonderheit der autotrophen Nitrifizierer liegt in ihrer Fähigkeit, als bisher einzige Bakteriengruppe in großen Mengen Ammoniak bzw. Nitrit zu verstoffwechseln (WATSON et al., 1989). Obwohl noch heterotrophe Bakterien und Pilze dazu in der Lage sind, bilden diese nur sehr wenig Nitrit bzw. Nitrat und verwenden hauptsächlich organische statt anorganische Stickstoffquellen als Substrat. Als einzige Lebewesen sind die autotrophen Nitrifizierer befähigt, aus der Verstoffwechslung von Ammoniak bzw. Nitrit Energie zu gewinnen und besetzen damit eine Nische im natürlichen Stoffwechselgeschehen (FOCHT & VERSTRAETE, 1977). Ihr Wachstum wird in der Natur durch die Verfügbarkeit des Substrates, die Temperatur, den pH-Wert und die Sauerstoffverfügbarkeit geregelt. Die Nitrifizierer sind sehr lichtempfindlich (WATSON et al., 1981). Ihren Zellkohlenstoff gewinnen die Nitrifizierer aus der Fixierung von CO<sub>2</sub> aus der Luft über den Calvin-Benson-Zyklus. Die notwendige Energie hierfür gewinnen sie aus der Oxidation von Ammoniak (Ammoniak-Oxidierer) bzw. Nitrit (Nitrit-Oxidierer) (BOCK et al., 1992). Der chemische Umsetzungsprozeß dieser Stickstoffverbindungen zur Energiegewinnung wird chemolithoautotrophe Nitrifikation genannt (WATSON et al., 1981).

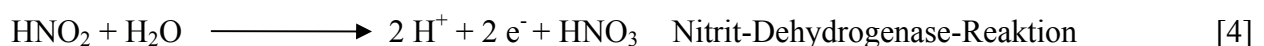
## 1.2 Autotrophe Nitrifikation und ihre ökologische Bedeutung

Der in der Natur vorkommende anorganische Stickstoff der Oxidationsstufe –3 im Ammoniak wird in der chemolithoautotrophe Nitrifikation auf die Oxidationsstufe +5 im Nitrat-Ion oxidiert. Dieser chemische Umsetzungsprozeß verläuft in zwei Teilschritten. Der erste Schritt besteht in der Umsetzung von Ammoniak zu Nitrit durch die Ammoniak-Oxidierer, im zweiten Schritt wird das Nitrit zu Nitrat durch die Nitrit-Oxidierer aufoxidiert (BOCK et al., 1987, 1992):

### 1. Autotrophe Ammoniak-Oxidation:



### 2. Autotrophe Nitrit-Oxidation:



Beide Bakteriengruppen sind auf die jeweiligen chemischen Umsetzungsprozesse streng spezialisiert. Der energieliefernde Schritt bei den Ammoniak-Oxidierern besteht in der Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit, während die Nitrit-Oxidierer die Energie aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat erhalten (WATSON et al., 1989). Bei den Ammoniak-Oxidierern beträgt der Energiegewinn  $\Delta G^{\circ} = -267 \text{ kJ mol}^{-1}$  Ammoniak (MONTUELLE et al., 1996), bei den Nitrit-Oxidierern  $\Delta G^{\circ} = -71 \text{ kJ mol}^{-1}$  Nitrit (WATSON et al., 1998) - zum Energiegewinn aus dem heterotrophen Stoffwechsel mit  $\Delta G^{\circ} = -2870 \text{ kJ mol}^{-1}$  Glucose (STRASBURGER et al., 1991) vergleichsweise wenig. Zudem müssen für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  bzw.  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  produziert werden, wobei zusätzlich Energie aus dem Stoffwechsel abgezogen wird (SMITH et al., 1967; KIESOW et al., 1977; WILLIAMS & WATSON, 1968). Folglich steht den Nitrifizierern wenig Energie zum Zellaufbau zur Verfügung, und die Generationszeiten betragen 8 h bis mehrere Tage (ROTTHAUWE et al., 1997). Um diesen Nachteil auszugleichen, müssen die autotrophen Nitrifizierer innerhalb kurzer Zeit sehr viel Substrat umsetzen, was zur Folge hat, daß die Stoffwechselendprodukte in Form von salpetriger Säure ( $\text{HNO}_2$ ) bzw. Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) sich in der Umgebung der Nitrifizierer sehr schnell und in hohen Konzentrationen anreichern (BOCK et al., 1987). Durch diese Stoffwechselaktivität sind die autotrophen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer auf Grund ihrer Säureproduktion für Versauerungsschübe in Böden und Gewässern verantwortlich. Ferner wurde nachgewiesen, daß die Säureproduktion durch die Nitrifizierer auch die biogene Korrosion von historischen Gebäuden, wie z.B. die Torhalle in Lorsch, und sogar von Betonbauten, wie z.B. Autobahnbrücken, verursacht (MANSCH et al., 1999). Darüberhinaus produzieren autotrophe Nitrifizierer die primär und sekundär klimawirksamen Spurengase Stickstoffmonoxid (NO) und Lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ ) und stellen damit eine bedeutende biogene Quelle für diese Gase dar (GOREAU et al., 1980; FIRESTONE & DAVIDSON, 1989; CONRAD, 1996). Während Stickstoffmonoxid bei der Bildung des bodennahen Ozons involviert ist, trägt Lachgas direkt zur Erhöhung des Treibhauseffektes in der Atmosphäre bei (PAPEN & BUTTERBACH-BAHL, 1999; GASCHE & PAPEN, 1999).

In der Regel finden die Nitrifizierer in der Natur suboptimale Lebensbedingungen vor, d.h. zu wenig Substrat, zu niedrige pH-Werte, zu geringe Sauerstoffversorgung etc. (WATSON et al., 1981). Steigt jedoch das Angebot an anorganischen Stickstoffverbindungen aufgrund anthropogener Tätigkeiten, wie z.B. die Überdüngung der Böden in der Landwirtschaft, die Belastung der Oberflächengewässer durch die Überdüngung aus der Landwirtschaft oder die atmosphärische Zunahme anorganischer Stickstoffverbindungen durch Verbrennungsvorgänge wie z.B. durch den Autoverkehr, oder aber landwirtschaftliche Aktivitäten an, so kommt es zu einer plötzlichen starken Zunahme der Nitrifikation (LAANBROECK & WOLDENDORP, 1995).

Die in der Lithosphäre, so z.B. auch im Gestein von Gebäuden aufgefundenen Nitrifizierer decken ihre Substratversorgung hauptsächlich durch atmogene anorganische Stickstoffverbindungen in Form von Ammoniak und Stickoxiden. Hier führt die Nitrifikation neben einem Anstieg der klimarelevanten Spurengase hauptsächlich zur Zerstörung der Bausubstanz durch die Säurebildung (MANSCH et al., 1999). In landwirtschaftlich genutzten Böden ist besonders die Verfügbarkeit von Ammoniak die dominierende Größe, die die Nitrifikation regelt. Durch die Überdüngung der Böden erhöht sich die Lachgas- und die Stickoxid-Bildung deutlich. Zusätzlich verursacht die Nitrifikation eine Versauerung des Bodens und im Anschluß daran die Auswaschung des anorganischen Stickstoffes in Form von Nitrat in das Grundwasser. Die Folgen sind ein Stickstoffverlust für die Pflanzenernährung und die Anreicherung von Nitrat im Grundwasser. Um diese negativen Folgen zu vermeiden, werden vor allem in der Landwirtschaft sog. Nitrifizide - chemische Substanzen, welche die Nitrifikation unterbinden – ausgebracht (FRITSCHKE, 1998; PHILLIPS et al., 2000). In den Böden von Waldgebieten bilden niedrige pH-Werte den für die autotrophen Nitrifizierer begrenzenden Wachstumsfaktor, d.h. die autotrophe Nitrifikation spielt i.d.R. an sauren Waldstandorten eine untergeordnete Rolle (PAPEN & VON BERG, 1998; BELSER, 1979). Um der Bodenversauerung in den Wäldern entgegenzuwirken, wurden in den vergangenen Jahren Kompensationskalkungen durchgeführt (FEGGER et al., 2000). Im Rahmen der Untersuchungen zu den Auswirkungen dieser Kalkungen wurden bei mikrobiologischen Untersuchungen im Waldgebiet „Höglwald“, das mit anthropogenen, atmogenen, anorganischen Stickstoffverbindungen belastet ist (KREUTZER, 1995), festgestellt, daß auf den Böden mitten im gekalkten Waldgebiet die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer explosionsartig zugenommen hatten, obgleich zuvor keine bzw. nur vereinzelt autotrophe Nitrifizierer nachgewiesen worden waren (PAPEN et al., 2002). Diese Tatsache und der negative Nachweis von autotrophen Nitrifizierer im Kalk legten den Verdacht nahe, daß der Waldboden unter den Fichten laufend aus dem Kronenraum über die Nadelstreu mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert wird. Dies hätte eine Reihe von ökologischen Auswirkungen, die bisher noch nicht bedacht wurden. Der Gasaustausch zwischen Pflanze und der Atmosphäre, sowie die Ammoniak-Aufnahme von Pflanzen würde sich somit nicht allein aus pflanzenphysiologischen, sondern auch aus mikrobiologischen Prozessen zusammensetzen. Durch die Versorgung der Pflanzen mit oxidierten Stickstoffverbindungen würde sich deren Wachstum verbessern. Zudem würde die Phyllosphäre als Ammoniak-Senke dienen. Nicht nur der saure Regen, sondern auch die Säureproduktion durch die autotrophen Nitrifizierer könnte Ursache für Nadelschäden an Fichten sein. Die Bildung von klimawirksamen Spurengasen würde nicht mehr allein auf Böden beschränkt sein, sondern in Waldgebieten auch in den Fichtenkronen stattfinden. Durch erste mikrobiologische Untersuchungen der Fichten-Phyllosphäre konnten PAPEN et al. (2002) zweifelsfrei nachweisen, daß die Phyllosphäre tatsächlich autotrophe Nitrifizierer in Zellzahlen, die vergleichbar

mit den Zellzahlen aus Bodenproben waren, beherbergte. Damit wurde erstmalig ein bisher völlig unbekannter Lebensraum der autotrophen Nitrifizierer entdeckt, nämlich die Phyllosphäre von Fichten (PAPEN et al., 2002).

### 1.3 Autotrophe Nitrifizierer in der Phyllosphäre von Fichten

Die Untersuchungen durch PAPEN et al. (2002) mit Hilfe der klassischen mikrobiologischen „Most Probable Number“-Technik (MPN-Technik) (ALEF, 1991) in Verbindung mit Gaswechselfmessungen an Fichten des stickstoffbelasteten Fichtenwald-Ökosystems „Höglwald“, das hohen atmosphärischen Stickstoffeinträgen in Form von Ammoniak und Nitrat ausgesetzt ist (KREUTZER, 1995; RENNENBERG et al., 1998), haben gezeigt, daß die Fichtennadeln sowohl mit autotrophen Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierern besiedelt sind. An Buchenblätter-Proben desselben Standortes konnten keine autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen werden (PAPEN et al., 2002). Die Gaswechselfmessungen wurden mit Ammoniak bzw. mit Ammoniak und 10 Pa Acetylen, welches als Inhibitor des bakteriellen Enzyms Ammoniak-Monooxygenase der Ammoniak-Oxidierer fungiert (HYNES & KNOWLES, 1978; HYMAN & WOOD, 1985), durchgeführt. Diese Ammoniak-Expositionsversuche zeigten, daß die Ammoniakaufnahmen der Fichtenzweige bei gleichzeitiger Acetylenexposition signifikant niedriger war als ohne Acetylenzugabe, was darauf hindeutete, daß die Ammoniak-Depositionsreduktion auf die Hemmung der Aktivität der bakteriellen Ammoniak-Monooxygenase zurückzuführen war (PAPEN et al., 2002). Zugleich wurden mit Hilfe der klassischen mikrobiologischen MPN-Technik Ansätze sowohl mit ganzen Nadeln als auch mit Nadelextrakt aus aufgeschlossenen Nadeln inkubiert. Die Zellzahlen aus dem MPN-Ansatz mit den intakten Nadelproben ergaben nach 9 Wochen Inkubation Zellzahlen von  $10^{3-3,5} \text{ g}^{-1}$  Nadelrockengewicht für die autotrophen Nitrifizierer, während im MPN-Ansatz mit den aufgeschlossenen Fichtennadeln bereits nach 3 Wochen Inkubation Zellzahlen zwischen  $10^{5-6} \text{ g}^{-1}$  Nadelrockengewicht nachgewiesen werden konnten. Die Tatsache, daß die Bakterien im MPN-Ansatz mit den aufgeschlossenen Nadeln wesentlich schneller und in wesentlich höheren Zellzahlen nachzuweisen waren, geben nach PAPEN et al. (2002) erste Hinweise darauf, daß die chemolithoautotrophen Nitrifizierer im Nadelblattgewebe, genauer dem Apoplasten der Fichtennadeln, z.B. im substomatären Hohlraum, anzutreffen sind. Wenn man die Wachstumsbedingungen der chemolithoautotrophen Nitrifizierer näher kennt (WATSON et al., 1989), wäre eine Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten von Fichtennadeln nicht so überraschend, wie es sich auf den ersten Blick darstellt. Als chemolithoautotrophe Bakterien benötigen die Nitrifizierer obligat Sauerstoff zur Oxidation des Ammoniaks bzw. Nitrits (STENSTROM & PODUSKA, 1980; PRINČIČ et al., 1998) und Kohlendioxid, das über den Calvin-Benson-Zyklus fixiert wird und als Baustein zum Aufbau von chemischen Verbindungen in der Zelle dient

(PERETÓ et al., 1999). Die Gase wären in der Atmosphäre um die Nadeln und durch den Gasaustausch durch die Stomata der Nadelblätter im Apoplasten vorhanden bzw. stünden durch den Stoffwechsel der Fichten zur Verfügung (STRASBURGER, 1991). Die autotrophen Nitrifizierer sind gegen die natürliche UV-Strahlung sehr empfindlich (BOCK, 1965; HOOPER & TERRY, 1974). Durch die Farbpigmente und den anatomischen Aufbau der Fichtennadeln wären die Nitrifizierer im Apoplasten vor diesen Strahlen geschützt (DeLUCIA et al., 1992). Zudem sind die Nitrifizierer sehr anfällig gegenüber niedrigen pH-Werten (BELSER & SCHMIDT, 1978; BELSER, 1979). Im Apoplasten liegen die pH-Werte um den Bereich von  $\text{pH} = 5,5 - 6,5$  (MATTSON & SCHJOERRING, 1995; ASMAN et al., 1998). Damit würden die pH-Werte ein Wachstum der Bakterien im Apoplasten ermöglichen. Eine ausreichende Versorgung der Bakterien mit Wasser wäre durch die Feuchtigkeit und den dünnen Wasserfilm im Apoplasten gesichert (LÄUCHLI, 1976; HUSTED & SCHJOERRING, 1995). Als Substrat dienen den Nitrifizierern Ammoniak, Stickstoffdioxid bzw. Nitrit. Die genannten Gase sind am atmo- gen stark Stickstoffbelasteten Standort Höglwald in der Außenluft enthalten und können durch die Stomata der Nadeln aufgenommen werden (HUBER, 1997; GASCHKE, 1998; GESSLER & RENNENBERG, 1998). Eine Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten durch autotrophe Nitrifizierer ist daher sehr wahrscheinlich (PAPEN et al., 2002).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bisher wurde jedoch kein direkter Nachweis erbracht, daß die chemolithoautotrophen Nitrifizierer auch tatsächlich den Nadelblatt-Apoplasten der Fichtennadeln besiedeln. Neben dem direkten Beweis, daß die Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten von Fichtennadeln anzutreffen sind, fehlt bis jetzt die exakte Lokalisierung der autotrophen Nitrifizierer im Apoplasten, sowie eine Bestimmung der Besiedlungsdichte über eine genaue Quantifizierung der Bakterienzellen im Nadelblatt-Apoplasten. Zudem ist völlig ungeklärt, ob es sich bei der Besiedlung der Phyllosphäre um ein allgemein verbreitetes Phänomen handelt oder nur an Standorten auftritt, die mit atmo- genem Stickstoff stark belastet sind. Sollten die autotrophen Nitrifizierer tatsächlich den Nadelblatt-Apoplasten besiedeln, stellt sich zusätzlich die Frage, wie sich die Besiedlung des Apoplasten vollzieht. Um die bisherigen Befunde von PAPEN et al. (2002) durch systematische Experimente zu untermauern und zu ergänzen, sollten die Untersuchungen mit der klassischen „Most Probable Number“-Technik (MPN-Technik) wiederholt und die Ergebnisse bestätigt werden. Ferner sollten die autotrophen Nitrifizierer über die Polymeraseketten-Reaktions-Technik (PCR-Technik) in den MPN-Ansätzen direkt nachgewiesen werden. Im Anschluß daran sollten die Bakterien mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung im Nadelblatt-Apoplasten markiert, mit Hilfe eines konfokalen Laserrastermikroskops direkt nachgewiesen und genau lokalisiert wer-

den. Um einen Anhaltspunkt über die Besiedlungsdichte zu erhalten, sollten die autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten sowohl über die MPN-Technik als auch über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops quantifiziert werden. Für die Aufklärung des Besiedlungsvorganges des Nadelblatt-Apoplasten von Jungfichten sollten Fichtenkeimlinge mit Nitrifizierern inokuliert und anhand der oben genannten Methoden entsprechend untersucht werden.

Die wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden daher darin,

- die chemolithoautotrophen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichte eindeutig nachzuweisen und genau zu lokalisieren;
- eine Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer im Apoplast der Fichtennadeln vorzunehmen;
- einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Besiedlung eines durch eine hohe atmogene Stickstoffbelastung gekennzeichneten Standorts im Vergleich zu einem Standort mit geringer atmogener Stickstoffbelastung aufzuzeigen;
- saisonale Unterschiede der Besiedlung der Phyllosphäre im Frühling und im Herbst zu ermitteln;
- erste Hinweise über den Besiedlungsvorgang des Fichtennadel-Apoplasten durch die Inokulation von Fichtenkeimlingen mit autotrophen Nitrifizierern zu erarbeiten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsstandorte

Zum Nachweis, zur Lokalisation und Quantifizierung von autotrophen Nitrifizierern im Kronenraum der Fichte wurden zwei Freilandstandorte, die sich hinsichtlich der atmosphärischen Stickstoffbelastung unterscheiden, ausgewählt.

#### 2.1.1 Höglwald – ein durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteter Standort

Das als „Höglwald“ bezeichnete Waldgebiet liegt 40 km westnordwestlich der Bayerischen Landeshauptstadt München im Regierungsbezirk Schwaben (11° 11' östlicher Länge, 48° 30' nördlicher Breite). Der Forstdistrikt „Höglwald“ ist dem Staatlichen Bayerischen Forstamt Aichach, Forstdienststelle Ried, zugeordnet und liegt auf einem Plateau des Oberbayerischen Tertiären Hügellandes auf einer Höhe von 540 m über Normalnull (ü. NN). Das Erscheinungsbild dieser Region wird durch eine Mischung forstlicher und intensiver landwirtschaftlicher Nutzung mit Mais- und Getreideanbau sowie Grünlandbewirtschaftung bestimmt (KREUTZER, 1995; KREUTZER & WEISS, 1998; ROTHE, 1997; BUTTERBACH-BAHL et al., 2002). Der Boden der Region weist eine saure, podsolige Parabraunerde, entstanden aus miozänen Sand-Schluff-Ablagerungen, mit einer Tendenz zur Pseudovergleyung im tieferen Bodenbereich auf, die im oberen Bereich mit pleistozänem Löß-Lehm gemischt ist. Die organische Auflage besteht aus einem moderartigen Rohhumus (KREUTZER & WEISS, 1998). Das Klima ist warmgemäßigt. Die mittlere jährliche Niederschlagsmenge beträgt 850 mm, das langjährige Temperaturmittel 7,6 °C (KREUTZER, 1995). Die Boden-pH-Werte betragen, gemessen in Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), für die organische Auflage pH = 2,7 - 3,6 und für den Mineralboden pH = 3,9 - 4,0. Der Waldstandort liegt zwischen den Ballungsgebieten Augsburg und München in einem landwirtschaftlich intensiv genutzten Gebiet. Daher sind sowohl die atmosphärischen Konzentrationen oxidierter (Nitrat-Ionen NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ Stickstoffoxide NO<sub>x</sub>) als auch reduzierter (Ammonium-Ionen NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ Ammoniak, NH<sub>3</sub>) Stickstoffverbindungen überdurchschnittlich hoch. Die nasse Deposition der N-Verbindungen (N = Stickstoff) beträgt im langjährigen Mittel 10 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup> und 20 kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup> (KREUTZER, 1995; RENNENBERG et al., 1998). Der Mittelwert der Ammoniak-Konzentration im Kronenraum des Bestandes beträgt ca. 30 µg m<sup>-3</sup>, die Außenluftkonzentrationen können jedoch nach Gülleausbringung auf die unmittelbar an das Waldgebiet angrenzenden Felder Spitzenwerte von > 100 µg m<sup>-3</sup> erreichen (HUBER, 1997). Die ursprüngliche Bestockung mit Buchen und Eichen wurde 1770 von einer ersten Bepflanzung mit

*Picea abies* (L.) Karst. abgelöst. Die heutige zweite Generation von *Picea abies* wurde ca. 1910 gepflanzt. Mit  $1258 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  Vorratsfestmetern und einem jährlichen Zuwachs von  $24,4 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  zeigt der Bestand eine überdurchschnittliche Wuchsleistung (KREUTZER et al., 1991). Die ursprüngliche natürliche Vegetation wurde aus der Pflanzenvergesellschaftung des Luzulo-Fagetum (Hainsimsen-Buchenwald) gebildet. Sträucher fehlen im heutigen Bestand und die kaum vorhandene Krautschicht wird von *Oxalis acetosella* beherrscht. Die dicht geschlossene Moosschicht wird von *Thuidium tamariscinum* dominiert (RODENKIRCHEN, 1991). Autotrophe Ammoniak-Oxidierer konnten im Höglwald auf naturbelassenen, ungekalkten Böden zu keiner Zeit nachgewiesen werden (PAPEN & VON BERG, 1998). Autotrophe Nitrit-Oxidierer wurden auf denselben Böden vereinzelt in sehr geringen Zellzahlen unter  $1000 \text{ Bakterien g}^{-1}$  Bodentrockengewicht (BTG) nachgewiesen (PAPEN et al., 2002). Nach einer entsprechenden Untersuchung der Bakterienzahlen auf gekalkten Versuchsflächen im Höglwald unmittelbar neben den Kontrollflächen konnten jedoch etwa vier Monate nach der Kalkung autotrophe Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer mit etwa  $10^5 \text{ Zellen g}^{-1}$  BTG nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der Fichtennadeln aus der Phyllosphäre ergab zudem, daß auch in diesen Proben Ammoniak-Oxidierer in einer Zahl von etwa  $10^5 \text{ Zellen g}^{-1}$  Nadelrockengewicht (NTG) und Nitrit-Oxidierer in einer Zahl von  $10^6 \text{ Zellen g}^{-1}$  NTG im Nadelblatt-Extrakt zu finden waren (PAPEN et al., 2002).

### 2.1.2 Villingen – ein durch Stickstofflimitierung gekennzeichnete Standort

Als Standort, der mit wenig atmosphärischem Stickstoff belastet ist, wurde ein Waldstück am Ost- rand des Mittelschwarzwaldes ausgewählt. Der Waldstandort liegt im Regierungsbezirk der Stadt Freiburg i. Brsg., 4 km südwestlich der Stadt Villingen-Schwenningen im Stadtwald. Das Wald- gebiet ist dem Städtischen Forstamt Villingen-Schwenningen zugeordnet. Der Standort weist die Koordinaten  $48^\circ 3'$  nördlicher Breite und  $8^\circ 22'$  östlicher Länge auf. Der geologische Untergrund des Waldgebietes besteht aus Buntsandstein. Das Gebiet liegt auf einer Höhe von 840 bis 920 m ü. NN und wurde schon in frühen Zeiten sehr intensiv als Waldweide und zur Streu- und Brenn- holzgewinnung genutzt (RASPE et al., 1998). Aufgrund der tonigen Stauhorizonte in 50 – 90 cm Tiefe des sandig-lehmigen Bodens sind in Abhängigkeit vom Vernässungsgrad die Bodentypen Pseudogley-Braunerde bis Pseudogley zu finden. Die organische Auflage besteht aus rothumus- artigem Moder bis Rohhumus (RASPE et al., 1998). Das jahreszeitliche Klima ist durch kalte Winter und warme Sommer gekennzeichnet (REICHELDT, 1977). Die mittlere Jahrestemperatur liegt zwischen  $6 - 7^\circ \text{C}$ . Die Niederschläge sind aufgrund der westlich vorgelagerten Schwarz- waldhöhen mit etwa 900 bis 1200 mm im Jahr, auf den Schwarzwald bezogen, gering (RASPE et al., 1998). Der pH-Wert des Bodens, gemessen in  $\text{CaCl}_2$ , liegt im sauren Bereich und bewegt sich im Bereich von  $\text{pH} = 3 - 4$  (FEGGER, 1993). Die Versorgung mit Nährelementen ist im Pro- bengebiet allgemein schlecht. So ist die Zufuhr von Phosphor und Kalium nur schwach, mit Cal-



cium mäßig ausgebildet. Die Bereitstellung von Magnesium ist schwach bis ausreichend. Die Stickstoff-Versorgung ist dagegen mäßig bis mangelhaft, was durch Nadelanalysen gezeigt werden konnte (RASPE, 1992). Diese Unterversorgung mit Stickstoff ist auf die frühere intensive Waldnutzung zurückzuführen, die eine starke Waldzerstörung und Bodenverschlechterung nach sich zog. Zudem bewegen sich die jährlichen atmogenen N-Einträge durch nasse Deposition zwischen 10 und 15 kg N ha<sup>-1</sup> und liegen damit auf dem für die Schwarzwaldhochlagen typischen niedrigen Niveau. Das Waldgebiet ist daher durch eine Stickstoff-Limitierung gekennzeichnet (FEGGER et al., 1992). Dieser Mangel an N wirkt sich entsprechend auf den Waldbestand aus. Die Versuchsfläche ist überwiegend mit 80- bis 120-jährigen Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.) bestockt, die eine geringe Wuchsleistung aufweisen (SCHMID, 1989). Die ursprüngliche Waldgesellschaft wird dem „boreal-montanen Tannen-Fichten-Forstwald“ zugeordnet (RASPE, 1992). Durch die Bevorzugung der Fichte im Forstbetrieb sind jedoch Tanne und Kiefer am Gesamtanteil der Bestockung stark zurückgegangen (FEGGER, 1993). Die Strauchschicht wird hauptsächlich von *Vaccinium*-Arten gebildet, in der Moosschicht sind Arten der *Sphagnum squarrosum*-Gruppe zu finden. Die Zellzahl der im Boden vorkommenden heterotrophen Nitrifizierer schwankt im Bereich von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>7</sup> Bakterien g<sup>-1</sup> BTG und erreicht im Februar ihren Höchstwert. Die Zahlen der denitrifizierenden Bakterien liegen mit 10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> Bakterien g<sup>-1</sup> BTG unter den Zellzahlen der heterotrophen Nitrifizierer. Chemolithoautotrophe Ammoniak-Oxidierer konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Chemolithoautotrophe Nitrit-Oxidierer wurden in relativ geringen Zellzahlen vereinzelt zu 100 Organismen g<sup>-1</sup> BTG ermittelt. Die Zahlen gelten für Bakterien in der organischen Bodenaufgabe, mit zunehmender Bodentiefe nehmen diese ab (DAUM, 1999).

## 2.2 Unter Laborbedingungen herangezogene Fichtenkeimlinge

Für die Untersuchung zur Aufklärung des Besiedlungsvorgangs des Nadelblatt-Apoplasten von Fichtenkeimlingen mit autotrophen Nitrifizierern wurden Fichtensamen unter sterilen Bedingungen in Tontöpfen bei 5 °C zum Keimen gebracht. Diese Keimlinge wurden anschließend mit einem Fungizid-Antibiotika-Gemisch oberflächensterilisiert und in Reagenzröhrchen aus Kunststoff mit Perlitt gesetzt, die unten mit einer Öffnung versehen waren. Durch diese Öffnung wurden die Keimlinge mit der sterilen Nährlösung nach INGESTAD (1959) mit den nötigen Nährstoffen versorgt. Der Nährlösungsraum wurde mit einer Aquariumpumpe steril belüftet und mit einem Deckel luftdicht verschlossen. Es gab insgesamt 4 sterile, luftdichte Kammern. Der Gasraum der Kammern wurde mit steriltfiltrierter Luft in einer Flußrate von 5 l min<sup>-1</sup> durchströmt. Während Kammer 1 und 3 nur belüftet wurden, wurde in die Kammern 2 und 4 mittels Mass-Flow-Controllern zusätzlich Ammoniak in einer Konzentration von 20 ppm zudosiert, was einer

für den Standort Höglwald charakteristischen, mittleren, atmosphärischen Ammoniak-Konzentration entspricht. Zur Kultivierung der Fichtenkeimlinge wurden diese Kammern in eine Klimakammer gestellt. Die Fichtenkeimlinge waren in der Klimakammer Langtag-Bedingungen ausgesetzt, d.h. sie wurden 16 h lang mit Licht der Intensität von  $175 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  beleuchtet. Die Dunkelphase dauerte 8 h. Die Temperatur betrug während der Lichtphase  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , in der Dunkelphase  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ . Etwa 2 Monate nach der Keimung der Fichten begannen die Inokulationsversuche mit autotrophen Nitrifizierern. Die für die künstliche Inokulation benötigten Fichtenkeimlinge wurden unter Leitung von Herrn Dr. A. Geßler, Professur für Baumphysiologie, Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, angezogen. Von Herrn Dr. Geßler stammen die oben aufgeführten Anzuchtbedingungen.

### 2.3 Untersuchungszeitraum und Probenahme

Die Untersuchungen zur Aufklärung des Besiedlungsvorgangs des Apoplasten von Fichtenkeimlingen mit Nitrifizierern fanden in den Jahren 2000 und 2001 statt. Die erste Versuchsreihe startete im April 2000 mit einer einmaligen Inokulation der Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierern. Unmittelbar nach der ersten Inokulation wurde die erste Probe der Fichtennadeln genommen. Weitere Probenahmen schlossen sich im Juni und September 2000 an. Im Jahr 2001 begann eine zweite Versuchsreihe, wobei dieses Mal die Fichtenkeimlinge Anfang Mai 2001 mit einer Reinkultur des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* inokuliert wurden. Direkt nach der Inokulation schloß sich die erste Probenahme an. Eine zweite Inokulation mit folgender Probenahme fand Ende Juni 2001 statt. Die letzte Probenahme im Jahr 2001 erfolgte im September.

Der Untersuchungszeitraum für die Standorte Höglwald und Villingen umfaßte die Jahre 2000 bis 2002. Für die Bestimmung der saisonalen Unterschiede in der Besiedlungsdichte des Nadelblatt-Apoplasten mit Nitrifizierern an den natürlichen Standorten wurden aus dem Kronenraum jeweils im Frühjahr und im Herbst eines Jahres Nadelproben genommen. Insgesamt wurden 5 Probenahmen durchgeführt. Die Probenahmen begannen sowohl im Höglwald als auch in Villingen im September 2000. Im Jahr 2001 erfolgte die Probenahme der Nadelproben im Mai und im Oktober. Für das 3. Jahr fand die Probenahme für das Frühjahr 2002 Anfang Juni und für den Herbst 2002 Anfang Oktober statt. Die saisonalen Probenahmen im Höglwald und in Villingen liefen an einem Tag ab. Wenn dies nicht möglich war, lagen die Termine so eng wie möglich beieinander, mindestens jedoch innerhalb einer Woche. Für das Jahr 2002 wurden die Proben mit Hilfe eines Baumsteigers (Baumpflege KURSCHATKE, Garmisch-Partenkirchen), der für die Probenahme entsprechend unterwiesen worden war, direkt aus dem oberen Kronenbereich der Fichten genommen. Die Wahl der Proben fiel auf ganze Zweige, die hinter dem letzten noch vor-

handenen Nadeljahrgang mit einer handelsüblichen Astschere vom Baum geschnitten wurden. Die Zweige wurden in zuvor autoklavierten Kunststoffschachteln bzw. Autoklavierbeuteln (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verpackt, wobei besonders darauf geachtet wurde, daß die Zweige unter keinen Umständen mit dem Boden in Berührung kamen, um eine Kontamination mit autotrophen Nitrifizierern aus dem Boden zu vermeiden. Nachdem die Schachteln bzw. Autoklavierbeutel verschlossen worden waren, wurden sie für den Transport in einer Kühlbox mit Kühlakkus deponiert. Die Probenahme der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Fichtenkeimlinge wurden mit einer Pinzette in autoklavierte Kunststoffschachteln bzw. Autoklavierbeutel verpackt. Für den Transport nach Garmisch-Partenkirchen wurde eine Kühlbox verwendet. Nach der Ankunft im Labor wurden die Nadeln mit einer sterilen Schere von den Zweigen geschnitten und in Aluminium-Dosen (Rotilabo<sup>®</sup>-Aluminiumdosen, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) eingepackt. Nach dem Schockgefrieren der Aluminium-Dosen in flüssigem Stickstoff (Messer Griesheim GmbH, Krefeld) wurden die Probendosen bei -80 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert (-85 °C Ultra Low Freezer C66085, New Brunswick Scientific, Labotect GmbH, Labortechnik, Göttingen).

## 2.4 Charakterisierung der Fichtennadeln

Um Aussagen über die Fichtennadeln der unterschiedlichen Standorte treffen zu können, wurden von den Nadeln, die für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung verwendet wurden, folgende Nadelblatt-Parameter aufgenommen: die Länge, Breite, das Gewicht, die Blattfläche und die Zahl der Spaltöffnungen pro mm<sup>2</sup>. Zur Bestimmung der Länge und der Breite der einzelnen Fichtennadeln wurde eine Schieblehre (Hoffmann-Gruppe, München) verwendet. Da die meisten Fichtennadeln sichelförmig gekrümmt waren, wurde als Länge die Sehne von einem Ende der Nadel zum anderen Ende bestimmt (RIEDERER et al., 1988). Das Gewicht einer einzelnen Fichtennadel wurde auf einer Feinwaage (M2P sartorius, Sartorius AG, Göttingen) ermittelt. Die Bestimmung der Blattfläche erfolgte nach RIEDERER et al. (1988) in modifizierter Form. Alle Nadeln einer Probenahme wurden auf einem Flachbildscanner (ScanJet4c, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen) ausgebreitet und mit der entsprechenden Software „Deskscan II, Version 2.4“ (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen) eingescannt. Nach dem Scannen erfolgte die kurzzeitige Lagerung der Fichtennadeln einzeln in nummerierten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Reaktionsgefäße, Eppendorf, VWR International GmbH, Ismaning) im Kühlschrank. Aus dem Gesamtbild aller im Computer eingescannten Fichtennadeln einer Probenahme wurden mit der Bildverarbeitungssoftware „Adobe Photoshop<sup>®</sup> 4.0, Version D1-4.0.1“ (Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim) einzelne Bilder mit einzelnen Fichtennadeln abgespeichert. Um die Fläche einer einzelnen Nadel zu ermitteln, wurde über die Software „Laser Scanning Microscope LSM 510 Software, Version

2.3“ (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) von einer Nadel eine fiktive Blattfläche ermittelt. Um diese fiktive Blattfläche umzurechnen, waren aus schwarzem Karton geschnittene Quadrate unterschiedlicher Größe eingescannt und von diesen ebenfalls die fiktive Fläche ermittelt worden. Über die Ermittlung des Verhältnisses zwischen der tatsächlichen Fläche der schwarzen Quadrate zur eingescannten fiktiven Fläche der Quadrate konnte ein Umrechnungsfaktor von 5,69 ermittelt werden, mit dem die eingescannte fiktive Nadelblatt-Fläche auf die tatsächliche Größe umgerechnet werden konnte. Die bisher auf die natürliche Größe umgerechnete Blattfläche entsprach der auf dem Scanner projizierten zweidimensionalen Blattfläche der Nadel, nicht jedoch der natürlichen dreidimensionalen Ausdehnung. Daher mußte die ermittelte Blattfläche mit dem Faktor 2,74 (RIEDERER et al., 1988) multipliziert werden. Für die Ermittlung der Zahl der Spaltöffnungen pro  $\text{mm}^2$  der Blattfläche erfolgte die Untersuchung einer Fichtennadel unter einem Binokular (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena ) mit 12,5facher Vergrößerung. Die Spaltöffnungen auf einem  $\text{mm}^2$  Blattfläche wurden gem. COLLEAU (1968) gezählt. Es wurden nur ganze Spaltöffnungen auf einem mm Länge gewertet. Auf einem mm Breite wurden die Spaltöffnungen aller im Binokular sichtbaren Blattoberflächen berücksichtigt.

## 2.5 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Um die Sterilität zu gewährleisten und störende Fremdkeime und Nukleasen zu inaktivieren bzw. zu entfernen, wurden alle verwendeten Geräte und Lösungen vorbehandelt. Die hitzebeständigen Geräte und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, für mindestens 20 min bei 121 °C und etwa 1,2 bar autoklaviert (Sanoklav, Wolf, Geislingen; Vapoklav, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). Glaspipetten wurden in einer Pipettendose für mindestens 3 h bei 160 °C in einem Trockenschrank (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) sterilisiert. Hitzeempfindliche Geräte und Gefäße wurden mit 70%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> für 10 min behandelt und anschließend mehrmals mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser nachgespült. Für Versuche, bei denen die Osmolarität eine wichtige Rolle spielte, schloß sich eine Nachspülung der Geräte und Gefäße vor Gebrauch mit sterilem 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) an. Die Sterilisation hitzeempfindlicher und feuergefährlicher Lösungen erfolgte mit Einwegfiltern der Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$  (Qualilab<sup>®</sup>, für: VWR International GmbH, Ismaning). Diese Lösungen wurden anschließend in zuvor autoklavierten Gefäßen aufbewahrt bzw. autoklavierten Lösungen zugesetzt. Zur weiteren Einschränkung möglicher Kontaminationen wurden Metallgeräte, wie z.B. Pinzetten, Scheren, Präpariernadeln etc. mit 100%igem Rotisol<sup>®</sup> abgeflammt. Für die Ausführung der Arbeiten fanden Einweghandschuhe und eine Steril-Werkbank „Laminar Air<sup>®</sup>“ (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) Anwendung. Alle anfallenden, nicht mehr benötigten Kulturen, Lösungen und andere feste und flüssige Abfälle wurden zur Vermeidung einer weiteren

Verunreinigung für 40 min bei mindestens 121 °C und etwa 1,2 bar autoklaviert und entsprechend entsorgt.

## 2.6 Herkunft und Anzucht der verwendeten Bakterienstämme

### 2.6.1 Mikroorganismen

Für die Etablierung und Kontrolle der durchzuführenden Experimente wurden in dieser Arbeit die in der Tabelle 2.1 aufgeführten Mikroorganismen herangezogen.

**Tab. 2.1: Verwendete Bakterien und ihre Herkunft;** NCIMB: The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Britische Stammkultur-Sammlung); ATCC: American Type Culture Collection (Amerikanische Stammkultur-Sammlung); DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; IMK-IFU: Institut für Meteorologie und Klimaforschung – Bereich Atmosphärische Umweltforschung, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH

Organismus	Stamm	Bezugsquelle	Referenz
<i>Nitrosomonas europaea</i> NCIMB 11850 (ATCC 25978)	Watson C31	NCIMB	SKERMAN (1980), WATSON (1971)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> DSMZ 10237 (ATCC 25391)	Watson Nb-225	DSMZ	SKERMAN (1980), WATSON (1971), HOVANEK & DELONG (1996)
<i>Escherichia coli</i>	TG1	IMK-IFU	SAMBROOK et al. (1989)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> aus dem Boden des Höglwaldes	unbestimmt	IMK-IFU	DSMZ Schreiben v. 07.11.1989
Bakterienmischkultur mit Nitrifizierern aus der Nadelstreu des Höglwaldes	unbestimmt	IMK-IFU	IMK-IFU

### 2.6.2 Nährmedien

#### 2.6.2.1 LB-Medium (Luria-Bertani) für *E. coli* TG1 (SAMBROOK et al., 1989)

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	10 g	171 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH = 7,0 eingestellt. Für Agar-Platten wurden 15 g Agar hinzugefügt.

### 2.6.2.2 Glucose-Hefeextrakt-Medium für *Rhodococcus rhodochrous* (ATLAS, 1993)

Glucose	5 g	27,7 mM
Fleischextrakt	5 g	
Pepton	5 g	
Hefeextrakt	5 g	
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml	

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 M NaOH auf pH = 6,7. Für Agar-Platten wurden 15 g Agar hinzugegeben.

### 2.6.2.3 Medium für *Nitrosomonas europaea* (NCIMB, Catalogue of Strains, 1994)

Nährmedium:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	235 mg	1,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg	1,4 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	40 mg	0,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40 mg	0,1 mM
Stammlösung	1 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml	

Stammlösung:

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	50 mg	0,1 mM
NaEDTA	50 mg	0,1 mM
Phenolrot	50 mg	0,1 mM
(in 1ml 5%iger (w/v) NaOH angelöst)		
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit einer 5%igen (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH = 7,8 eingestellt.

**2.6.2.4 Medium für *Nitrobacter winogradskyi* (NCIMB, Catalogue of Strains, 1994)**

Nährmedium:

NaNO <sub>2</sub>	247 mg	3,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg	1,4 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	40 mg	0,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40 mg	0,1 mM
Stammlösung	1 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml	

Stammlösung: s.o. Medium für *Nitrosomonas europaea*

Der pH-Wert wurde ebenso wie bei *N. europaea* mit einer 5%igen (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH = 7,8 eingestellt.

**2.6.2.5 Medium für Ammoniak-Oxidierer in den MPN-Ansätzen und für die Nitrifizierer-Mischkultur aus dem Höglwald (SCHMIDT & BELSER, 1982)**

Nährmedium:

Konzentration der  
Stammlösung:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(0,05 g ml <sup>-1</sup> )	10 ml	3,78 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(0,0134 g ml <sup>-1</sup> )	1 ml	0,09 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(0,04 g ml <sup>-1</sup> )	1 ml	0,16 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(0,0272 g ml <sup>-1</sup> )	7,5 ml	1,49 mM
Bromthymolblau	(0,0004 g ml <sup>-1</sup> )	5,0 ml	0,003 mM
Eisenkomplexlösung		1,0 ml	
Spurenelemente		1,0 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml	

Eisenkomplexlösung:

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	246 mg	8,8 mM
NaEDTA	331 mg	8,8 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml	

Spurenelemente:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mg	0,4 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	20 mg	1,0 mM
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 mg	0,3 mM
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2 mg	0,08 mM
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 mg	0,8 μM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml	

Dieses Medium wurde auch zur Kultivierung von Ammoniak-oxidierenden Bakterien in den MPN-Ansätzen genutzt. Der pH-Wert für die MPN-Ansätze wurde mit einer 5%igen (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH = 7,8 eingestellt; der pH-Wert des Mediums für die Nitrifizierermischkultur wurde durch Zugabe von Calciumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>) bis zu einer Endkonzentration von 0,2% (w/v) abgepuffert.

#### 2.6.2.6 Medium für Nitrit-Oxidierer in den MPN-Ansätzen (SCHMIDT & BELSER, 1982)

Nährmedium:	Konzentration der Stammlösung:		
NaNO <sub>2</sub>	(0,05 g ml <sup>-1</sup> )	10 ml	7,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(0,02 g ml <sup>-1</sup> )	10 ml	1,4 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(0,004 g ml <sup>-1</sup> )	10 ml	0,1 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(0,0002 g ml <sup>-1</sup> )	10 ml	13,6 μM
Eisenkomplexlösung		10 ml	
Phenolrotlösung		1 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml	

Eisenkomplexlösung:

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g	3,5 mM
NaEDTA	1 g	2,6 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml	

Phenolrotlösung:

Phenolrot (in 2,82 ml 0,1 N NaOH angelöst)	0,1 g	1,1 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 250 ml	



Die Einstellung des pH-Wertes fand mit einer 5%igen (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH = 7,8 statt.

### 2.6.3 Herstellung der Medien

Die Herstellung, Sterilisation und Bereitstellung der Medien zur Kultivierung der Bakterienstämme erforderte ein besonderes Vorgehen (BAST, 1999). Da der pH-Wert im Medium beim Autoklavieren leicht absinkt, wurde der pH-Wert der Medien vor dem Autoklavieren grundsätzlich um 0,2 – 0,4 Einheiten höher eingestellt, als der von der Literatur vorgegebene Endwert. Die Medien zur Herstellung von Agarplatten wurden nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Agar-Platten unter einer Reinen Werkbank „Laminar Air<sup>®</sup>“ (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) gegossen und getrocknet. Nach der Verfestigung des Agars trockneten die Agar-Platten über Nacht bei Raumtemperatur weiter ab. Am nächsten Tag wurden die Platten in eine Kunststofftüte verpackt, um ein Austrocknen zu verhindern, und im Kühlschrank bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert. Der Ansatz der Flüssigmedien der autotrophen Nitrifizierer für die MPN-Ansätze und der Bakterienmischkultur aus dem Höglwald wurde mit Hilfe von Stammlösungen vorgenommen, die bei 4 °C gelagert wurden. Nach der Sterilisation wurden die Erlenmeyerkolben mit den Medien für die Nitrifizierer und der Nitrifizierermischkultur aus dem Höglwald zum Schutz der Zellen vor schädlicher Lichteinwirkung mit handelsüblicher Alufolie vollständig verkleidet. Alle Erlenmeyerkolben waren mit Alu-Überwurfkappen (Schütt, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) verschlossen.

### 2.6.4 Kulturformen

Die traditionelle Methode der Aufbewahrung von Mikroorganismen ist das periodische Überimpfen der Kulturen in frische Medien. Die heterotrophen Bakterien *E. coli* und *R. rhodochrous* wurden für den täglichen Bedarf auf Agarplatten herangezogen. Jede Woche wurden neue Agarplatten beimpft, für 1 – 2 Tage bei 28 °C bebrütet und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Auf diese Weise waren immer frische Zellen für das Testen von Methoden zur Hand und die Reinheit der Bakterien wurde durch die regelmäßigen Ausstriche garantiert. Waren größere Zellmengen nötig, wie z.B. zur Anlage von Stammkulturen oder für die DNA-Isolierung, fand die Kultivierung in 200 ml-Flüssigkulturen statt. Die Anzucht der autotrophen Nitrifizierer erfolgte über 200 ml-Flüssigkulturen. Die Kulturen der Nitrifizierer wurden in einem Brutraum unter aeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich zwischen 28 – 31 °C inkubiert. Zur Sicherung der genetischen Stabilität der Bakterienstämme wurden in regelmäßigen Abständen von etwa 3 – 4 Monaten alle fortlaufenden Kulturen entsorgt und aus den Stammkultur-Cryo-

röhrchen (Cryovial<sup>®</sup>, Les plastiques Simport Plastics, VWR International GmbH, Ismaning) frische Kulturlinien herangezogen.

### 2.6.5 Bestimmung der Wachstumsparameter

Um das Wachstum der Bakterien überwachen zu können und die Kulturen vor einem Absterben zu bewahren, wurden verschiedene Parameter während der Kultivierung gemessen.

#### 2.6.5.1 Messung der optischen Dichte

Eine sehr schnelle Methode zur Kontrolle der Bakterienkulturen stellt die Messung der optischen Dichte (OD) dar. Das Prinzip beruht auf der Messung der durch das Wachstum der Bakterien bedingten zunehmenden Trübung des Kulturmediums. Die Messungen wurden an einem Lambda 2 UV/VIS Spektralphotometer (PerkinElmer Instruments GmbH, Rodgau-Jügesheim) vorgenommen. Um eine weitere Vermehrung der Bakterien in den Proben auszuschließen, wurde die Messung der Proben unmittelbar nach Entnahme durchgeführt. Die Messungen fanden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 578$  nm gegen einen Medienleerwert bei den Kulturen von *E. coli* und *R. rhodochrous*, bei der Höglwaldkultur und bei den Nitrifizierern gegen bidestilliertes Wasser, statt. Es kamen 1 ml-Einwegküvetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm zum Einsatz. Damit die Meßgenauigkeit gewahrt blieb, wurden Proben, die einen Meßwert von  $OD = 0,3$  überschritten, mit Leermedium entsprechend verdünnt. Die dimensionslosen Meßwerte der im Verlauf der Kultivierung durchgeführten Zelldichte-Bestimmungen wurden logarithmisch gegen die Kultivierungszeit, in Stunden angegeben, zu einer Wachstumskurve zusammengestellt.

#### 2.6.5.2 Gesamtzellzahlen

Das gebräuchlichste Verfahren zur Bestimmung der Zellkonzentrationen von Mikroorganismen ist die Bestimmung der Gesamtzellzahl mithilfe einer Zählkammer und einem Lichtmikroskop. Neben der Anzahl lassen sich auch Größe und Morphologie der Bakterien ermitteln. Die Gesamtzellzahlen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim) bestimmt. Der Abstand des plangeschliffenen, geeichten Deckglases zum eingravierten Gitternetz betrug 0,02 mm. Die Größe eines Kleinquadrates betrug  $0,0025 \text{ mm}^2$ . Daraus ergab sich ein Volumen von  $0,00005 \text{ mm}^3$  je Kleinquadrat. Die Bakterien-Proben wurden zunächst abzentrifugiert ( $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min; Centrifuge 5402, Eppendorf, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) und der Überstand verworfen. Im Anschluß erfolgte die Resuspendierung des Bakterien-Pellets in genau demselben Ausgangsvolu-

men mit einem 4 x SSC-Puffer (20 x SSC-Puffer, pH = 7,0: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat), der mit 0,2% (v/v) Tween 20 versetzt war. Durch den Zusatz des Detergenz konnte ein Verklumpen und die Adsorption der Bakterien an die Oberflächen der Zählkammer verhindert werden. Bakterienkulturen, die sehr dicht herangewachsen waren, wurden mit Puffer so weit verdünnt, bis etwa 10 bis maximal 20 Zellen pro Kleinquadrat zu erkennen waren. Nachdem die Bakterien vorsichtig auf die Zählkammer aufgebracht worden waren, wurden die Zellen bei 1000facher Vergrößerung im Phasenkontrast mit einem Ölimmersionsobjektiv unter einem Zeiss-Mikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Es wurden mindestens zwei Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten je Gitterkreuz ausgezählt. Die Zellzahl pro ml unverdünnter Bakteriensuspension wurde mit folgender Gleichung [1] ermittelt:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2 \times 10^7}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate} \times \text{Kammertiefe in } \mu\text{m}} = \text{Zellzahl ml}^{-1} \quad [1]$$

### 2.6.5.3 pH-Wert

Da die autotrophen Nitrifizierer ausgesprochen säureempfindlich sind und bei niedrigen pH-Werten absterben, wurde bei den Kulturen regelmäßig der Verlauf der pH-Wert-Entwicklung überprüft. Erreichten die pH-Werte ein zu niedriges Niveau, erfolgte nachträglich eine pH-Wert-Korrektur mit 5%iger (w/v) Natriumcarbonat-Lösung ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Bei der Bakterienmischkultur aus dem Höglwald wurde das Kulturmedium durch Zugabe von Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) bis zu einer Endkonzentration von 0,2% (w/v) abgepuffert. Der Zusatz der Carbonat-Verbindungen versorgte die chemolithoautotrophen Bakterien zudem mit der lebensnotwendigen C-Quelle Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), welches durch die im Laufe des Wachstums gebildeten Säuren freigesetzt worden war. Die Messung des pH-Wertes wurde mit einem Präzisions-pH-Meter „inoLab LEVEL1“ (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) und der Meßkette InLab<sup>®</sup> 422 (Mettler Toledo GmbH, Gießen) vorgenommen. Die Eichung des Meßbereiches erfolgte mit den entsprechenden Referenz-Puffern (VWR International GmbH, Ismaning) bei pH = 4,0 und pH = 7,0. Um eine Verunreinigung des Diaphragmas der Elektrode zu vermeiden, wurden die Kulturproben vor der Messung bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$  1 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und das Bakterien-Pellet entsorgt. Die Meßelektrode wurde so lange in das zu messende Medium getaucht, bis sich ein stabiler pH-Meßwert einstellte.

### 2.6.5.4 Konzentration der Nitrit-Ionen (SNELL & SNELL, 1949)

Für die Überwachung der Kulturen der Ammoniak-Oxidierer wurde die Produktion des Stoffwechselproduktes Nitrit herangezogen. Der zeitliche Entwicklungsverlauf der Nitritkonzentration zeigt an, wann das Substrat Ammoniumsulfat verbraucht ist. Da Nitrit zudem in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, dient die Überwachung auch dazu, die Bakterien vor einer Nitrit-Vergiftung zu bewahren. Die Bestimmung der Nitrit-Ionen-Konzentration erfolgt, ähnlich der Griess-Ilosvay Methode, colorimetrisch. Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Bildung eines roten Azofarbstoffes, dessen Farbintensität sich proportional zur Konzentration des Nitrits in der Probe verhält. Nitrit diazotiert im sauren Milieu Sulfanilamid, dessen Diazoniumsalz mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamin-Dihydrochlorid kondensiert. Durch die bei dieser Reaktion entstehenden Azo-Verbindung bildet sich ein roter Farbkomplex in der Lösung. Die Farblösung kann bei einer Wellenlänge im Bereich von  $\lambda = 520 - 550$  nm gemessen werden (LANGE & VEJDĚLEK, 1980).

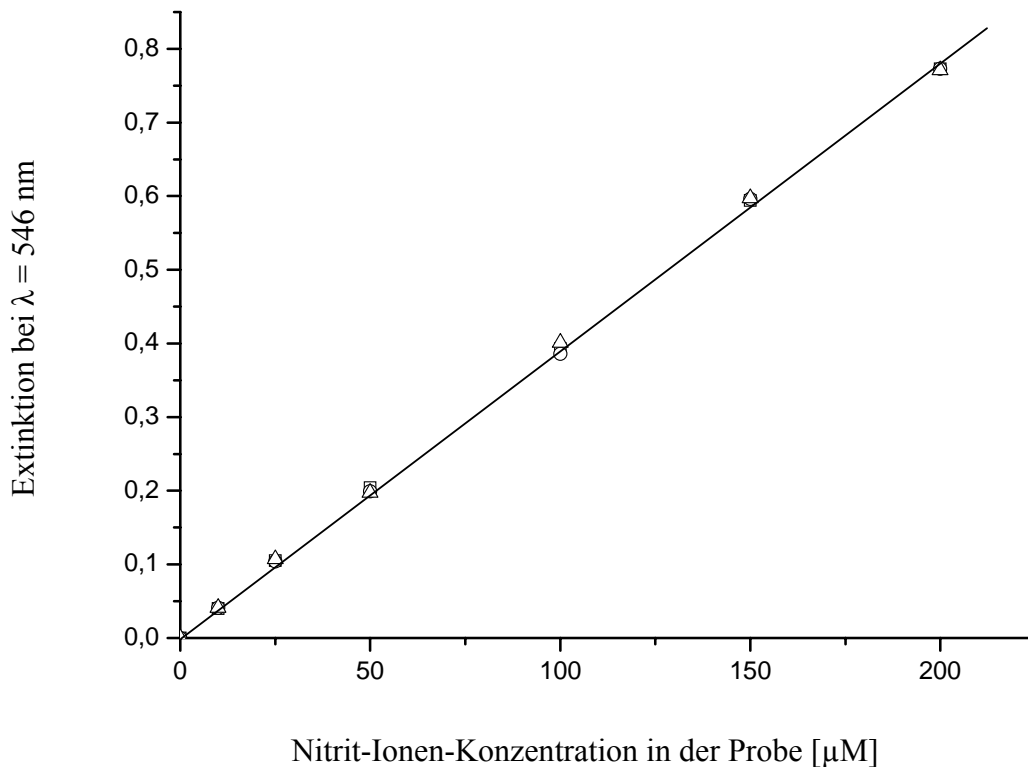
Verwendete Reagenzien:

Reagenz 1: 1 g Sulfanilamid wurde in 200 ml 2,4 N Salzsäure gelöst

Reagenz 2: 1,5 g N-(1-Naphthyl)ethyldiamin-Dihydrochlorid wurden in 500 ml 0,12 N Salzsäure gelöst

Beide Lösungen waren im Kühlschrank bei 4 °C bis zu 6 Wochen haltbar. Eine Standard-Nitritreihe mit Natriumnitrit, gelöst in bidestilliertem Wasser, mit den Konzentrationen 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 200  $\mu$ M bildete die Grundlage einer Eichgeraden. Die Standard-Lösungen lagerten in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen (Reaktionsgefäße, Brand, VWR International GmbH, Ismaning) bei -20 °C. Diese Standard-Lösungen konnten aufgrund der chemischen Instabilität der Nitrit-Ionen nur einmal aufgetaut werden und mußten sofort verwendet werden. In ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurden 150  $\mu$ l der zu testenden Lösung vorgelegt. Anschließend wurden 750  $\mu$ l von dem Reagenz 1 und 750  $\mu$ l von dem Reagenz 2 hinzupipettiert und der Ansatz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Dunkeln wurde aus dem Ansatz 1 ml Lösung entnommen und in eine 1 ml-Einwegküvette pipettiert. Die Messung der Extinktion des Ansatzes erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm gegen eine Blindprobe, in der die zu testende Lösung durch 150  $\mu$ l bidestilliertes Wasser ersetzt worden war. Um aus den gemessenen OD-Werten eine Nitrit-Ionen-Konzentration ermitteln zu können, wurde bei jeder Meßreihe eine Eichgerade in dreifacher Wiederholung aufgenommen (s. Abb. 2.1), wobei die Extinktionswerte gegen die jeweilige vorgegebene Nitrit-Ionen-Konzentration aufgetragen wurden. Verließ die Eichgerade für den Nachweis der Nitrit-Ionen-Konzentration zwischen den

Werten 10 und 200  $\mu\text{M}$  linear, konnten die Proben im Anschluß daran gemessen werden. Die untere Nachweisgrenze des Nitrit-Tests liegt bei 10  $\mu\text{M}$  Nitrit.



**Abb. 2.1: Eichgerade zur Ermittlung der Nitrit-Ionen-Konzentration;** Anzahl der Wiederholungen  $n = 3$ ; nach der Methode von SNELL & SNELL (1949)

### 2.6.5.5 Nitrat-Ionen-Konzentration (CATALDO et al., 1975)

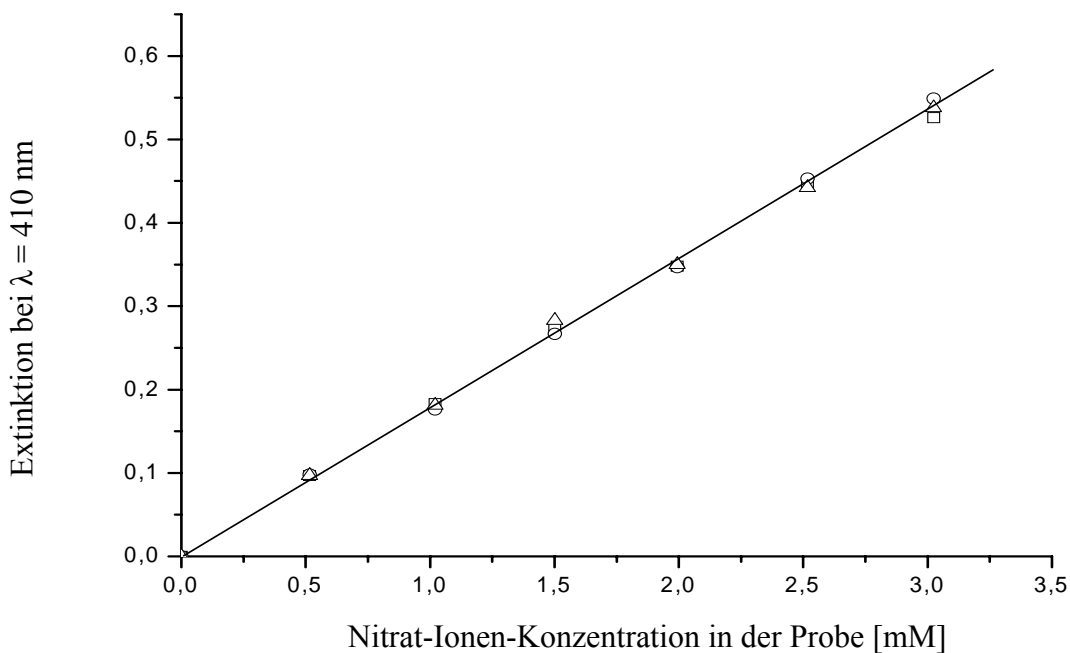
Die Kulturen der Nitrit-Oxidierer wurden über die Konzentrationsbestimmung des Stoffwechselproduktes Nitrat kontrolliert. Auch in diesem Fall erfolgte die Bestimmung der Nitratkonzentration photometrisch. Ähnlich wie beim Nachweis von Nitrit beruht das Prinzip des Nachweises von Nitrat auf der Bildung eines in diesem Fall gelben Farbstoffs, dessen Intensität proportional zur eingesetzten Menge an Nitrat zunimmt. Nitrat bildet mit Salicylsäure in Gegenwart von Schwefelsäure die gelb gefärbte 5-Nitrosalicylsäure, die ein Absorptionsmaximum im Bereich der Wellenlängen von  $\lambda = 410 - 420 \text{ nm}$  besitzt (LANGE & VEJDĚLEK, 1980).

Verwendete Reagenzien:

Reagenz 1: 2,5 g Salicylsäure wurden in 50 ml konzentrierter Schwefelsäure (95 – 98%) gelöst

Reagenz 2: 4 M Natriumhydroxid-Lösung

Reagenz 1 war im Kühlschrank bei 4 °C und in einer dunklen, lichtgeschützten Flasche bis zu 6 Wochen haltbar. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Standard-Nitratreihe mit Kaliumnitrat, gelöst in bidestilliertem Wasser, mit den Konzentrationen 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM und 3,0 mM angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Standard-Nitratreihe konnte wiederholt aufgetaut und eingefroren werden, ohne daß die Qualität der Lösungen nachließ. 100 µl der zu testenden Lösung wurden in ein Reagenzglas (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl des Reagenz 1. Der Ansatz wurde gut gemischt, um sich eventuell bildenden Niederschlag zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 4,5 ml von Reagenz 2 gestoppt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurde 1 ml Lösung entnommen und in eine 1 ml-Einwegküvette pipettiert. Die Messung der Extinktion des Ansatzes erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 410$  nm. Als Blindprobe diente ein Ansatz, in dem die Probenlösung durch 100 µl bidestilliertes Wasser ersetzt worden war. Bei jeder Meßreihe wurde eine Eichgerade in dreifacher Wiederholung aufgenommen (s. Abb. 2.2), um aus den gemessenen OD-Werten eine Nitrat-Ionen-Konzentration ermitteln zu können. Die Extinktionswerte wurden gegen die jeweilige vorgegebene Nitrat-Ionen-Konzentration aufgetragen. Die Proben konnten gemessen werden, wenn die Eichgerade für den Nachweis der Nitrat-Ionen-Konzentration zwischen den Werten 0,5 und 3,0 mM linear verlief. Die untere Nachweisgrenze des Nitrat-Tests liegt bei 0,5 mM Nitrat.



**Abb. 2.2: Eichgerade zu Ermittlung der Nitrat-Ionen-Konzentration;** Anzahl der Wiederholungen  $n = 3$ ; nach der Methode von CATALDO et al. (1975)

### 2.6.5.6 Protein-Konzentration (LOWRY et al., 1951; modifiziert nach HERBERT et al., 1971)

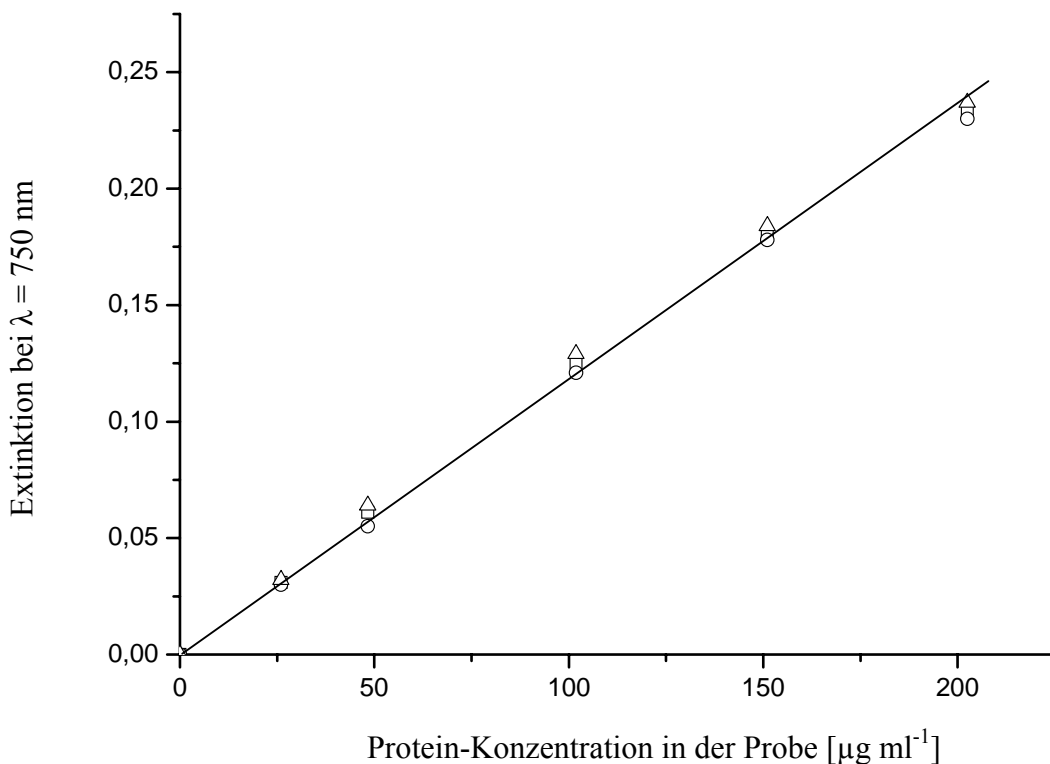
Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt. Es bildet sich hierbei der Farbstoff „Molybdänblau“, der sich wie beim Nitrit- und Nitrat-Nachweis proportional zur eingesetzten Proteinmenge verhält. Durch eine alkalische Hydrolyse der Bakterienzellen werden aus den Proteinen unter anderem die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan freigesetzt, die im alkalischen Milieu mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz einen blauvioletten Farbkomplex bilden. Zudem reduziert das Folin-Ciocalteu-Reagenz auch die in den Proteinen verbliebenen aromatischen Aminosäuren. Ein Zusatz von Kupfer(II)-sulfat erhöht die Farbintensität und die Empfindlichkeit der Reaktion, da die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit den Peptidbindungen der Proteine Chelatkomplexe bilden. Diese Chelatkomplexe erleichtern den Elektronenübergang zu den Heteropolysäuren des Folin-Ciocalteu-Reagenz. Das Absorptionsmaximum des Farbkomplexes liegt im Wellenbereich von  $\lambda = 745 - 750 \text{ nm}$  (BAST, 1999). Da auf Grund der geringen Vermehrungsrate der autotrophen Nitrifizierer nur kleine Proteinmengen erwartet wurden, wurde die Proteinbestimmung in einem „Halbmikro“-Ansatz durchgeführt. Dieser Ansatz hat den Vorteil, daß mit sehr geringen Probenmengen gearbeitet werden kann (HOLTZHAUER, 1997).

Verwendete Reagenzien:

Reagenz A	20 g Natriumcarbonat (wasserfrei) wurden in 1000 ml 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung gelöst
Reagenz B	1 g Kupfer (II)-sulfat-5-hydrat wurde in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst
Reagenz C	2 g Kaliumnatrium-Tartrat wurden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst
Reagenz D	Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz wurde mit bidestilliertem Wasser 1 : 1 verdünnt
Reagenz E	1 Vol. Reagenz B und 1 Vol. Reagenz C mischen, dann 50 Vol. Reagenz A zugeben
Reagenz F	0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung)

Reagenz D wurde lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, Reagenz E mußte für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt werden. Die Standard-Proteinreihe zur Erstellung einer Eichgeraden wurde mit Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in bidestilliertem Wasser, in den Konzentrationen  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  und  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  angesetzt. Die Standard-Proteinreihe konnte wiederholt aufgetaut und eingefroren werden, ohne daß die Qualität der Lösungen nachließ. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte mit 0,5 ml Bakterienkultur und 0,5 ml Natriumhydroxid. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurden aus dem Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Lösung in eine 1 ml-Einwegküvette vorgelegt. Um bei der geringen Probenmenge eine optimale Verteilung der Proteine zu erreichen, mußte als Trennmittel 100  $\mu\text{l}$  einer 0,1%igen (w/v) SDS-Lösung hinzupipettiert werden. Als anionisches Deter-

genz denaturiert die SDS-Lösung die Proteine soweit, daß sich die chemischen Strukturen der Proteine auflösen und diese in einheitlicher Form vorliegen. Im nächsten Schritt wurde 1 ml der Lösung E zugegeben. Der Ansatz wurde erneut gemischt und nach einer Wartezeit von 5 min wurden 100 µl der Lösung D (Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz) hinzugegeben. Die Einwegküvette wurde mit Parafilm (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verschlossen, der Ansatz durch Schütteln gemischt und anschließend zur Farbentwicklung für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion der Ansätze in den Küvetten wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750 \text{ nm}$  gemessen. Als Blindprobe dienten Ansätze, in denen die zu testende Lösung durch 100 µl bidestilliertes Wasser ersetzt worden war. Für die Bestimmung der Protein-Konzentrationen anhand der gemessenen OD-Werte wurde bei jeder Meßreihe eine Eichgerade in dreifacher Wiederholung aufgenommen (s. Abb. 2.3), wobei die Extinktionswerte gegen die jeweilige vorgegebene Protein-Konzentration aufgetragen wurden. Bei einem linearen Verlauf der Eichgerade zwischen den Werten 25 und 200 µg ml<sup>-1</sup> konnten die Proben anschließend gemessen werden. Die untere Nachweisgrenze des LOWRY-Protein-Tests liegt bei 10 µg Protein ml<sup>-1</sup>.



**Abb. 2.3: Eichgerade für die Bestimmung der Protein-Konzentration;** Anzahl der Wiederholungen  $n = 3$ ; Eichprotein = BSA; nach LOWRY et al. (1951), modifiziert nach HERBERT et al. (1971)



### 2.6.6 Reinheitskontrolle und Stammhaltung

Die Reinheitskontrolle der Bakterienkulturen, abgesehen von der Bakterienmischkultur aus dem Höglwald, fand in regelmäßigen Abständen während der Kultivierung durch mikroskopische Analysen der Zellen anhand des morphologischen Erscheinungsbildes statt. Die Beobachtung der lebenden Zellen erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop (Mikroskop Standard 16, Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer 1000fachen Vergrößerung und Ölimmersion. Neben der mikroskopischen Lebenduntersuchung wurden die Zellen der Kulturen auf Objektträger fixiert und nach einer Gram-Färbung (Gram Stain Kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) im Hellfeld betrachtet. Kulturen, in denen morphologisch bzw. von der einheitlichen Gram-Färbung abweichende Zellen zu finden waren, wurden als unrein gewertet, für die Versuche aussortiert und entsprechend entsorgt. Neben der mikroskopischen Reinheitskontrolle der Kulturen wurde zusätzlich eine makroskopische Kontrolle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* und *R. rhodochrous* regelmäßig auf neue Agarplatten ausgestrichen, und das Aussehen der vereinzelt Kolonien auf den Agarplatten auf Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Form, Farbe und Erscheinung überprüft. Die Untersuchung der Reinkulturen der autotrophen Nitrifizierer auf heterotrophe Kontaminationen erfolgte, indem regelmäßig neben der Aufnahme der Wachstumsparameter auch ein Aliquot der Flüssigkulturen auf Glucose-Hefeextrakt-Platten ausgestrichen wurde. Diese Agarplatten sind nach Inkubation über Nacht bei 28 °C auf heterotrophen Bewuchs hin kontrolliert worden. War Bewuchs vorhanden, wurde auf eine Kontamination der Flüssigkultur geschlossen und diese aus dem Versuchsprogramm genommen und entsorgt. Waren die Agarplatten nicht bewachsen, wurden sie für weitere 5 Tage inkubiert und ein zweites Mal geprüft. Waren die Agarplatten auch nach der zweiten Kontrolle frei von Bewuchs, konnte die jeweilige Flüssigkultur als eindeutig kontaminationsfrei angesehen werden. Die Beobachtungen der Agarplatten wurden unter einem Binokular (Carl Zeiss, Jena) mit einer 25fachen Vergrößerung durchgeführt.

Um bei Bedarf jederzeit frische Bakterienkulturen heranziehen zu können, wurden von den Bakterienstämmen Glycerin-Stammkulturen angelegt. Zu diesem Zweck wurde aus einer gut gewachsenen Flüssigkultur 1 ml Kulturmedium mit Zellen abpipettiert. Die Zellen wurden mit  $14000 \text{ U min}^{-1}$  bei 4 °C eine Minute lang abzentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 800 µl frischem, sterilem Medium gelöst und in ein Cryoröhrchen überführt, in das zuvor 250 µl einer 25%igen (v/v, in bidestilliertem Wasser), sterilen Glycerinlösung vorgelegt worden waren. Glycerin dringt leicht in die Zelle ein, stabilisiert die Hydrathülle um die Proteine, verhindert dadurch die Entwässerung und Aufkonzentration der Elektrolyte und trägt damit zu einem verlangsamten Wachstum von Eiskristallen bei. Nach vorsichtigem Mischen mit der Pipette erfolgte die Inkubation der Bakteriensuspension bei 28 °C für 30 –

45 min. Im Anschluß daran wurde das Cryoröhrchen mit der Bakteriensuspension in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Lagerung des Cryoröhrchen erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Tiefkühltruhe.

### 2.6.7 Inokulation der Fichtenkeimlinge

In den Jahren 2000 und 2001 fanden die Experimente zur Aufklärung des Besiedlungsvorgangs des Fichtennadel-Apoplasten durch die Inokulation der Fichtenkeimlinge, die im Labor an der Universität Freiburg herangezogen worden waren, statt. Für die Versuchsreihe im Jahr 2000 wurden die in der Bakterienmischkultur des Höglwaldes angereicherten autotrophen Nitrifizierer in einer Flüssigkultur herangezogen. Nachdem die 200 ml-Kultur ausgewachsen war, wurden die Bakterien in 6 Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Centrifuge Tube, Nalge Nunc International, Rochester, USA) überführt und bei  $10000\text{ U min}^{-1}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Stunde lang abzentrifugiert (Rotor JA 20; J2-21 Centrifuge Beckman<sup>®</sup>, Beckman Coulter GmbH, München). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 1 mM Kaliumphosphat-Puffer (1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 866  $\mu\text{l}$ ; 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 134  $\mu\text{l}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ : 999 ml; pH = 7,6) resuspendiert, gewaschen und ein weiteres mal bei  $10000\text{ U min}^{-1}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Puffers wurden die Bakterienpellets in 500  $\mu\text{l}$  1 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) aufgenommen und zur Aufkonzentrierung in 3 x 2 ml-Reaktionsgefäße (Reaktionsgefäße, Eppendorf, VWR International GmbH, Ismaning) zusammengeführt. Die Bakterienkonzentrationen in diesen Reaktionsgefäßen wurden über eine Neubauer-Zählkammer (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim) ermittelt. Im Anschluß daran fand die Einstellung der Bakteriensuspensionen auf die Konzentration von  $10^6$  Bakterien  $\text{ml}^{-1}$  statt. Diese eingestellten Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und für die Inokulation in einer Kühltasche, die mit Kühlakkus ausgestattet war, nach Freiburg transportiert. Im Freiburger Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie wurden die Bakteriensuspensionen steril in eine zuvor autoklavierte 200 ml-Kunststoff-Sprühflasche (VWR International GmbH, Ismaning) gegeben. Die Bakterienlösung wurde mit Sorgfalt auf die Fichtenkeimlinge aufgebracht, wobei darauf geachtet wurde, so dicht wie möglich an die Keimlinge heranzugehen, um den Verlust an Nitrifizierern so gering wie möglich zu halten. Ein Rest der Bakteriensuspension blieb in der Sprühflasche zurück, um im nachhinein anhand einer weiteren Auszählung die Bakterienkonzentration in der Sprühflasche zu kontrollieren. Zudem wurde mit der Sprühflasche ein Aliquot in eine sterile Petrischale (greiner labortechnik, Greiner GmbH, Frickenhausen) gesprüht und ebenfalls durch Auszählung kontrolliert, um eine Abschätzung vornehmen zu können, ob und wieviel Bakterien tatsächlich auf die Fichtenkeimlinge gesprüht worden waren. Unmittelbar an die Inokulation anschließend erfolgte die erste Probenahme der inokulierten Fichtennadeln. Für das Jahr 2001 fiel die Auswahl der Bakterien auf eine Reinkultur des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* an Stelle der Nitrifizierermischkultur aus dem Höglwald. Die erste Inokulation im Mai 2001 verlief nach

demselben Arbeitsschema wie im Jahr 2000. Aufgrund negativer Ergebnisse nach der Auswertung der ersten Probenahme mußte die Inokulation mit *N. europaea* im Juni 2001 ein weiteres Mal wiederholt werden.

## **2.7 Keimzahlbestimmung mit der „Most Probable Number“-Technik**

### **2.7.1 „Most Probable Number“-Technik**

Um die Gesamtzellzahlen und damit die Populationsgröße der autotrophen Nitrifizierer im Fichtennadelgewebe ermitteln zu können, erfolgte die Bestimmung über die Ermittlung der „höchstwahrscheinlichen Keimzahl“, der MPN-Technik (Most Probable Number). Diese klassische Methode wird vor allem bei Bakteriengruppen angewandt, die nur in Flüssigmedien zu kultivieren sind. Die MPN-Technik eignet sich besonders zur Bestimmung von sehr niedrigen Zellkonzentrationen. Der Nachweis der Bakterien erfolgt indirekt über die Untersuchung der mikrobiellen Stoffwechselaktivität und den chemischen Nachweis der Stoffwechselendprodukte. Die MPN-Methode liefert auf statistischem Wege einen Schätzwert der Keimkonzentration in einer Probe (ALEF, 1991).

### **2.7.2 Ansatz und Kultivierung**

#### **2.7.2.1 Aufarbeitung der Fichtennadel-Proben (PAPEN et al., 2002)**

Die Fichtennadeln wurden am selben Tag der Probenahme bzw. nach einer Lagerung bei 4 °C über Nacht unmittelbar am darauffolgenden Tag für die MPN-Ansätze aufgearbeitet. War dies nicht möglich, wurde auf Probenmaterial zurückgegriffen, das zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Tiefkühltruhe bei –80 °C gelagert worden war. Die Geräte und Lösungen wurden vor Arbeitsbeginn mit Eis vorgekühlt. Die Zerkleinerung der Fichtennadeln erfolgte mit einem handelsüblichen Küchenhäcksler „Speedy Pro Plus“ der Firma Krups, Solingen. Der Arbeitsbehälter, das Messer und der Deckel des Küchenhäckslers wurden nach der Sterilisation bis zur Verwendung mit Eis gekühlt. 10 g Fichtennadelprobe, bei den Proben der Fichtenkeimlinge aus Freiburg 2 – 10 g, wurden in einer sterilen Petrischale abgewogen und in den Arbeitsbehälter gefüllt. Nach Zugabe von 90 ml eiskaltem 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) fand die Zerkleinerung der Fichtennadeln 3 x für mind. 30 sec statt. Die zerkleinerte Probe wurde mit dem Puffer in einen sterilen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt. Dieser Kolben stellte bereits die erste Verdünnungsstufe dar. Im weiteren Verlauf wurden mit einer 10 ml-Glaspipette

jeweils 10 ml der vorherigen Verdünnungsstufe in einen weiteren Erlenmeyer-Kolben mit je 90 ml sterilem 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) pipettiert. So erfolgte die Verdünnung der Ansätze von Kolben zu Kolben um jeweils 1/10. Insgesamt gab es 5 Verdünnungsstufen. Aus den 5 Verdünnungsstufen wurden im Anschluß pro Verdünnungsstufe jeweils 5 Reagenzgläser (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim), die je 4,5 ml Nährmedium für die Nitrifizierer enthielten, mit je 500 µl der Fichtennadel-Lösung angimpft und mit Alukappen (Labocap, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verschlossen. Insgesamt wurden so 25 Kulturröhrchen für jede Fichtennadel-Probe beimpft. Zusätzlich wurden 5 Kontrollröhrchen, die statt mit der Fichtennadel-Lösung als Negativ-Kontrolle nur mit 500 µl des 1 M Kaliumphosphat-Puffers (pH = 7,6) versetzt waren, angesetzt. Jeder Ansatz erfolgte doppelt, so daß insgesamt für einen Ansatz zum Nachweis der Ammoniak-oxidierenden und der Nitrit-oxidierenden Bakterien 120 Kulturröhrchen benötigt wurden.

### **2.7.2.2. Kulturbedingungen der MPN-Ansätze**

Um gleichbleibende Kulturbedingungen zu garantieren und eine bestmögliche Entwicklung der autotrophen Nitrifizierer in den MPN-Röhrchen zu gewährleisten, wurden die inokulierten MPN-Röhrchen bei 28 °C für mindestens 8 Wochen inkubiert. Um einen allzu großen Verlust des Kulturmediums durch Verdunstung zu vermeiden und eine Kultivierung ohne Licht zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in einer Zarges – Aluminium-Kiste (ZARGES GmbH & Co.KG, Weilheim) inkubiert. Die Reagenzgläser wurden einmal in der Woche geschüttelt (Reagenzglasschüttler Heidolph REAX 2000, Stuttgart), um aerobe Bedingungen zu gewährleisten (PAPEN & VON BERG, 1998).

## **2.7.3 Keimzahlbestimmung**

### **2.7.3.1 Chemische Nachweise der Stoffwechselendprodukte**

Die Auswertung der MPN-Ansätze erfolgte alle zwei Wochen durch die Untersuchung auf das Vorhandensein von Nitrit und Nitrat in den einzelnen MPN-Kulturröhrchen. Während die Röhrchen der Nitrit-Oxidierer nur auf Nitrat getestet wurden, wurden die Kulturröhrchen, in denen die Ammoniak-Oxidierer heranwuchsen, sowohl auf Nitrit als auch auf Nitrat getestet, um mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer nachweisen zu können.

Für den Nachweis auf Nitrit ist der unter 2.6.5.4 beschriebene Test auf Nitrit in abgewandelter Form angewendet worden. Zu jeweils 100 µl Kulturmedium, die in 1 ml-Einwegküvetten vorgelegt worden waren, wurden 250 µl Sulfanilamid-Lösung und im Anschluß 250 µl der N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-Dihydrochlorid-Lösung hinzugegeben und mit der Pipette gemischt.

Der Ansatz wurde für 10 min im Dunkeln inkubiert. Für die optische Auswertung wurden alle Küvetten, die eine leicht rosa bis deutlich rot gefärbte Lösung im Vergleich zur ungefärbten Negativkontrolle enthielten, als Nitrit-positiv gewertet, d.h. die Kulturröhrchen, aus denen das positiv getestete Kulturmedium stammte, enthielten Ammoniak-Oxidierer.

Der Nachweis auf Nitrat wurde mit Nitrat-Teststäbchen der Firma VWR international GmbH, Ismaning, durchgeführt. Bei den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer wurden 50 µl des Kulturmediums direkt auf die Prüffelder der Teststäbchen aufgetragen. Bei den Kulturröhrchen der Nitrit-Oxidierer mußte zuerst das Nitrit, welches als Ausgangssubstrat für die Nitrit-Oxidierer diente, mit einer 10%igen (w/v) wäßrigen Amidoschwefelsäure-Lösung neutralisiert werden. Zu diesem Zweck wurden zu 100 µl Kulturmedium 20 µl Amidoschwefelsäure zugegeben, gemischt und aus diesem Ansatz 50 µl auf die Prüffelder der Teststäbchen pipettiert. Bei einer rosa bis roten Verfärbung des Nitrat-Prüffeldes und einem farblosen Kontrollfeld wurde davon ausgegangen, daß das entsprechende Kulturröhrchen mit Nitrit-Oxidierern bewachsen war. Die untere Nachweisgrenze der Nitrat-Teststäbchen liegt bei 10 mg l<sup>-1</sup> Nitrat.

### 2.7.3.2 Statistische Auswertung

Die Ermittlung der Bakterienzellzahlen in den Fichtennadelproben erfolgte auf statistischem Wege durch die Auswertung der positiv gewerteten Kulturröhrchen der MPN-Ansätze. Hierzu fanden die Tabellen von DE MAN (1977 & 1983) Anwendung. Die positiv gewerteten Röhrchen wurden pro Verdünnungsstufe aufsummiert. Mit den aufsummierten, in drei aufeinander folgenden Verdünnungsreihen sich ergebenden Zahlen wurde eine Zahlenkombination ermittelt.

Beispiel:

	Summe der positiven Röhrchen	
10 <sup>-1</sup> -Verdünnung:	4	positive Röhrchen
10 <sup>-2</sup> -Verdünnung:	3	positive Röhrchen
10 <sup>-3</sup> -Verdünnung:	2	positive Röhrchen
10 <sup>-4</sup> -Verdünnung:	1	positive Röhrchen
10 <sup>-5</sup> -Verdünnung:	0	positive Röhrchen

} Zahlenkombination

Anhand der Zahlenkombination, im Beispiel **210**, wurde über die Tabellen eine Stichzahl ermittelt; im Beispielfall: 0,68.

Diese Stichzahl wurde nun zur Berechnung der höchstwahrscheinlichen Bakterienzahl pro g Nadelfrischgewicht herangezogen. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Formel [2]:

$$\frac{\text{Stichzahl} \times V \times a \times b \times d}{c} = \text{Zahl der Bakterien g}^{-1} \text{ Nadelfrischgewicht} \quad [2]$$

- V = Verdünnungsstufe der ersten Zahl der Zahlenkombination
- a = Volumen des Inokulums der aufgeschlossenen Nadel-Probe je Röhrchen
- b = eingesetzter Puffer im Verdünnungskolben
- c = Nadeleinwaage in g
- d = Berücksichtigung der ersten Verdünnungsstufe bei der Nadelzerkleinerung

Für das Beispiel ergibt sich daraus:

$$\frac{0,68 \times 1000 \times 0,5 \text{ ml} \times 90 \text{ ml} \times 10}{10 \text{ g}} = 30600 \text{ Bakterien g}^{-1} \text{ Nadelfrischgewicht}$$

Zusätzlich zur höchstwahrscheinlichen Bakterienzahl wurde das 95%-Konfidenzintervall berechnet. Dieses Intervall gibt eine obere und untere Bakterienanzahl an. Innerhalb dieser oberen und unteren Bakterienanzahl liegt die ermittelte Zellzahl der Bakterien mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. Die Berechnung der oberen und unteren Bakterienanzahl erfolgte mit der Formel [2], die dazu erforderlichen Stichzahlen sind in den Tabellen bei der jeweiligen Stichzahl der positiv gewerteten Röhrchen mit angegeben.

Für das Beispiel folgt daraus:

Stichzahl untere Grenze:	0,19
Stichzahl obere Grenze:	1,70

Mindestanzahl der Bakterien:	8550 Bakterien g <sup>-1</sup> Nadelfrischgewicht
höchstwahrscheinliche Zahl:	30600 Bakterien g <sup>-1</sup> Nadelfrischgewicht
Höchstanzahl der Bakterien:	76500 Bakterien g <sup>-1</sup> Nadelfrischgewicht

Die „höchstwahrscheinliche“ Bakterienzahl beträgt  $3,06 \times 10^4$  Bakterien. Die Mindestanzahl der Bakterien in der Fichtennadelprobe liegt bei  $8,5 \times 10^3$  Bakterien je g Nadelfrischgewicht. Mehr als  $7,6 \times 10^4$  Bakterien je g Nadelfrischgewicht sind nicht zu erwarten. Die „tatsächliche“ Bakterienzahl liegt mit 95%iger Wahrscheinlichkeit im Bereich zwischen  $8,5 \times 10^3$  bis  $7,6 \times 10^4$  Bakterien je g Nadelfrischgewicht und beträgt „höchstwahrscheinlich“  $3,06 \times 10^4$  Bakterien je g Nadelfrischgewicht.

## 2.8 Detektion der autotrophen Nitrifizierer über die Polymeraseketten-Reaktion

Bei der Polymeraseketten-Reaktions-Technik (PCR), die 1985 von Kary Mullis entwickelt worden ist (SAIKI, 1985), handelt es sich um eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte (DNA-Abschnitte), die von zwei Desoxyribonukleinsäure-Molekülen kurzer Bauart und bekannter Basen-Sequenz eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Über die Amplifikation von Gensequenzen, die für bestimmte Bakterien-Arten bzw. -Gruppen spezifisch sind, kann man aus unterschiedlichen Proben den direkten Nachweis auf das Vorhandensein bestimmter Bakteriengruppen bzw. -Arten führen.

### 2.8.1 Nukleinsäure-Isolierungen

Zur Durchführung der PCR-Technik benötigt man zunächst Nukleinsäuren, welche die DNA-Sequenzen enthalten, die man vervielfältigen will. Für die Isolierung von Nukleinsäuren wurden je nach Organismus, der zu isolierenden Nukleinsäure und der zu erwartenden Menge unterschiedliche Methoden verwendet, um eine möglichst hohe und saubere Ausbeute an Nukleinsäuren zu erhalten.

#### 2.8.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Für die Isolierung genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien (PELLICER et al., 1978, modifiziert) wurde zunächst 1 ml einer herangewachsenen Bakterienkultur bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 min in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluß daran wurde das Bakterien-Pellet mit 1 ml 12 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) resuspendiert und die Zellen erneut abzentrifugiert ( $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min). Der Puffer wurde abpipettiert, so daß nur das Bakterien-Pellet zurückblieb. Die Bakterienzellen wurden unter Zugabe von  $10 \text{ } \mu\text{l}$  1 M Tris-HCl (pH = 7,4),  $20 \text{ } \mu\text{l}$  0,5 M EDTA (pH = 7,4),  $100 \text{ } \mu\text{l}$  Lysozym ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) und  $870 \text{ } \mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser resuspendiert. Für den Zellaufschluß mußten  $50 \text{ } \mu\text{l}$  SDS (10%, w/v) hinzugegeben werden. Der Zellaufschluß erfolgte durch Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h im Heizblock. Für jeden Milliliter Zell-Lysat wurden zur späteren DNA-Fällung  $30 \text{ } \mu\text{l}$  NaCl (5 M) hinzuzupipettiert. Im weiteren Verlauf wurde das Zell-Lysat durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte im ersten Schritt durch die Zugabe eines gleichen Volumenteils eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1, v/v, pH = 7,5 – 8,0). Die Probe durfte nur vorsichtig gemischt, nicht geschüttelt werden, da die starken Scherkräfte beim Schütteln mit einem Reagenzglasschüttler die genomische DNA zer-

stören würden. Die Trennung der organischen Lösungsmittelphase von der wässrigen Phase erfolgte durch eine langsame Zentrifugation (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) mit  $5000 \text{ U min}^{-1}$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und für 10 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, folgte ein zweiter Aufreinigungsschritt, bei dem ein gleicher Volumenteil eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1, v/v) zugegeben, wieder sanft gemischt und abzentrifugiert ( $5000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min) wurde. Die wässrige Phase wurde erneut in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Anschluß daran erfolgte die Fällung der DNA durch Alkohol. Hierzu wurde 100%iges Isopropanol verwendet, welches DNA bei geringerem Volumeneinsatz weit effektiver fällt als Ethanol. Die wässrige Phase wurde mit einem Volumenteil Isopropanol versetzt und der Ansatz sanft gemischt. Die Fällung der DNA benötigte mindestens 1 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und für 30 min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das DNA-Pellet mit  $300 \mu\text{l}$  70%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation ( $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min) wurde das Rotisol<sup>®</sup> abpipettiert, so daß das feuchte DNA-Pellet zurückblieb. Dieses konnte nun für etwa 5 – 10 min bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) getrocknet werden. Im weiteren Verlauf schloß sich eine Aufreinigung der isolierten Nukleinsäure an.

Da Gram-positive Bakterien einen stabileren Zellwand-Aufbau aufweisen als Gram-negative Bakterien, erfolgte die Isolierung der genomischen DNA über eine modifizierte Methode nach BERTRAM & DÜRRE (1989), um die Aktivität der Nukleasen zu unterbinden. Auf das für die Proteinentfernung in der Methode zur Isolierung der DNA aus Gram-negativen Bakterien verwendet Phenol/Chloroform-Gemisch konnte verzichtet werden. Zunächst wurde auch hier das Bakterien-Pellet aus 1 ml Kulturvolumen mit einem 12 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7,6) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte durch die Zugabe von  $190 \mu\text{l}$  STE-Puffer (6,7%, w/v, Saccharose; 50 mM Tris; 1 mM EDTA, pH = 8,0) und  $190 \mu\text{l}$  Lysozym-Lösung ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Die Inkubation dauerte 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Heizblock. Anschließend wurden  $140 \mu\text{l}$  SDS-Lösung zugegeben (10%, w/v) und der Ansatz für 10 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Es schlossen sich die Zugabe von  $120 \mu\text{l}$  0,5 M EDTA,  $10 \mu\text{l}$  1 M Tris-HCl (pH = 8,0) und die Mischung des Ansatzes an. Um Proteine aus dem Ansatz zu entfernen und das Lysozym zu neutralisieren, wurden  $50 \mu\text{l}$  einer Proteinase K-Lösung ( $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) hinzugegeben und der Ansatz wiederum für 3 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Heizblock inkubiert. Für die Denaturierung der Proteinase K wurden im Anschluß  $300 \mu\text{l}$  einer 5 M Natrium-Perchlorat-Lösung hinzugegeben. Es folgte die Aufreinigung und Extraktion des Ansatzes von Proteinresten durch die Zugabe von 1 Volumenteil eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1, v/v). Der Ansatz wurde sanft gemischt und abzentrifugiert ( $5000 \text{ U min}^{-1}$ , 10 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, und es erfolgte eine weitere Aufreinigung mit



Chloroform/Isoamylalkohol. Die Fällung der DNA und die Trocknung des Pellets erfolgte wie in der Methode bei den Gram-negativen Bakterien beschrieben (s.o.).

### 2.8.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Fichtennadeln (DOYLE & DOLYE, 1990)

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem Fichtennadelmaterial und gleichzeitig für die Isolierung der bakteriellen DNA im Nadelgewebe erfolgte nach der Methode von DOYLE & DOYLE (1990). Diese basiert auf der Auflösung zellulärer Strukturen in der Gegenwart des starken Detergenz N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB). Nukleinsäuren bleiben unbeschadet, während Proteine, die die Nukleinsäuren schädigen können, größtenteils denaturiert werden. Die CTAB-Lösung (2%, w/v N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1%, w/v Polyvinylpyrrolidon 40; 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol – jeweils frisch zugeben) - je Nadelprobe 4 ml in einem 15 ml-Kunststoffreagenzröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) - wurde in einem Wasserbad auf 50 °C vorgewärmt. In einem Mörser (VWR International GmbH, Ismaning), der zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühlt worden war, wurde etwas flüssiger Stickstoff vorgelegt, in den 1 g Fichtennadel-Material gegeben wurde. Nach dem Einfrieren wurden die Fichtennadeln zunächst vorsichtig mit einem passenden, vorgekühlten Pistill zerstoßen und kurz bevor der Stickstoff verdunsten konnte, zu einem feinen Pulver verrieben. Dieses feine Pulver mußte dann sehr schnell mit einem kühlen Spatel zu den 4 ml der vorgewärmten CTAB-Lösung gegeben werden. Die CTAB-Lösung wurde bei 50 °C für 20 min im Wasserbad inkubiert und regelmäßig geschüttelt. Nach 20 min wurden zur CTAB-Lösung für die Aufreinigung des Ansatzes 1 Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugegeben und der Ansatz erneut gründlich gemischt. Es erfolgte die Trennung der wässrigen von der organischen Phase durch eine Zentrifugation bei  $5000 \text{ U min}^{-1}$ , 4 °C und für 10 min (Rotor JA20.1; J2-21 Centrifuge Beckman<sup>®</sup>, Beckman Coulter GmbH, München). Die wässrige Phase wurde in ein neues 15 ml-Reagenzröhrchen überführt. Der Aufreinigungsschritt mit Chloroform/Isoamylalkohol mußte ein weiteres Mal durchgeführt werden. Im Anschluß folgte die Fällung der genomischen DNA durch die Zugabe eines Volumenteils Isopropanols über Nacht. Nach der Fällung wurde die DNA bei  $7000 \text{ U min}^{-1}$ , 4 °C und für 1 h abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das restliche Isopropanol abpipettiert. Das Pellet wurde mit 500  $\mu\text{l}$  70%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> gewaschen und erneut abzentrifugiert ( $7000 \text{ U min}^{-1}$ , 4 °C, 15 min). Es folgte die Aufreinigung des DNA-Pellets.

### 2.8.1.3 Reinigung und Konzentration der genomischen DNA

Um die isolierte, genomische DNA eindeutig charakterisieren zu können, mußte aus dem Nukleinsäure-Pellet die Ribonukleinsäure (RNA) entfernt werden, die durch die Isolierung zu-

sammen mit der DNA das Nukleinsäure-Pellet bildete. Der Anteil der RNA kann im Pellet bis zu 90% betragen. Zu den isolierten Nukleinsäure-Pellets wurden jeweils 300 µl des Puffers P1 (1 M Tris-HCl, pH = 8,0; 0,5 M EDTA, pH = 8,0; 100 µg ml<sup>-1</sup> RNase, Lagerung bei 4 °C möglich) hinzugegeben. Bei diesem Schritt konnten die Pellets aus der Isolierung der pflanzlichen Nukleinsäure aus den 15 ml-Reagenzröhrchen in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt werden. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Heizblock bei 37 °C für 1 h. Zu den Ansätzen wurden 60 µl Proteinase K-Lösung (2,5 mg ml<sup>-1</sup>) zugegeben, um die RNase zu eliminieren, und die Ansätze wurden für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der Ansätze erfolgte wiederum mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (s.o. 2.8.1.1). Damit die Fällung der aufgereinigten DNA vollständig erfolgen konnte, wurden in jeden Ansatz 40 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH = 5,0) und für die Fällung das 2,5fache Volumen 100%igen Ethanols zupipettiert. Die Fällung erfolgte bei -20 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Ansätze abzentrifugiert (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 30 min), das Ethanol entfernt und die aufgereinigten DNA-Pellets mit 70%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand verworfen, das restliche Rotisol<sup>®</sup> vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das feuchte Pellet in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur für 5 – 10 min getrocknet. Die Aufnahme der gereinigten DNA-Pellets erfolgte in 300 µl 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5). Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.8.2 Die Polymeraseketten-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Abschnitten**

Neben der genomischen DNA, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz enthält, werden zur Durchführung der PCR zwei Oligodesoxynukleotide mit bekannter Basenabfolge benötigt, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz einrahmen.

#### **2.8.2.1 Auswahl der Oligodesoxynukleotide für die PCR**

Viele Bakterien lassen sich nicht im Labor kultivieren, so daß diese durch die Isolierung der genomischen DNA aus den Umweltproben direkt nachgewiesen werden müssen (BROCK, 1987). Mit der PCR-Technik steht eine Methode zur Verfügung, mit der eine taxonomische Bestimmung und Einordnung dieser Bakterien aus den Umweltproben möglich ist. Zu diesem Zweck werden Oligodesoxynukleotide entweder für 16S rRNA-Gene oder für spezifische Strukturgene, die nur für eine bestimmte Bakteriengruppe charakteristisch sind, benötigt. Besonders der Nachweis über das 16S rRNA-Gen hat den Vorteil, daß die detektierten Bakterien bestimmten Gruppen in den phylogenetischen Stammbäumen, die auf einer Zuordnung der 16S rRNA-

Gene der Organismen zueinander beruhen und die die Grundlage einer phylogenetischen Zuordnung bilden, zugewiesen werden können (WOESE, 1987; WOESE et al., 1985). So können Bakterien, die nur in Umweltproben zu finden sind, verwandtschaftlich zugeordnet werden, ohne diese kultivieren zu müssen. Das 16S rRNA-Gen besitzt neben konservativen Nukleinsäureabschnitten, die weitgehendst bei allen Organismen gleich aufgebaut sind, auch variable und hochvariable Bereiche, die in ihrer Basenabfolge der Nukleotide nur mit einigen wenigen nah verwandten Organismen übereinstimmen. Aus diesen variablen Bereichen wurden komplementäre Basenabfolgen für die Herstellung der künstlichen, kurzen, etwa 20 Basenpaare langen Oligodesoxynukleotide ausgewählt, die zur Detektion der Ammoniak- bzw. Nitrit-Oxidierer dienen. Zur Auswahl neuer Oligodesoxynukleotide wurden zunächst verschiedene Gen-Datenbanken auf ihre Verwendungsfähigkeit und ihren aktuellen Stand hin untersucht. Eine List der Datenbanken war unter der Adresse „<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/BioSearch/bioinf/searchtheme.cgi?themeid=81>“ im Internet zu finden. Es stellte sich heraus, daß die Gen-Datenbanken „DNA Data Bank of Japan“ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), „GenBank Database“ des „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und „The EMBL Nucleotide Sequence Database“ ([http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_docs/embl\\_db/ebi/topembl.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db/ebi/topembl.html)) am umfangreichsten sind, täglich aktualisiert und abgeglichen werden und denselben Datenbestand aufweisen. Aufgrund der größeren Übersichtlichkeit wurde auf die Datenbank „GenBank Database“ des NCBI zurückgegriffen. Im zweiten Schritt wurden alle Gattungen der autotrophen Nitrifizierer mit dem „Taxonomy Browser“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>) des NCBI herausgesucht. Aus diesen Gattungen wurden diejenigen Organismen, die mindestens mit dem Gattungsnamen eindeutig bezeichnet worden waren, ausgewählt. Von diesen ausgewählten Organismen wurden nun wiederum alle vorhandenen DNA-Datensätze aufgelistet und nach DNA-Datensätzen des 16S rRNA-Gens durchsucht. Diese 16S rRNA-Gendatensätze wurden aufgerufen, die DNA-Sequenzdaten kopiert und zur späteren Verwendung abgespeichert. Die gespeicherten DNA-Sequenzen lagen in Form des nicht codierenden DNA-Einzelstranges vor. Für eine vollständige Analyse der DNA-Sequenzen wurde jedoch auch der codierende DNA-Gegenstrang zu dem nicht codierenden DNA-Einzelstrang benötigt. Daher mußten alle DNA-Sequenzen mit dem Software-Programm „WebCutter“, einem Programm zur Ermittlung der Schnittstellen von Restriktionsenzymen im DNA-Strang und Gegenstrang, bearbeitet werden. Mit Hilfe dieses Programmes können die nicht codierenden DNA-Einzelstränge zu DNA-Doppelstränge vervollständigt werden. Das Programm „Web-Cutter“ ist im Internet unter der Adresse „<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>“ zu finden und wird von dem Baylor College of Medicine, Houston, USA (SMITH et al., 1996) betrieben. Sowohl die nicht codierenden DNA-Einzelstränge als auch die DNA-Doppelstränge der 16S rRNA-Gene wurden anschließend abgespeichert. Die Auswahl neuer Oligodesoxynukleotide erfolgte über diese abgespeicherten 16S rRNA-DNA-Sequenzen. Die nicht codierenden DNA-Einzelsträngen der ver-

schiedenen Arten wurden in ein Dokument kopiert und mit dem Programm „CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments“ gegeneinander abgeglichen, um herauszufinden, welche Basenbereiche der nicht codierenden DNA-Einzelstränge miteinander übereinstimmten. Aus diesen Basenbereichen wurden dann die verschiedenen Oligodesoxynukleotide mit einer Länge von etwa 20 Basenpaaren ausgewählt und mit dem Programm „Blast-Search“ des NCBI (ALTSCHUL, 1990) mit allen Gensequenzen, die in der Gendatenbank „GenBank“ vorhanden waren, abgeglichen. Wenn der Abgleich der Oligodesoxynukleotide mit der Gendatenbank nur 16S rRNA-DNA-Sequenzen der gesuchten Gattungen der Nitrifizierer ergab, wurden die Oligodesoxynukleotide als spezifisch angesehen und wurden für die PCR ausgewählt. Wurden Übereinstimmungen mit anderen Bakterienarten bzw. -gruppen angezeigt, konnten diese Oligodesoxynukleotide nicht als spezifisch genug angesehen werden, und die Auswahl wurde verworfen. Die aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotide wurden entsprechend überprüft. Im weiteren Verlauf wurden nun die Bindungsstellen der Oligodesoxynukleotide in jeder einzelnen DNA-Sequenz ermittelt und in den gespeicherten Datensätzen markiert, um einen Überblick über die Verwendbarkeit zu erhalten. Bis zum Frühjahr 2002 konnten insgesamt 288 16S rRNA-DNA-Sequenzen, 226 für die Ammoniak-Oxidierer und 59 für die Nitrit-Oxidierer, bearbeitet, überprüft und gespeichert werden. Die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.2 aufgelistet und wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

**Tab. 2.2: ausgewählte Oligodesoxynukleotide für die PCR;** die Lage im 16S rRNA-Molekül bezieht sich auf die Basen-Numerierung des 16S rRNA-Moleküls von *E. coli.*; f: forward: 5'-Vorwärtsrichtung; r: reverse: 3'-Rückwärtsrichtung

Bezeichnung der Oligodesoxynukleotide	Basensequenz (5' → 3')	Lage im 16S rRNA-Molekül	Konzentration	Referenz
<i>Ammoniak-Oxidierer der β-Untergruppe der Proteobacteria</i>				
CTO 189fA/B CTO 189fC RT1r	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G GGA GGA AAG TAG GGG ATC G CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	189-207 189-207 283-304	300 nM 300 nM 300 nM	HERMANSSON et al. (2001)
<i>Nitrobacter sp.</i>				
Nw f Nw r	CGG AGC ATG GAG CAC AGG CCC CTT TGC TTC CCA TTG	1035-1052 1253-1270	300 nM 300 nM	diese Arbeit diese Arbeit
FGPS872 FGPS1269'	CTA AAA CTC AAA GGA ATT GA TTT TTT GAG ATT TGC TAG	872-891 1277-1294	300 nM 300 nM	DEGRANGE et al. (1995)

Die PCR-Amplifikate, die von diesen Oligodesoxynukleotid-Paaren umschlossen werden, besitzen folgende Längen:

Ammoniak-Oxidierer:	116 Basenpaare
<i>Nitrobacter</i> : Nw f / Nw r	236 Basenpaare
FGPS872 / FGPS1269'	397 Basenpaare

### 2.8.2.2 PCR-Anwendungen

Nach der Isolierung der genomischen DNA als Gen-Vorlage für die PCR und der Auswahl der Oligodesoxynukleotide – auch Primer genannt - für die Spezifizierung des zu amplifizierenden Gens aus der genomischen DNA mußten nun die PCR-Reaktionsbedingungen ermittelt werden und sowohl für den Nachweis der Ammoniak-Oxidierer als auch den Nachweis der Nitrit-Oxidierer optimiert werden. Die hierzu benötigten Reagenzien wurden alle von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen. Als DNA-Polymerase wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* verwendet, die zur Stabilisierung der Molekülstruktur während des Denaturierungsschrittes bei 94 °C mit dem Detergenz W-1, dessen Zusammensetzung der Hersteller nicht bekannt gegeben hat, versetzt wurde. Die Menge der genomischen DNA, die in den Ansatz eingesetzt wurde, hing von der Konzentration und der Reinheit der isolierten genomischen DNA ab. Als optimal erwies sich der in Tabelle 2.3 wiedergegebene PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 50 µl.

**Tab. 2.3: Optimierter Standard-Ansatz für die PCR der autotrophe Nitrifizierer**

Reagenzien und Konzentration der Stammlösung	Ammoniak-Oxidierer		Nitrit-Oxidierer	
	Eingesetztes Volumen [µl]	Endkonzentration in 50 µl	Eingesetztes Volumen [µl]	Endkonzentration in 50 µl
Reaktionspuffer (10x)	5	1 x	5	1 x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4	4 mM	3	3 mM
Detergenz W-1 (1%)	2,5	5%	2,5	5%
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	0,6	3 U	0,6	3 U
DNA-Vorlage (20 – 100 ng µl <sup>-1</sup> )	0,5 – 1,5	1 ng µl <sup>-1</sup>	0,5 – 1,5	1 ng µl <sup>-1</sup>
dNTP-Gemisch (10 mM)	1	200 µM	1	200 µM
5'-Vorwärts-Primer (45 µM)	2	0,3 µM	1	0,3 µM
3'-Rückwärts-Primer (45 µM)	1	0,3 µM	1	0,3 µM
bidestilliertes Wasser	ad 50 µl		ad 50 µl	

Die PCR-Ansätze wurden bis auf die einzusetzende DNA-Vorlage jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert (Master Mix), um eine bessere Durchmischung der Reagenzien zu erreichen, und im Anschluß auf die entsprechenden 0,2 ml-Reaktionsgefäße (PCR-Gefäße,

Brand, VWR International GmbH, Ismaning) verteilt, in welche die DNA-Vorlage pipettiert war. Zur Amplifikation wurden alle PCR-Ansätze in einen Trio-Thermoblock™ (Biometra®, Göttingen) gesetzt, der folgendes Programm eingespeichert hatte:

1 Zyklus	Denaturierung des Ansatzes	94 °C	3 min
43 Zyklen	Denaturierung	94 °C	45 sec
	Annealing	60 °C	30 sec
	Polymerisation	72 °C	1 min 30 sec
1 Zyklus	Amplifikation	72 °C	10 min
Abschluß	Lagerung	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Als Kontrollen dienten PCR-Ansätze, in denen statt der zu amplifizierenden DNA-Vorlage nur bidestilliertes Wasser mit gleichen Volumen zugegeben wurde, sowie Ansätze, in denen jeweils nur ein Oligodesoxynukleotid-Primer, entweder in der 5'-Vorwärts-Richtung oder der 3'-Rückwärts-Richtung, eingesetzt wurde. Die Überprüfung der PCR-Amplifikate erfolgte im Anschluß an eine Aufreinigung über die Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.8.2.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Um die PCR-Produkte schnell und effizient aufzureinigen, erfolgte die Reinigung mit dem „NucleoSpin® Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren. Durch die Aufreinigung wurden die niedermolekulare DNA und der Überschuß der in der PCR-Reaktion nicht verbrauchten Oligodesoxynukleotide aus dem Ansatz entfernt. Für die Reinigung fand das Protokoll des Herstellers Anwendung. PCR-Ansätze, die ein Volumen von weniger als 50 µl aufwiesen, mußten zunächst mit einem Tris-HCl-EDTA-Puffer (TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH = 7,5) aufgefüllt werden. Anschließend wurden 4 Volumenteile des vom Hersteller mitgelieferten Puffers NT2 zu einem Volumenteil des PCR-Ansatzes hinzugegeben und mit der Pipette gemischt. Nachdem die „NucleoSpin®“-Säule und das Sammelreaktionsgefäß zusammengesteckt worden waren, wurde der komplette PCR-Ansatz auf die Säule aufgetragen und bei 14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C und 1 min abzentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und die Trennsäule behalten werden. Nun wurden 600 µl des Puffers NT3 auf die Säule gegeben und abzentrifugiert (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 1 min). Der Überstand wurde wieder entfernt und zur Wiederholung weitere 200 µl des Puffers NT3 aufgetragen. Um den Puffer NT3 vollständig aus der Trennsäule zu entfernen, erfolgte die Zentrifugation bei 14000 U min<sup>-1</sup> und 4 °C nun für 2 min. Die Trennsäule wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, daß sie nicht mit dem Puffer NT3 in Kontakt kam. Um die aufgereinigten PCR-Ansätze von den

Trennsäulen zu entfernen, wurden 50 µl Elutionspuffer NE auf die Säulen aufgetragen und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde durch eine Zentrifugation bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 min die PCR-Lösung aus der Säule entfernt und in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die auf diese Weise gereinigten PCR-Ansätze wurden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und für die Klonierung zur Sequenzierung verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Puffer NT2, NT3 und NE wird vom Hersteller nicht bekanntgegeben.

### 2.8.3 Charakterisierung von Nukleinsäuren

Zur näheren Charakterisierung der isolierten und aufgereinigten Nukleinsäuren und der PCR-Amplifikate wurde für die qualitative Kontrolle die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurden anhand der Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt.

#### 2.8.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Bestimmung der Größe und der Reinheit der isolierten Nukleinsäure sowie der PCR-Amplifikate. Für die Gelelektrophorese wurden Kammern und Gelhalter eigener Bauart aus 5 mm dickem Plexiglas<sup>®</sup> (Sahlberg GmbH & Co., München) verwendet. Diese Kammern haben die Maße  $26 \times 13 \times 5,5 \text{ cm}$  ( $l \times b \times h$ ). In der Mitte der Kammern befindet sich ein 2,5 cm hoher Sockel, auf dem der Gelschlitten zu liegen kommt. Links und rechts dieses Sockels befinden sich zwei Pufferreservoirs ( $5 \times 13 \times 5 \text{ cm}$ ), in denen jeweils eine Elektrode in Form eines dünnen Platindrahtes eingefügt ist. In die Kammern und die Reservoirs wurden 800 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50 x TAE-Stammlösung: 2 M Tris; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA) als Laufpuffer eingefüllt. Die Gelkammern konnten mit einem Plexiglas<sup>®</sup>-Deckel ( $13 \times 26 \text{ cm}$ ) abgedeckt werden. Der Gelschlitten hatte eine Länge von 15 cm und eine Breite von 11 cm und besitzen links und rechts einen 2 cm hochgezogenen Rand, in den am oberen Ende und in der Mitte Kerben für die Kämmen eingesägt sind. Die Kämmen besitzen entweder 15 oder 16 Taschen. Die Agarose-Gele wiesen ein Volumen von 50 – 80 ml auf. Je nach aufzutrennendem Fragmentbereich der DNA bzw. PCR-Amplifikate variierten die Agarose-Konzentrationen zwischen 0,8% und 3% (w/v), angesetzt in 1 x TAE-Puffer. Als Agarose wurde für die Auftrennung der genomischen DNA bzw. größeren PCR-Amplifikate hochreine Standard-Agarose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt. Mit dieser Agarose konnten die Agarose-Gele der Konzentrationen 0,8 – 1,5% angesetzt werden. Für die Auftrennung der kleineren PCR-Amplifikate fand die hochreine, spezielle Agarose-1000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) Verwendung, die sich aufgrund ihrer Agarose-Struktur beim Erwärmen im Mikrowellenherd (MS-1905C Multiwave, LG Electronics Deutschland GmbH, Willich) im TAE-Puffer bei

den höheren Konzentration von 1,5 – 3% (w/v) gleichmäßiger und Luftblasen-frei löste. Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren in den Agarose-Gelen wurden zu je 80 ml Agarose-Gel 4 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) gemischt. Dieser Farbstoff interkaliert in die Nukleinsäuren und macht diese bei der Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312$  nm sichtbar. Die Gelhalter, die oben und unten offen waren, wurden mit einem Klebeband abgedichtet. Anschließend wurde der Kamm in den Gelhalter eingehängt und die Agarose-Lösung in den Gelhalter gegossen. Nach dem Aushärten der Agarose bei Raumtemperatur wurden die Klebebänder und der Kamm vorsichtig entfernt. Agarose-Gele konnten in den Gelhaltern über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden. Der Gelhalter mit dem Agarose-Gel wurde in die Elektrophoresekammer gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, daß der Laufpuffer das Gel bedeckte und luftblasenfrei die Taschen des Gels füllte. Die aufzutrennende DNA-Probe (10 – 15 µl) wurde zu 1/5 Volumen mit einem Auftragspuffer (100 mM EDTA; 15% (w/v) Ficoll 400; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Für die Größenbestimmung der DNA-Proben wurden definierte DNA-Größenstandards eingesetzt (s. Tab. 2.4).

**Tab. 2.4: Nukleinsäure-Größenstandards**

Nukleinsäure-Proben	kurze PCR-Amplifikate	längere PCR-Amplifikate und genomische DNA-Proben	genomische DNA-Proben
Bezeichnung des Größenstandards	100 bp DNA-Leiter [bp]	1 Kb Plus DNA-Leiter™ [bp]	High DNA Mass™-Leiter [kb]
Basenzahl der definierten DNA-Fragmente, die als einzelne Banden im Agarose-Gel zu sehen sind	2 072	12 000	10
	1 500	11 000	6
	1 400	10 000	4
	1 300	9 000	3
	1 200	8 000	2
	1 100	7 000	1
	1 000	6 000	
	900	5 000	
	800	4 000	
	700	3 000	
	600	2 000	
	500	1 650	
	400	1 000	
	300	850	
	200	650	
	100	500	
	400		
	300		
	200		
	100		



Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte unter einer konstanten Spannung von 120 V und für 45 min mit dem Transformator TGGE System Controller (Biometra<sup>®</sup>, Göttingen). Im Anschluß daran wurde das Agarose-Gel mit dem Gelhalter aus der Kammer genommen und unter dem UV-Licht ausgewertet. Die Auswertung und die Bilddokumentation erfolgte mit der Geldokumentationsanlage Intas, Göttingen.

### 2.8.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit (SAMBROOK et. al., 1989)

Um die Konzentration der Nukleinsäure zu ermitteln, wurde photometrisch die Absorption der Nukleinsäure-Lösung bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm in einer Quarzküvette „Semi micro-volume, 700 $\mu$ l“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit einem UV/VIS Spectrophotometer (PerkinElmer Instruments GmbH, Rodgau-Jügesheim) gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration berechnet sich nach folgender Gleichung [3]:

$$OD_{260} \times V \times F = c [\mu\text{g ml}^{-1}] \quad [3]$$

$OD_{260}$  = Optische Dichte bei  $\lambda = 260$  nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor

$c [\mu\text{g ml}^{-1}]$  = Nukleinsäurekonzentration

Der Multiplikationsfaktor (SAMBROOK et. al., 1989) beträgt bei:

doppelsträngiger DNA	= 50
RNA	= 40
einzelsträngiger DNA	= 37
und einzelsträngigen Oligonukleotiden	= 20

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung wurde anhand des Quotienten bestimmt, der aus dem Meßwert, gemessen bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm, dividiert durch den Meßwert, gemessen bei der Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm, gebildet wird. Die Nukleinsäure-Lösung sollte ein Verhältnis von 1,8 – 2,0 aufweisen. Eine Abweichung bedeutete eine Verunreinigung durch Phenol bzw. mit Proteinen. Neuere Untersuchungen von WILFINGER et al. (1997) haben jedoch ergeben, daß selbst hochreine Nukleinsäuren nicht über ein Verhältnis von 1,5 kommen. Abhängig vom pH-Wert und des Salzgehaltes des bei der Messung verwendeten Wassers kann die Abweichung der Nukleinsäure-Konzentration bis zu 25% betragen. Entsprechend verhält sich der Nachweis der Protein-Kontamination. Um dennoch reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten,

wurde zur Lösung der DNA-Pellets aus den DNA-Isolierungen anstelle von bidestilliertem Wasser ein 10 mM Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von pH = 8,5 verwendet. Für die weitere Verwendung wurden Nukleinsäure-Lösungen ausgewählt, die sowohl eine hohe Konzentration aufwiesen, als auch so gering wie möglich mit Proteinen verunreinigt waren.

### 2.8.4 Klonierung der PCR-Amplifikate

Zur Überprüfung des fehlerfreien Ablaufs der PCR-Amplifikation schloß sich eine Sequenzierung an. Um ausreichendes Material für die Sequenzierung zur Verfügung zu haben, wurde zuvor eine Klonierung durchgeführt. Unter einer Klonierung versteht man den Einbau eines PCR-Amplifikates in einen Vektor, hier ein Plasmid, der eine Vermehrung des DNA-Amplifikates ermöglicht. Die Klonierung hat den Vorteil, daß das DNA-Amplifikat in dem Klon stabil bleibt und der Umgang und die Lagerung unproblematisch sind. Für die Klonierung fand das Klonierungssystem TOPO TA Cloning<sup>®</sup>-Kit der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Anwendung.

#### 2.8.4.1 Ligation

Nach der Aufreinigung und einer ersten Kontrolle des PCR-Amplifikates über die Gelelektrophorese wurde mit der Ligation des PCR-Produktes in den Plasmid-Vektor begonnen. Das PCR-Amplifikat, welches an den Enden jeweils ein überhängendes Desoxyadenosin besaß, das durch die *Taq*-DNA-Polymerase während der PCR angefügt worden war, wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>, der an den Enden jeweils ein überhängendes Desoxythymidin enthielt, eingefügt. Beide Komponenten wurden durch eine kovalent an das Plasmid gebundene Topoisomerase I ligiert. Zu diesem Zweck wurde folgender Reaktionsansatz, entsprechend den Angaben des Herstellers, zusammenpipettiert:

PCR-Produkt	0,5 – 4 µl
Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )	1 µl
steriles Wasser	ad 5 µl
pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> -Vektor	1 µl

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 6 µl wurde mit einer Pipette sanft gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Lagerung des Ansatzes entweder zur weiteren Benutzung auf Eis oder über Nacht bei –20 °C.

### 2.8.4.2 Transformation

Die Transformation - die Aufnahme von in der Umgebung vorliegenden DNA-Molekülen in eine Bakterienzelle - wurde mit den chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen TOP10F' One Shot<sup>®</sup>, die mit dem Klonierungs-Kit geliefert worden waren, durchgeführt. Die Zellen, die bei  $-80\text{ °C}$  gelagert werden mußten, wurden auf Eis aufgetaut. Für jeden Ligationsansatz war ein Reaktionsgefäß der Zellen erforderlich. Zu den aufgetauten Zellen wurden  $2 - 4\ \mu\text{l}$  des Ligationsansatzes pipettiert und der Ansatz durch Klopfen mit dem Finger an das Reaktionsgefäß sanft gemischt. Eine Mischung mit der Pipette zerstört die Ligationsprodukte. Es folgte eine Inkubation für etwa 15 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock bei  $42\text{ °C}$  in einem Wasserbad ausgesetzt. Durch die starke Temperaturänderung wurde die Zellmembran der Zellen durchlässig, und das Ligationsprodukt konnte in die Zelle aufgenommen werden. Unmittelbar danach mußten die Zellen wieder auf Eis gestellt werden. Nun wurden zu den Zellen  $250\ \mu\text{l}$  SOC-Medium (2%, w/v Trypton; 0,5%, w/v Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 20 mM Glucose) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde horizontal für 1 h bei  $37\text{ °C}$  in einem Schüttler (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei  $200\ \text{U min}^{-1}$  inkubiert. Neben der Zellvermehrung diente dieser Inkubationsschritt unter anderem auch dazu, die in dem Plasmid-Vektor integrierten Antibiotika-Resistenzgene zu aktivieren, um im Anschluß über Agar-Platten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt waren, eine sichere und effektive Selektion derjenigen Bakterienzellen vornehmen zu können, die einen ordnungsgemäß klonierten Plasmid-Vektor richtig aufgenommen hatten. Von jedem Ansatz wurden im Anschluß  $25\ \mu\text{l}$  und  $250\ \mu\text{l}$  auf LB-Medium-Agar-Platten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Agar-Platten enthielten  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin und jeweils  $32\ \mu\text{g ml}^{-1}$  5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei  $37\text{ °C}$  in einem Brutschrank ST 5042 (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau).

### 2.8.4.3 Selektion der positiven Klone

Nur diejenigen Zellen, die einen Plasmid-Vektor mit dem Ampicillin-Resistenzgen enthielten, konnten auf den Agar-Platten erfolgreich zu Kolonien heranwachsen. Um die Zellen, die ein Plasmid ohne inkloniertem PCR-Amplifikat besaßen, von den Zellen trennen zu können, bei denen die Klonierung erfolgreich verlaufen war, wurde die Selektion über das in den Vektor zusätzlich integrierte  $\beta$ -Galactosidase-Gen vorgenommen. Das Prinzip beruht darauf, daß durch die Zugabe von IPTG eine verstärkte Transkription des  $\beta$ -Galactosidase-Gens induziert wird. Durch diese verstärkte Tätigkeit wird das künstliche Substrat X-Gal von den heranwachsenden Zellen zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umgesetzt, der die Bakterienkolonie auf

der Agarplatte blau anfärbt. Der Plasmid-Vektor besitzt in dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen eine Klonierungsstelle, in der durch die Ligation das PCR-Amplifikat eingefügt werden kann. Dadurch wird die Transkription des Gens unterbrochen, die Funktionalität des Gens zerstört und X-Gal kann nicht mehr umgesetzt werden. Als Folge hiervon bleiben die Kolonien weiß. Die Zellen der weißen Kolonien trugen also die erfolgreich klonierten Plasmid-Vektoren und wurden weiter untersucht. Die ausgewählten Kolonien wurden mit autoklavierten Zahnstochern von den Agarplatten abgenommen und zur Steigerung der Ausgangsmenge zusammen mit den Zahnstochern in Reagenzgläser überführt, die 5 ml LB-Medium enthielten. Das LB-Medium wurde mit dem Antibiotikum Kanamycin versetzt, um sicherzustellen, daß sich nur Zellen mit einem Plasmid-Vektor vermehrten. Die Inkubation der Reagenzgläser erfolgte über Nacht bei 37 °C in einer Kulturtruhe (CERTOMAT<sup>®</sup> BS-T; B. Braun Biotech international; Sartorius Gruppe, Melsungen) bei 200 U min<sup>-1</sup>. Die angewachsenen Kulturröhrchen wurden für die Plasmid-Isolierung herangezogen.

### 2.8.4.4 Plasmid-Isolierung (BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Die für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen ausgewählte Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen in Gegenwart des Detergenz SDS. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man sehr schnell Plasmid-DNA in hoher Reinheit und mit einer großen Ausbeute erhält. Die so erhaltene DNA eignet sich sehr gut für Restriktionsspaltungen und Sequenzierungen. Von der 5 ml-LB-Übernachtskultur aus dem Reagenzglas (s.o. 2.8.4.3), deren Bakterienzellen das Plasmid mit dem einklonierten PCR-Fragment enthielten, wurden 2 ml Bakterienkultur aus dem Reagenzglas bis nach der Überprüfung durch die Restriktion und anschließenden Gelelektrophorese bei 4 °C zwischengelagert. Bestätigte die Überprüfung durch das Agarose-Gel die erfolgreiche Klonierung, wurden mit diesen 2 ml Bakterienkultur Glycerin-Stammkulturen angelegt, um für weitere Überprüfungen ausreichend kloniertes Material zur Verfügung zu haben. Die restlichen 3 ml der *E. coli*-Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C für 1 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Bakterien-Pellet wurde mit der Zugabe von 150  $\mu$ l BD1-Puffer (50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 10 mM EDTA; 4 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym) resuspendiert und zur Erleichterung des Zellaufschlusses 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von 300  $\mu$ l BD2 (0,2 M NaOH; 1%, w/v SDS) die eigentliche Zell-Lyse. Zu diesem Zweck mußte die Bakteriensuspension mit der Pipette kräftig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert werden. Um die vorhandenen Proteine zu denaturieren, erfolgte die Zugabe 225  $\mu$ l eisgekühlten BD3-Puffers (3 M Kaliumacetat, pH = 5,2), der den alkalische Lysis-Puffer BD2 schnell neutralisiert, und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Zur Abtrennung der Zelltrümmer vom Puffergemisch wurde im Anschluß eine Zentrifugation bei 14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C und für 15 min durchge-

führt. Das Pellet mit den Zelltrümmern und den unlöslichen Bestandteilen konnte entsorgt werden, während das wässrige Puffergemische mit der gelösten Plasmid-DNA in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Um nun die Plasmid-DNA von Proteinen zu reinigen, schloß sich eine Lysat-Aufreinigung über eine Phenol-Chloroform-Extraktion an. Die Aufreinigung über die Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte nach dem in 2.8.1.1 aufgeführtem Schema, wobei die Zentrifugationsschritte bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und für 10 min ausgeführt wurden. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus der wässrigen Phase erfolgte im Anschluß eine Alkohol-Fällung. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen eiskaltem 100%igen Ethanol gefällt. Die Fällung der Plasmid-DNA fand bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h statt. Im Anschluß daran wurde die Plasmid-DNA bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und für 30 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> gewaschen und erneut bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des 70%igen (v/v) Rotisols<sup>®</sup> wurde das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in  $50 \mu\text{l}$  bidestilliertem, sterilem Wasser gelöst.

#### 2.8.4.5 Restriktion

Für die schnelle Überprüfung, ob die Plasmid-DNA auch wirklich das einklonierte PCR-Amplifikat enthielt, und zur Kontrolle der Plasmid-Isolierung wurde der Plasmid-Vektor durch eine Restriktion linearisiert und anhand einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei einer Restriktion werden Restriktionsenzyme eingesetzt, die in der Lage sind, bestimmte Nukleinsäurebasenabfolgen zu erkennen und an diesen spezifischen Stellen das DNA-Molekül zu spalten. In den Restriktionsansätzen wurde ausschließlich das Restriktionsenzym *EcoR* I (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Dieses Enzym schneidet die DNA an folgender Erkennungssequenz:



Der verwendete Plasmid-Vektor besitzt zwei Schnittstellen für das Enzym *EcoR* I, die nur wenige Basen vor und hinter der Insertionsstelle für das PCR-Amplifikat liegen. Eine Überprüfung der PCR-Amplifikate ergab, daß diese keine Schnittstelle für *EcoR* I enthielten. So konnte mit einer Restriktion das PCR-Amplifikat aus dem Vektor herausgetrennt werden und über eine Gelelektrophorese kontrolliert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Restriktionsansatz hergestellt. Um eine bessere Durchmischung zu erreichen, wurden bei dem Ansatz zuerst alle Komponenten, mit Ausnahme der Plasmid-DNA, zusammenpipettiert (Master-Mix). Im Anschluß daran wurde der Ansatz auf die einzelnen Reaktionsgefäße, in denen die Plasmid-DNA bereits vorgelegt worden war, verteilt.

Der Restriktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

REact <sup>®</sup> 3-Puffer	2 $\mu$ l
RNase (100 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Plasmid-DNA	2 $\mu$ l
<i>Eco</i> R I	0,2 $\mu$ l
bidest. Wasser	15 $\mu$ l

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem Heizblock bei 37 °C für 1 – 2 h. Unmittelbar danach schloß sich die Kontrolle über die Gelelektrophorese an, wobei ein Volumen von 20  $\mu$ l für den Einsatz in das Agarose-Gel eingesetzt wurde. Die restlichen, ungeschnittenen Plasmid-Proben wurden bei –20 °C gelagert.

### 2.8.5 Sequenzierung der PCR-Amplifikate

Nach der Linearisierung des Vektors durch den oben erwähnten Restriktionsverdau, der Kontrolle anhand der Gel-Elektrophorese und der Auswahl der entsprechenden Klone erfolgte als nächster Schritt die Analyse der klonierten PCR-Amplifikate über die Sequenzierung. Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des Sequenzierungskits „BigDye RR Terminator Cycle Sequencing Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und dem dazugehörigen Sequenzier-Gerät „ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

#### 2.8.5.1 Sequenzierungsansatz

Um die Plasmid-DNA-Proben für die Sequenzierung vorzubereiten, war ein Sequenzierungs-Kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing RR Kit) der Firma Applied Biosystems verwendet worden, der speziell für das später benutzte Sequenziergerät ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser entwickelt worden ist. Das Prinzip beruht darauf, daß im Gegensatz zur einer PCR-Reaktion jeweils nur ein Oligodesoxynukleotid, entweder in der 5'-Vorwärts- oder 3'-Rückwärts-Richtung, in einen Ansatz eingesetzt wird. Für jede Plasmid-Probe wurden daher zwei Sequenzierungsansätze erstellt: ein Ansatz in der 5'-Vorwärts-Richtung und ein Ansatz in der 3'-Rückwärts-Richtung. Bei den verwendeten Oligodesoxynukleotiden handelt es sich um allgemeine Sequenzierungsprimer „M13 Forward (-20)-Primer“ und „M13 Reverse-Primer“, die zu entsprechenden Sequenzabschnitten auf dem Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> komplementär sind und mit dem Kit mitgeliefert wurden. Die Bindungsstelle des Primers in der 5'-Vorwärts-Richtung liegt 93 Basen, die des Primers für die 3'-Rückwärts-Richtung 90 Basenpaare von dem Insertbereich entfernt. Die Amplifikation des entsprechenden Plasmid-Bereiches wird durch die Zugabe eines sog. „Termi-

nators“ beendet. Hierbei handelt es sich um ein Reagenzien-Gemisch, das folgende Bestandteile enthält: Tris-HCl (pH = 9); MgCl<sub>2</sub>; *Ampli Taq*-DNA-Polymerase; FS mit hitzestabiler Diphosphatase; dNTPs und mit BigDye-Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Die BigDye-Fluoreszenzfarbstoffe bestehen aus vier verschiedenen Farbstoffen auf Rhodamin-Basis, die bei Anregung mit einem Laser Licht in vier verschiedenen Wellenlängen emittieren. Jeder der vier Nukleosidtriphosphatbasen ist ein Farbstoff bestimmter Wellenlänge zugeordnet, so daß ein Licht bestimmter Wellenlänge exakt einer Base zugeordnet werden kann. Durch die fehlende Hydroxylgruppe an der 3'-Position der Didesoxyribose eines ddNTPs führt dessen Einbau zu einem Abbruch der Amplifikation („Termination“). Es entstehen dadurch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils am Ende eine fluoreszenzmarkierte Base verschiedenartiger Farbe besitzen. Um die Sequenzierung vorzubereiten wurden die beiden Sequenzierungsansätze nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

**Tab. 2.5: Standard-Sequenzierungsansätze**

	Ansatz mit dem 5'-Vorwärts-Primer	Ansatz mit dem 3'-Rückwärts-Primer
Plasmid-DNA (200 –500 ng)	1 µl	1 µl
Terminator	4 µl	4 µl
5'-Vorwärts-Primer	3,5 µl	-
3'-Rückwärts-Primer	-	3,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (steril)	ad 20 µl	ad 20 µl

Die Reaktionsansätze (0,2 ml-Reaktionsgefäße) wurden in einem Thermoblock (PC Personal Cycler 3.01, Biometra<sup>®</sup>, Göttingen) mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

1 Zyklus	Erstmalige Denaturierung	96 °C	für 1 min
25 Zyklen	Denaturierung	96 °C	für 30 sec
	Anlagerung der Primer	50 °C	für 15 sec
	Verlängerung der Primer	60 °C	für 4 min
1 Zyklus	Abschluß	4 °C	bis zur Aufreinigung

### 2.8.5.2. Aufreinigung des Sequenzierungsansatzes

Um aus dem Sequenzierungsansatz die *Taq*-DNA-Polymerase und ungebundene Nukleotide zu entfernen, mußte eine Aufreinigung über eine Ethanol-Fällung durchgeführt werden. Der komplette Sequenzierungsansatz mit einem Volumen von 20 µl wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung erfolgte durch die Zugabe von 80 µl bidestilliertem Wasser, 10 µl

Natriumacetat (5 M, pH = 5) und 250 µl Rotisol<sup>®</sup> für 1 – 2 h bei –20 °C. Nach der Zentrifugation bei 14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C und für 15 min zur Sedimentation der DNA wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 250 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 5 min) und Entfernung des Ethanols trocknete das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 5 min bei Raumtemperatur. Im Anschluß konnte das Pellet in 25 µl „Template Suppression Reagent“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen, durch 2 minütiges Kochen denaturiert und für etwa 5 min auf Eis inkubiert werden. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und in spezielle Sequenzier-Reaktionsgefäße mit Septen (Applied Biosystems, Weiterstadt) überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.8.5.3 Durchführung der Sequenzierung

Zur Durchführung der Sequenzierung wurden die Sequenzier-Reaktionsgefäße mit den Proben in den Probengeber des Sequenziergerätes ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer deponiert. Durch das Anlegen einer Spannung von 2 kV für 90 sec wurden die DNA-Proben nacheinander elektrokinetisch auf eine 61 cm lange Kapillarsäule, die auf 50 °C temperiert war, aufgetragen. Die Kapillarsäule war mit einem Spezialpolymer (Performance Optimized Polymer 6, Applied Biosystems, Weiterstadt) gefüllt, das vor jeder neuen Probenaufnahme automatisch erneuert wurde. Die gelelektrophoretische Trennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 12 kV und einer Stromstärke von 5 µA. Die Empfindlichkeit des Systems lag in dem Trennungsbereich bis hinunter zu einer Base Unterschied in den DNA-Fragmenten. Durch die Anregung mit einem Laser emittierten die fluoreszenzmarkierten Basen an den Enden der DNA-Fragmente Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Dieses Licht wurde detektiert und eine Identifizierung der Fluoreszenzfarbstoffe und der damit zugeordneten Basen war möglich. Alle untersuchten DNA-Proben wurden grundsätzlich in beiden Richtungen sequenziert, um durch eine Vergleichsmöglichkeit eventuelle Lesefehler des Gerätes auszuschließen. Die Steuerung des Sequenziergerätes sowie die Eingabe der Rohdaten erfolgten über das Softwarepaket „ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Collection 1.0.4“.

### 2.8.5.4 Datenanalyse der Sequenzierung

Die Daten aus den Sequenzierungsläufen wurden auf einen Computer „Power PC, Power Macintosh 8100/80“ gespeichert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm „Sequencing Analysis 3.0“. Nach der Auswertung wurden die Daten ausgedruckt und die Sequenzierungsdaten einer Probe in der Vorwärts- und Rückwärts-Richtung auf Übereinstimmung überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die so gewonnene DNA-Sequenz wurden für einen Sequenzabgleich im Computer gespeichert und mit dem Programm „Blast-Search“ des NCBI



(ALTSCHUL, 1990) mit allen DNA-Sequenzen abgeglichen, die in der Gendatenbank „GenBank“ vorhanden waren. Stimmt die durch die Sequenzierung ermittelten Sequenzen mit den aus der Gendatenbank erhaltenen Sequenzen der autotrophen Nitrifizierer überein, und waren keine Sequenzen fremder Bakterien darunter, wurde von einer gelungenen Analyse ausgegangen. Zudem wurden die Sequenzdaten bzgl. der 16S rRNA-DNA-Sequenzen mit der 16S rRNA-Datenbank des „Ribosomal Database Project“ (MAIDAK et al., 2001), im Internet unter der Adresse „<http://rdp.cme.msu.edu/html/>“, abgeglichen.

## **2.9 Nachweis der Nitrifizierer mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungstechnik und dem konfokalen Laserrastermikroskop**

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine überaus nützliche Methode, um DNA- bzw. RNA-Sequenzen in Geweben und Zellen lokalisieren und sichtbar machen zu können. Die gesuchten Nukleinsäuresequenzen werden direkt im biologischen Präparat (*in situ*) detektiert. Das Prinzip beruht darauf, daß sich ergänzende Nukleinsäure-Doppelstränge unter bestimmten Bedingungen voneinander getrennt und wieder zusammengefügt werden können. Dieser Mechanismus wird ausgenutzt und dazu verwendet, um künstlich hergestellte und markierte, kurze, einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle auf ein biologisches Präparat aufzubringen. Neben einer radioaktiven Markierung der künstlich hergestellten Nukleinsäuren - auch Oligodesoxynukleotid-Sonden genannt - werden ebenso mit Biotin, Digoxigenin oder Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligodesoxynukleotid-Sonden verwendet. Durch die Einstellung der richtigen Reaktionsbedingungen werden zuerst die natürlichen, komplementär aneinandergelagerten Nukleinsäure-Doppelstränge getrennt. Bei der sich anschließenden erneuten Zusammenlagerung durch eine Veränderung der Reaktionsbedingungen werden dann die künstlichen, markierten Nukleinsäuremoleküle an die entsprechenden, natürlichen, komplementären Nukleinsäurebereiche gebunden. In einem anschließenden Wasch-Schritt werden alle nicht gebundenen, künstlichen, markierten Nukleinsäuremoleküle wieder von dem Präparat entfernt; nur die gebundenen Moleküle bleiben im Präparat zurück. Mit einem entsprechenden Nachweis-System kann man nun die im Präparat verbliebenen, markierten Nukleinsäuremoleküle sichtbar machen. Da die Moleküle gleichzeitig an den gesuchten, komplementären Nukleinsäuren in den Präparaten haften, hat man somit auch die gesuchten DNA- bzw. RNA-Sequenzen aufgespürt (LEITCH et al., 1994).

## 2.9.1 Verwendete Oligodesoxynukleotid-Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe

### 2.9.1.1 Oligodesoxynukleotid-Sonden

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist eine Technik, mit der eine taxonomische Bestimmung und Einordnung von Bakterien und die Quantifizierung dieser Bakterien in Umweltproben möglich ist, ohne daß man die Bakterien im Labor kultivieren muß. Diese können in den Umweltproben direkt nachgewiesen und dort näher untersucht werden. Zu diesem Zweck werden Oligodesoxynukleotid-Sonden entweder für 16S rRNA-Moleküle oder für spezifische Strukturgene, die nur für eine bestimmte Bakteriengruppe charakteristisch sind, benutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden Oligodesoxynukleotid-Sonden für 16S rRNA-Moleküle ausgewählt. Die Auswahl erfolgte entsprechend der Auswahl der Oligodesoxynukleotide für die PCR (s.o. 2.8.2.1). Für den Nachweis der autotrophen Nitrifizierer im Apoplasten des Nadelblattgewebes wurden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Oligodesoxynukleotid-Sonden Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer und NIT3 für die Nitrit-Oxidierer, die jeweils aus den variablen bis hochvariablen Bereichen des 16S rRNA-Moleküls stammen, verwendet. Für die Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -Untergruppe der *Proteobacteria* wurde die Sonde Nso190 verwendet, die für alle auf dem Land und im Boden vorkommenden Ammoniak-Oxidierer angewendet werden konnte. Für die Bakteriengattung *Nitrobacter* wurde die Sonde NIT3 verwendet. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der Gattung *Nitrobacter* zu *Bradyrhizobium* und *Rhodopseudomonas* wurde die Sonde CNIT3 als Konkurrenz zur Sonde NIT3 verwendet, um die Spezifität der letzteren zu erhöhen. Die allgemeine Sonde EUB338 diente als Positivkontrolle, um die Hybridisierungseffizienz bestimmen zu können.

**Tab. 2.6: Oligodesoxynukleotid-Sonden zur *in situ*-Hybridisierung;** die Lage im 16S rRNA-Molekül bezieht sich auf die Basen-Numerierung des 16S rRNA-Moleküls von *E. coli*

Oligodesoxynukleotid-Sonde	Sequenz (5' → 3')	Lage im 16S rRNA-Molekül	Zielorganismus	Referenz
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338-355	alle <i>Eubacteria</i>	AMANN et al., 1990a
Nso190	CGA TCC CCTGCT TTT CTC C	190-208	Ammoniak-Oxidierer der $\beta$ -Untergruppe der <i>Proteobacteria</i>	MOBARRY et al., 1996
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	1035-1048	<i>Nitrobacter</i> sp.	WAGNER et al., 1996
CNIT3	CCT GTG CTC CAG GCT CCG	1035-1048	Konkurrenz zur Sonde NIT3	WAGNER et al., 1996

### 2.9.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Detektion der Oligodesoxynukleotid-Sonden wurden diese am 5'-Ende des Moleküls mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Werden die fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotid-Sonden mit einem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, emittieren die Fluoreszenzfarben ein Licht mit einer geringfügig längeren Wellenlänge. Durch entsprechende Auswahl von Filtern können diese Wellenlängen voneinander getrennt werden, wobei sich die Möglichkeit ergibt, nur das emittierte Licht zu detektieren. Tabelle 2.7 gibt einen Überblick über die Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anregungs- und Emissionswellenlängen, die für die Markierung der Oligodesoxynukleotid-Sonden verwendet wurden (LEITCH et al., 1994).

**Tab. 2.7: Fluoreszenzfarbstoffe;** zur Markierung der Oligodesoxynukleotid-Sonden (ZEISS, 2003)

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungswellenlänge $\lambda$	Emmissionswellenlänge $\lambda$	Oligodesoxy- nukleotid- Sonde
Rhodamin Rot	550	580	EUB338
5-carboxy-X-rhodamin (5-ROX)	567	591	Nso190
Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	490	525	NIT3

Die künstlich hergestellten und mit Fluoreszenzfarbstoffen am 5'-Ende des Moleküls markierten Oligodesoxynukleotid-Sonden wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert und geliefert.

## 2.9.2 Hybridisierung von Bakterienzellen

Für die Etablierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und zur Kontrolle der korrekten Wirkungsweise der Oligodesoxynukleotid-Sonden sowie zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde zunächst die Methode an Bakterienzellen getestet.

### 2.9.2.1 Konservierung der Bakterien

Um zu gewährleisten, daß Nukleasen und andere Enzyme die Ribosomen in den Bakterienzellen nicht zerstörten, mußten die Bakterien so rasch wie möglich konserviert werden. Die Konservierung der Bakterienzellen erfolgte mit einer 4%igen (v/v) Formaldehydlösung. Um die Zellen nicht durch Osmose zu zerstören, wurde die Formaldehydlösung mit 1 x PBS-Puffer (120 mM

NaCl; 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; pH = 7,4) angesetzt. Aus einer Flüssigkultur wurden entsprechend der Dichte der Kultur ein oder mehrere Milliliter Bakteriensuspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, abzentrifugiert (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 1 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml Konservierungslösung resuspendiert. Zellen, die bei -80 °C gelagert worden waren, mußten zunächst in 500 µl 1 x PBS-Puffer gelöst und anschließend ebenso mit 1,5 ml Konservierungslösung versetzt werden. Die Konservierung der Zellen erfolgte i.d.R. über Nacht, mindestens jedoch 12 h bei 4 °C. Nach der Einwirkung des Konservierungsmittels wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C, 1 min) und das Konservierungsmittel vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, so daß nur noch das Pellet zurückblieb. Diese Pellet wurde erneut in 1 ml PBS-Puffer gelöst und nach einer Durchmischung mit der Pipette erneut bei 14000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C und 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml PBS-Puffer gelöst. Diese gelösten, konservierten Zellen konnte im Kühlschrank bei 4 °C bis zu 6 Monaten gelagert werden, ohne daß ein Qualitätsverlust für die später durchgeführten Experimente auftrat (AMANN et al., 1990b).

### 2.9.2.2 Fixierung der Zellen auf Objektträger

Im nächsten Schritt wurden die Bakterienzellen auf Objektträger aufgebracht. Um den Verlust der Bakterienzellen während der Hybridisierung in Grenzen zu halten, wurden neben fettfreien, normalen Objektträgern (VWR International GmbH, Ismaning) zusätzlich auch beschichtete Objektträger verwendet. Abgesehen von Objektträgern, die mit 1,5% Agar beschichtet waren, sind auch mit Poly-L-Lysin beschichtete oder silanisierte Objektträger (beide von SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet worden. Besonders die beiden letzteren Arten der Objektträger waren geeignet. Auf diese Objektträger wurden 10 – 20 µl der konservierten Bakteriensuspension aufgetragen und die Objektträger auf einen Heizblock (Gebr. Liebisch, Bielefeld) bei 70 °C für mindestens 15 min getrocknet. Die Objektträger mit den fixierten Bakterien konnten unter trockenen Bedingungen bis zu 6 Monate gelagert werden.

### 2.9.2.3 Vorbehandlung der Zell-Präparate

Um die Konservierung der Bakterienzellen zu ergänzen und nicht wasserlösliche Komponenten, wie z.B. Lipide, aus den Zellmembranen zu entfernen, wurde eine Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe mit den Stufen 50%, 80% und 100%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup> in Färbekästen aus Glas (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) durchgeführt. Die Entwässerung über Alkohol hat den Vorteil, daß die Membranen der Bakterienzellen noch weiter perforiert werden, und die Oligodesoxynukleotid-Sonden leichter in die Zellen eindringen können. Die Einwirkzeit betrug bei jeder Alkoholstufe 3 min (AMANN et al., 1990b). Im Anschluß daran

wurden die Präparate luftgetrocknet und konnten trocken gelagert werden, mußten allerdings nach einer längeren Lagerzeit ein weiteres Mal entwässert werden. Zur Überprüfung, ob die Oligodesoxynukleotid-Sonden auch tatsächlich an die Ribosomen und an die 16S rRNA-Untereinheit binden, wurde als weitere Vorbehandlung eine Ribonuklease-Behandlung vor der Hybridisierung durchgeführt. Das Enzym Ribonuklease (RNase) baut die in den Ribosomen enthaltene Ribonukleinsäure ab und verhindert damit, daß sich die Oligodesoxynukleotid-Sonden an die entsprechend komplementären Bereiche der RNA binden kann. Zu diesem Zweck sind die Präparate vor der Entwässerung mit Alkohol mit einer DNase-freien RNase inkubiert worden. Für die RNase-Lösung wurden 10 mg ml<sup>-1</sup> DNase-freie RNase in 10 mM Tris/HCl (pH = 7,5) und 15 mM NaCl gelöst und für 15 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde diese Stammlösung portioniert und bei -20 °C gelagert. Gebrauchsfertige Lösungen mußten mit 2 x SSC-Puffer auf eine Konzentration von 100 µg ml<sup>-1</sup> verdünnt werden. Die Präparate wurde mit 200 µl einer RNase-Lösung versetzt, mit einem Deckglas abgedeckt und in einer sog. Feuchten Kammer 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Feuchte Kammer bestand aus einer Besteckschale (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), in die ein Zellstofftuch gelegt wurde. Das Zellstofftuch war mit 2 x SSC-Puffer durchtränkt. Durch die Verdunstung des Wassers des Puffers konnte in der Feuchten Kammer die Luftfeuchtigkeit konstant gehalten werden. Nach der Inkubation wurden die Objektträger für 3 x 5 min in 2 x SSC-Puffer (pH = 7,0) gewaschen. Die Entwässerung erfolgte nach dem Abtropfen der Objektträger (LEITCH et al., 1994).

#### 2.9.2.4 Hybridisierung der Bakterienzellen

Nach der Entwässerung und Lufttrocknung der Präparate wurden Inkubationskammern aus Kunststoff auf die Objektträger aufgeklebt. Diese Inkubationskammern, HybriWell™ (GRACE Bio-Labs, Inc.; bezogen durch: Science Services, München) besitzen ein Kammervolumen von 100 µl. An der linken und rechten Seite befinden sich Öffnungen, in die der Hybridisierungspuffer pipettiert wird. Diese Öffnungen werden dann durch kleine Kunststoff-Scheiben verschlossen, so daß während der Hybridisierung keine Flüssigkeit verdunsten kann. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer angesetzt. Der Hybridisierungspuffer besteht aus der Hybridisierungsstammlösung und den entsprechenden Oligodesoxynukleotid-Sonden, die erst kurz vor der Hybridisierung aufgetaut und zur Hybridisierungsstammlösung hinzugegeben wurden. Für die Oligodesoxynukleotid-Sonden, die entsprechend ihrer Basenzusammensetzung unterschiedliche Formamid-Konzentrationen benötigten, wurde eine jeweilige Hybridisierungsstammlösung hergestellt, die bei Raumtemperatur unbedenklich gelagert werden konnte. In Tabelle 2.8 sind die Substanzen und ihre Konzentrationen für die Hybridisierungsstammlösungen aufgeführt, und die verwendeten Konzentrationen der Oligodesoxynukleotid-Sonden angegeben.

**Tab. 2.8: Hybridisierungsstammlösungen;** Zusammensetzung für die Oligodesoxynukleotid-Sonden EUB338, Nso190 und NIT3 (GIESEKE et al., 2001)

Puffer-Substanzen	EUB338	Nso190	NIT3
Tris/HCl (pH = 7,4)	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	0,9 M	0,9 M	0,9 M
SDS	0,1%	0,1%	0,1%
Formamid	20%	55%	40%
Oligodesoxynukleotid-Sonde	10 ng $\mu\text{l}^{-1}$	10 ng $\mu\text{l}^{-1}$	10 ng $\mu\text{l}^{-1}$

Für jedes zu hybridisierende Präparat und für jede einzelne Oligodesoxynukleotid-Sonde wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer angesetzt. Dieser Ansatz wurde gemischt, anschließend für 10 min bei 70 °C denaturiert und dann für 5 min auf Eis gestellt, um die Oligodesoxynukleotid-Sonden zu vereinzeln. Der Hybridisierungspuffer wurde nun in die Kammer gegeben und die Präparate bei 90 – 95 °C auf einem Heizblock für 10 min inkubiert. Durch diesen Schritt wurden alle Nukleinsäuren, sowohl in den Bakterien, als auch die Oligodesoxynukleotid-Sonden von einander getrennt und lagen als Einzelstrang vor. Im nachfolgenden Hybridisierungsschritt bei genau 46 °C für 1 h in einem Trockenschrank (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) lagerten sich die komplementären Nukleinsäurebereiche der Oligodesoxynukleotid-Sonden und der entsprechenden Bereiche der RNA der 16S rRNA-Moleküle passend zusammen. Bei dieser Zusammenlagerung wurden die Oligodesoxynukleotid-Sonden an ihren Zielsequenzbereich der 16S rRNA-Moleküle fest gebunden. Nach der Hybridisierung schloß sich ein Waschschrift an.

### 2.9.3 *in situ*-Hybridisierung des Fichtennadel-Gewebes

Nach der Etablierung der *in situ*-Hybridisierungs-Technik anhand der Bakterienpräparate erfolgte die Optimierung für die Nadelgewebe-Präparate.

#### 2.9.3.1 Konservierung des Pflanzengewebes

Die Gewebekonservierung der Fichtennadeln fand unmittelbar nach der Aufnahme der Nadelblatt-Parameter statt (s.o. 2.4). Zu diesem Zweck wurden die Fichtennadeln in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit einer 4%igen (v/v) Formaldehyd-Lösung aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 4 °C so lange im Kühlschrank gelagert, bis die Fichtennadeln sich am Grund der Reaktionsgefäße abgesetzt hatten. Danach wurde das Konservierungsmittel entfernt und die Fichtennadeln wurden mit 1 x PBS Puffer gewaschen. Für die weitere Lagerung wurden die Reaktionsgefäße wiederum mit frischem 1 x PBS-Puffer aufgefüllt und bis zu 6 Wochen im Kühl-

schränk gelagert. Die konservierten Fichtennadeln konnten zur Anfertigung von Gefrierschnitten oder für die Einbettung in Kunstharz verwendet werden (ASSMUS et al., 1995; modifiziert).

### 2.9.3.2 Einbettung und Schnitt des Pflanzenmaterials

Für die Einbettung und das Anfertigen der Fichtennadel-Längsschnitte wurden zwei Methoden verwendet.

Zunächst wurden Gefrierschnitte der Fichtennadeln hergestellt. Diese Methode hat den Vorteil, daß sich Gefrierschnitte sehr schnell erstellen lassen, und die Hybridisierung zudem innerhalb eines Tages durchgeführt werden kann. Die Schnitte können hierbei sehr dick, in einem Bereich von 80 – 100 µm, angefertigt werden, ohne das Präparat zu beschädigen. Die Fichtennadeln wurden einzeln in Gußformen aus Kunststoff (Tissue-Tek<sup>®</sup> Cryomold<sup>®</sup> Standard, Miles Inc., Elkhart, USA; bezogen von: Science Services, München) gelegt und luftblasenfrei in ein Einschlußmittel für Gefrierschnitte (Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T. Compound, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL; bezogen von: Science Services, München; und: PLANO W. Plannet GmbH, Wetzlar) eingebettet. Danach wurden die Proben in den Formen bei –20 °C für mindestens 20 min eingefroren. Die Proben konnten bei –20 °C gelagert werden. Nach dem Durchfrieren der Proben wurden diese aus den Formen genommen und auf ein Gefriermikrotom (Modell 1205, Leica Microsystems Nußloch GmbH, Nußloch) mit Kohlendioxid (BUSE GASE GmbH & Co., Bad Hönningen) aufgefroren. Von dem so fixierten Probenblock mit der Fichtennadel wurden anschließend entsprechend dicke Längsschnitte angefertigt. Während des Schneidens wurden die Schnitte mit einer sterilen Pinzette auf einen Objektträger gegeben (LEITCH et al., 1994).

Die zweite Methode, Schnitte von Fichtennadeln anzufertigen, bestand in der Einbettung der Nadeln in ein Kunstharz, das von Herrn Prof. Dr. Fink, Professur für Forstbotanik des Institutes für Forstbotanik und Baumphysiologie der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg zu Verfügung gestellt wurde. Diese Methode nahm mit einer Woche Vorbereitung der Nadeln bis zum Einbetten deutlich mehr Zeit in Anspruch als die Einbettung bei den Gefrierschnitten und es konnten nur dünne, bis maximal 10 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Die Fichtennadeln wurden zunächst in 4 – 5 mm lange Segmente geschnitten. Diese Segmente mußten dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 80% und 100%, v/v, Rotisol<sup>®</sup> - entsprechend 2.9.2.3) pro Stufe 6 – 12 h in 2 ml-Reaktionsgefäße entwässert werden. Im Anschluß wurde ein Gemisch (1:1) von Monomer und Rotisol<sup>®</sup> für 12 h hinzugegeben. Dieses ist im weiteren Verlauf durch reines Monomer für 2 x 12 h ausgetauscht worden. Um die Polymerisation des Monomers starten zu können, wurde zunächst das reine Monomer für 12 h durch eine Monomer-Lösung ersetzt, die mit 0,5% (w/v) Katalysator versetzt war. Vor der eigentlichen Polymerisation wurden die Fichtennadelstücke einzeln in Gelatine kapseln (PLANO GmbH, Wetzlar) deponiert und diese mit einer frischen katalysierten Monomer-Lösung bis zum

Rand der Kapseln aufgefüllt. Anschließend wurden die Kapseln mit Deckgläschen aus Glas luftblasenfrei abgedeckt, da Sauerstoff die Polymerisation verhindert. Nach 12 h Einwirkzeit erfolgte die eigentliche Polymerisation bei 55 °C in einem Trockenschrank für mindestens 24 h. Die auspolymerisierten Kunstharzblöckchen wurden nun für das Schneiden zurechtgeschliffen. Um das Harz etwas weicher und schnittfreudiger zu machen, wurden vor dem Schneiden die Blöckchen z.T. mehrere Tage bei 100% Luftfeuchtigkeit in einer Feuchten Kammer gelagert. Die Blöcken wurden in eine Halterung für das Gefriermikrotom eingesetzt, festgeklemmt und mit einem Hartmetallmesser (Leica Microsystems Nußloch GmbH, Nußloch) geschnitten. Sowohl die Monomer-Lösung als auch der Katalysator mußten bei 4 °C unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre gelagert werden und regelmäßig vor und nach Gebrauch mit Stickstoff begast werden.

### 2.9.3.3 Fixierung der Präparate auf Objektträger

Um zu verhindern, daß während der Hybridisierung und der sich anschließenden Waschschriffe die Fichtennadelschnitte verloren gingen, mußten die Schnitte auf beschichtete Objektträger fixiert werden. Die für die Mikroskopie außerordentlich dicken Fichtennadel-Längsschnitte aus der Gefriereinbettung mit einer Dicke von bis zu 100 µm konnten auf den kommerziell erhältlichen, mit Poly-L-Lysin beschichteten bzw. silanisierten Objektträger nicht fixiert werden, da die Haftung nicht ausreichend war. Eine Beschichtung der Objektträger mit 1,5%igem (w/v) Agar bzw. einer Gelatinebeschichtung (10 g Gelatine in 1 l, bidestilliertem, 50 °C warmen Wasser lösen, 4 ml einer 25%igen (w/v) Chrom-(III)-Kaliumsulfat-Lösung hinzupipettieren bis eine Endkonzentration von 0,1% Chrom-(III)-Kaliumsulfat erreicht ist; ROCHE DIAGNOSTIC GmbH, ROCHE APPLIED SCIENCE) war ebenfalls nicht zu verwenden, da entweder die Hintergrundsignale zu groß waren oder die Beschichtung den Wasch-Bedingungen nicht standhielt. Daher wurden die Objektträger mit einer Hühnereiweiß-Lösung beschichtet. Zu diesem Zweck wurde das Eiweiß eines Hühnereis in 450 ml 1 x PBS-Puffer (pH = 7,4) unter Rühren gelöst. Auf normale Objektträger konnte diese Beschichtung nicht aufgetragen werden, da der Film aus Hühnereiweiß sich nicht auf der glatten, fettfreien Oberfläche hielt. Daher wurden kommerzielle, silanierte Objektträger mit der Eiweiß-Lösung beschichtet. Auf diese Objektträger wurden 500 µl der Eiweiß-Lösung aufgetragen und mit einem Objektträger gleichmäßig verstrichen. Anschließend erfolgte die Trocknung der Objektträger unter der sterilen Werkbank. Die Objektträger konnten im Anschluß staubfrei und trocken gelagert werden.

Die Gefrierschnitte der Fichtennadeln wurden beim Schneiden vorsichtig mit einer Pinzette vom Mikrotommesser abgenommen und auf einen mit Hühnereiweiß beschichteten Objektträger aufgebracht. Damit die Schnitte nicht austrockneten, war der Objektträger zuvor mit 1 x PBS-Puffer (pH = 7,4) angefeuchtet worden. Waren alle Schnitte einer Nadel auf einen Objektträger aufgebracht worden, wurde der noch feuchte Objektträger auf einen Heizblock bei 70 °C für



mindestens 15 min getrocknet. Durch den Trocknungsschritt wurden die Längsschnitte der Fichtennadeln mit dem Eiweißfilm auf dem Objektträger fest verbunden und konnten sich später auch beim Waschen nicht mehr lösen. Die getrockneten Präparate konnten staubgeschützt und trocken gelagert werden.

Für die Schnitte, die aus der Harzeinbettung stammten, konnten die kommerziell beschichteten Objektträger verwendet werden, da die dünnen Schnitte mit einer Dicke von 10 µm ausreichend Haftung auf den Objektträgern fanden. Auch diese Präparate wurden trocken und staubgeschützt gelagert.

#### **2.9.3.4 Vorbehandlung der Nadelpräparate**

Entsprechend der Vorbehandlung der Bakterienzell-Präparate (s.o. 2.9.2.3) erfolgte bei den Präparaten aus der Gefriereinbettung eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe mit den Stufen 50%, 80% und 100%igem (v/v) Rotisol<sup>®</sup>. Neben der zusätzlichen Konservierung des Nadelgewebes und der Perforierung der Zellen hatte die Entwässerung zugleich den großen Vorteil, daß der Chlorophyll-Gehalt in den Fichtennadeln reduziert werden konnte (LEHNINGER, 2000). Das Chlorophyll des Pflanzengewebes emittiert aufgrund der Autofluoreszenz Licht im roten Wellenlängenbereich (STRASBURGER et al., 1998). Damit werden auch die Wellenlängen abgedeckt, für die die Fluoreszenzfarbstoffe der Oligodesoxynukleotid-Sonden Licht emittieren (s. Tab. 2.7). Um die Autofluoreszenz und damit die starke Hintergrundstrahlung zu verringern, erfolgte die Entwässerung der Fichtennadelschnitte nicht nur für 3 min, wie die Entwässerung bei den Bakterien, sondern für 30 min bei einer Temperatur von 48 °C. Durch die längere zeitliche Einwirkung und durch die Temperaturerhöhung konnte das Chlorophyll im wesentlichen aus dem Pflanzengewebe entfernt werden. Im Anschluß daran wurden die Präparate luftgetrocknet. Unmittelbar an die Entwässerung schloß sich die *in situ*-Hybridisierung an. Die Präparate aus der Harzeinbettung waren vor der Harzeinbettung bereits entwässert worden. Zudem löst der Alkohol das Harz aus dem Gewebe.

#### **2.9.3.5 Hybridisierung der Fichtennadel-Längsschnitte**

Nach der Entwässerung und der Lufttrocknung der Präparate aus der Gefriereinbettung bzw. nach der Fixierung der Schnitte auf die Objektträger aus der Harzeinbettung, wurden anschließend die entsprechenden Hybridisierungspuffer angesetzt. Der Ansatz erfolgte analog dem Arbeitsschema der Hybridisierung der Bakterienzellen (s.o. 2.9.2.4). Da jedoch die Präparate z.T. deutlich größer und die Schnitte auch dicker waren, als ein einfaches Bakterienzellpräparat, mußte in diesem Fall deutlich mehr Hybridisierungspuffer angesetzt werden. Für einen Objektträger waren je nach der Anzahl, Größe und Dicke der Schnitte 150 – 250 µl Hybridisierungspuffer

puffer notwendig. Die Konzentration der Oligodesoxynukleotid-Sonden im Hybridisierungspuffer betrug  $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . Dieser Ansatz wurde gemischt und anschließend für 10 min bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert und dann für 5 min auf Eis gestellt, um die Sonden zu trennen. Der Hybridisierungspuffer wurde auf die Nadelschnitte pipettiert. Daraufhin wurden die Präparate mit einer Deckfolie, einem Folienstück aus Kunststoff mit einer Größe von  $2 \times 4,5 \text{ cm}$ , das aus Autoklaviertüten hergestellt worden war, abgedeckt. Deckgläser aus Glas waren zum Abdecken der Präparate ungeeignet, da sie auf Grund des hohen Eigengewichts die Längsschnitte der Fichtennadeln niederdrückten, und wegen der Oberflächenhaftung der Deckgläschen die Fichtennadel-Längsschnitte an den Gläschen haften blieben. Beim Entfernen der Deckgläser nach der Hybridisierung und während des Waschens lösten sich so die Fichtennadel-Längsschnitte mit den Deckgläschen von den Objektträger. Nach dem Auftragen des Hybridisierungspuffers wurden die Präparate bei  $90 - 95 \text{ }^\circ\text{C}$  auf einem Heizblock für 10 min inkubiert. Durch diesen Schritt wurden alle Nukleinsäuren in den Geweben und die Oligodesoxynukleotid-Sonden voneinander getrennt und lagen als Einzelstrang vor. Im nachfolgenden Hybridisierungsschritt bei  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h lagerten sich die komplementären Nukleinsäurebereiche der Oligodesoxynukleotid-Sonden und der entsprechenden Bereiche der RNA der 16S rRNA-Moleküle passend zusammen. Bei dieser Zusammenlagerung wurden die Oligodesoxynukleotid-Sonden an ihre Zielsequenzbereiche der 16S rRNA-Moleküle gebunden. Die Inkubation der Präparate fand in einer feuchten Kammer statt. Nach der Inkubation und Hybridisierung schloß sich ein Waschschrift an.

### **2.9.4 Waschen der Präparate**

Bei dem sich an die Hybridisierung anschließenden Waschschrift wurden die nicht oder nur leicht an die komplementären Nukleinsäuren der 16S rRNA-Molekülen gebundenen Oligodesoxynukleotid-Sonden aus den Präparaten entfernt. Zu diesem Zweck erfolgte der Waschschrift unter stringenteren, verschärfteren Bedingungen als die Hybridisierung. Bei der in dieser Arbeit angewandten Vorgehensweise wurde die Temperatur der Waschpuffer um  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  höher eingestellt als die eigentliche Hybridisierungstemperatur. Auf diese Weise lösten sich die schwach gebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Sonden wieder ab und konnten entsprechend aus dem Gewebe gewaschen werden, während nur die perfekt gebundenen Sonden im Gewebe zurückblieben. Neben der Temperatur waren vor allem auch die Salzkonzentrationen in den Waschpuffern von entscheidender Bedeutung, da mit Zunahme der Salzkonzentration die Stabilität der Nukleinsäureverbindungen steigt. Zusätzlich zur Temperatur und der unterschiedlichen Salzkonzentration wurde die Entfernung der unspezifischen Nukleinsäurebindungen der Oligodesoxynukleotid-Sonden durch die alkalischen Bedingungen des Waschpuffer erleichtert. Daher wurde im Waschpuffer die Base Tris eingesetzt und diese nicht mit Salzsäure abgepuffert. Tabelle 2.9

gibt einen Überblick über die für die einzelnen Sonden spezifische Zusammensetzung der Waschpuffer.

**Tab. 2.9: Waschpuffer;** Zusammensetzung für die Oligodesoxynukleotid-Sonden EUB338, Nso190 und NIT3 (GIESEKE et al., 2001)

Puffer-Substanzen	EUB338	Nso190	NIT3
Tris	20 mM	20 mM	20 mM
EDTA	5 mM	5 mM	5 mM
SDS	0,01%	0,01%	0,01%
NaCl	225 mM	20 mM	56 mM

Bei den Bakterienzell-Präparaten wurden nach dem Hybridisieren vorsichtig die aufgeklebten Inkubationskammern HybriWell™ (GRACE Bio-Labs, Inc.; bezogen durch: Science Services, München) von den Objektträgern abgezogen und die Objektträger in die entsprechend für die jeweilige Oligodesoxynukleotid-Sonde hergestellten Waschpuffer in Färbekästen aus Glas für 20 min bei genau 48 °C in einem Wasserbad (Modell W20, Memmert, Schwabach) inkubiert. Die Fichtennadel-Präparate wurden zuerst für 5 min direkt in die Waschpuffer gegeben. Nachdem sich die Deckfolien angelöst hatten, wurden diese mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Waschpuffer herausgenommen. Im Anschluß erfolgte die Inkubation bei 20 min bei 48 °C. Nach 20 min wurden die Präparate aus den Waschpuffer genommen und kurz mit bidestilliertem sterilem Wasser gespült. Nun schloß sich eine weitere Hybridisierung mit einer weiteren Oligodesoxynukleotid-Sonde an oder die Hybridisierung der Präparate war abgeschlossen.

### 2.9.5 Mehrfachnachweis

Ein großer Vorteil der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung gegenüber den anderen Nachweis-systemen wie z.B. über Radioaktivität oder Digoxigenin besteht darin, daß die Hybridisierung mit mehr als einer Oligodesoxynukleotid-Sonde ausgeführt werden kann. Dies erlaubt Oligodesoxynukleotid-Sonden unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen und verschiedenen Spezifitäten bzgl. der Zielnukleinsäuren auf ein und demselben Präparat wie z.B. Bakterienzellen oder Gewebeschnitten anzuwenden. Damit ist eine Detektion unterschiedlicher Bakteriengruppen mit unterschiedlichen Oligodesoxynukleotid-Sonden in ein und demselben Fichtennadelgewebe möglich (LEITCH et al., 1994). Eine parallele Hybridisierung war in dieser Arbeit aufgrund der zu großen Unterschiede in den Hybridisierungsbedingungen, z.B. Formamid-Konzentrationen und Salzkonzentrationen im Waschpuffer, nicht möglich. Daher mußten die einzelnen *in situ*-Hybridisierungsschritte mit den unterschiedlichen Oligodesoxynukleotid-Sonden nacheinander ausgeführt werden. Zuerst wurde die Hybridisierung mit derjenigen Oligodesoxynukleotid-

Sonde durchgeführt, welche die höchste Stringenz aufwies. Diese Oligodesoxynukleotid-Sonde konnte bei den nachfolgenden Hybridisierungen und Waschschritten dann nicht mehr aus dem Präparat entfernt werden. Die Oligodesoxynukleotid-Sonde mit den sanftesten Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurde zuletzt auf das Präparat aufgetragen.

### 2.9.6 Gegenfärbung

Zur Überprüfung der Effizienz der *in situ*-Hybridisierung wurde bei allen Präparaten eine Gegenfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) durchgeführt. DAPI zeigt eine spezifische Affinität zu AT-reicher, einzel- und doppelsträngiger DNA. Durch UV-Licht kann dieser Farbstoff bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm angeregt werden und besitzt eine Emissionswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm. Aufgrund dieser Eigenschaften wird DAPI zu fluorezenzoptischen Nachweisen für jegliche Form von DNA eingesetzt. DAPI eignet sich besonders für die Gegenfärbung, da Anregungs- und Emissionslicht dieses Farbstoffes nicht mit dem emittierten Licht der Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin Rot, ROX und FITC überlappt. Die Emissionswellenlänge liegt weit unter den Emissionswellenlängen der ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen, die zur Markierung der Oligodesoxynukleotid-Sonden verwendet wurden. Damit die gefärbten Präparate während der Untersuchung durch das intensive Laserlicht nicht zu schnell ausbleichen, mußten alle Präparate mit einem Antibleichmittel versehen werden (LEITCH et al., 1994).

#### 2.9.6.1 Färbung mit DAPI

Für die Gegenfärbung wurde zunächst eine DAPI-Stammlösung angesetzt ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  DAPI in bidestilliertem Wasser), die bei  $-20$  °C lichtgeschützt gelagert werden konnte. Vor Gebrauch mußte diese Stammlösung mit einem McIlvaine-Puffer (0,1 M Zitronensäure, 18 ml; 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 82 ml; pH = 7,0) um den Faktor 1:50 verdünnt werden. Für die Anfärbung wurden  $100 \mu\text{l}$  der verdünnten DAPI-Lösung auf das Präparat gegeben, dies für 10 min im Dunkeln inkubiert und im Anschluß das überschüssige DAPI mit einem Waschpuffer (4 x SSC mit 0,2% (v/v) Tween 20) wieder entfernt. Nach dem Abtropfen der Objektträger wurden die Präparate mit einem Antibleichmittel versehen.

#### 2.9.6.2 Antibleichmittel

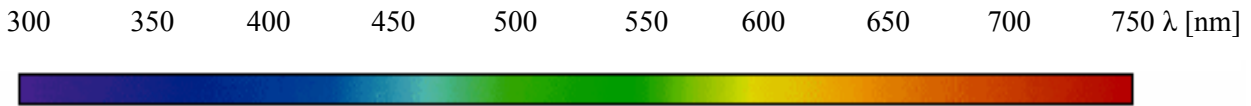
Als Antibleichmittel wurde das Antioxidans n-Propylgallat verwendet. Diese Substanz stellt für Rhodamin und FTIC das effektivste Antibleichmittel dar (GILOH & SEDAT, 1982). Zur Herstellung der Stammlösung wurden 70% (v/v) Glycerin, 25% (w/v) 0,5 M Tris (pH = 9,0) und

5% (w/v) n-Propylgallat gemischt und zum Lösen des n-Propylgallats im Wasserbad aufgeköcht. Nach dem Abkühlen erfolgte die pH-Werteinstellung der Lösung auf pH = 7,4 mit Salzsäure. Die Lösung konnte lichtgeschützt bei 4 °C für maximal 2 Monate gelagert werden. Beginn die Lösung trübe bzw. gelb zu werden, wurde sie entsorgt und neu angesetzt. Je nach Größe des Objekts wurden 50 – 150 µl Antibleichmittel auf das Objekt pipettiert und mit einem entsprechenden Deckglas abgedeckt. Überschüssiges Antibleichmittel konnte vorsichtig mit einem Filterpapier am Deckglasrand abgesaugt werden.

## **2.9.7 Mikroskopische Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop**

### **2.9.7.1 Funktionsweise**

Das konfokale Laserrastermikroskop (confocal Laser Scanning Microscop, cLSM) LSM 510 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) setzt sich aus dem inversen Durchlichtmikroskop Axiovert 100 M, einer entsprechenden Laser-Ausstattung und einer Computereinheit mit Rechner und Doppelbildschirm zusammen. Die Optik des inversen Durchlichtmikroskops Axiovert 100 M besteht aus einem Okular mit einer 10fachen Vergrößerung, einem Objektiv Plan-Neofluar 10x/0.3, einem Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat 40x/1.2W corr und einem weiteren Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat 63x/1.2W corr. So sind 100fache, 400fache und 630fache Vergrößerungen der Objekte möglich. Neben einer Mikroskopleuchte „Hal“ als Lichtquelle für die Durchlichtmikroskopie ist das Mikroskop zusätzlich mit der Mikroskopleuchte „HBO 50“ ausgerüstet, die für die Auflicht-Fluoreszenzanregung im Lichtmikroskop verwendet werden kann. Der Kondensator bietet neben einer Beobachtung der Objekte im Hellfeld auch die Möglichkeit, die Proben im Phasenkontrast zu beobachten. Sollten die Präparate für eine Phasenkontrastbeobachtung zu dick sein, besteht die Möglichkeit, die Objekte in Differential-Interferenzkontrast zu beobachten. Zur Anwendung der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie ist das Lichtmikroskop des weiteren mit den Filtersätzen 01, 09 und 15 für die Fluoreszenzmikroskopie von der Firma Carl Zeiss Jena GmbH ausgestattet. Filterset 01 ermöglicht die Betrachtung von Fluoreszenzsignalen ab einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 300$  nm (UV-Bereich) und länger, Filterset 09 eine Beobachtung ab der Wellenlänge von  $\lambda = 520$  nm, und Filterset 15 erlaubt, längerwelliges Licht ab einer Wellenlänge von  $\lambda = 590$  nm zu beobachten. Damit können also kurze, mittlere und längerwellige Fluoreszenzsignale in einem Objekt je nach Filtereinstellung unabhängig voneinander beobachtet werden. Bei Verwendung des Durchlichtes für die mikroskopische Beobachtung ist es nicht möglich, eine spezielle Wellenlänge des Lichtes (s. Abb. 2.4) herauszufiltern, da bei der Mikroskopleuchte Hal als Lichtquelle die Anregung und Emission bei gleicher Wellenlänge erfolgen. Bei der Mikroskopleuchte HBO 50 für die Auflicht-Fluoreszenz fallen Anregungs- und Emissionswellenlängen auseinander.



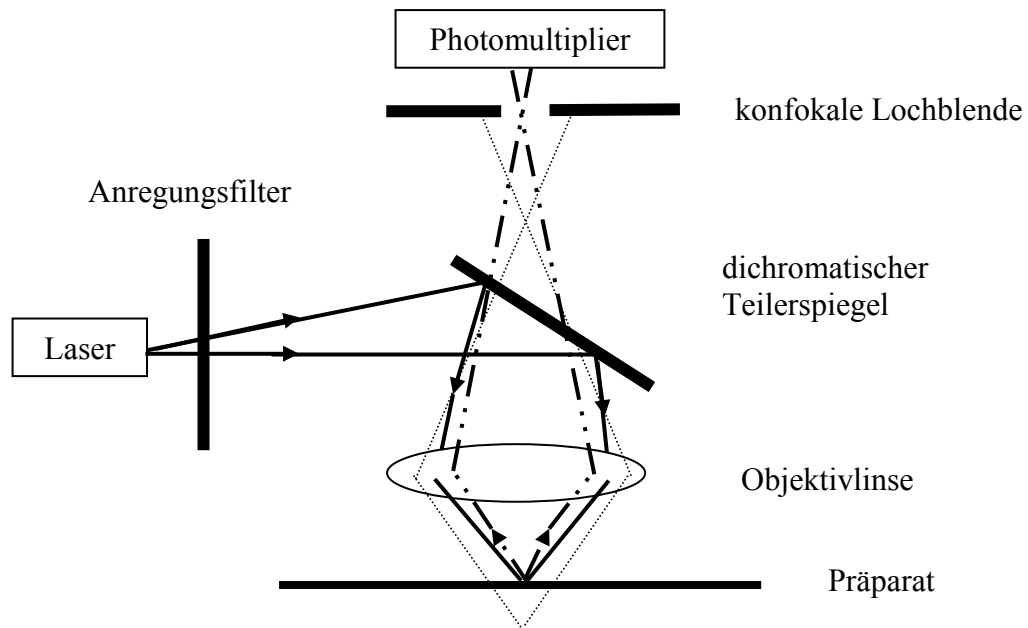
**Abb. 2.4: Wellenlängenbereich und Farbspektrum des Lichtes;** vom UV-Bereich (kurzwellig bis  $\lambda = 400$  nm) über das für das menschliche Auge sichtbare Licht ( $\lambda = 400 - 700$  nm) bis zum Beginn des Infrarotbereiches (ab  $\lambda = 700$  nm und länger)

Über ein Filter kann die Anregungswellenlänge ausgeblendet werden, so daß man im Mikroskop die Emission der Fluoreszenzsignale beobachten kann. Die Anregung der Lampe HBO50 erfolgt allerdings über die Wellenlängen:  $\lambda = 289, 297, 302, 312, 313, 334, 365, 366, 405, 408, 436, 546, 577, 579$  nm. Eine Anregung einer einzelnen Wellenlänge ist nicht möglich. Durch die Verwendung von Laserlicht kann man - im Gegensatz zur Anregung mit der Halogenlampe HBO50 - Licht einer definierten Wellenlänge für die Anregung erzeugen. Damit ist es möglich, das Spektrum der Emissionswellenlängen einzuengen und eindeutige Fluoreszenzsignale zu erhalten. Es können also mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, da bereits die Anregung für einen Fluoreszenzfarbstoff spezifisch eingestellt werden kann. Zudem ist eine saubere und eindeutige Auftrennung der Emissionswellenlängen über die Filter möglich. Das cLSM ist mit entsprechenden Lasern ausgestattet (s. Tab. 2.10). Ferner haben die Laser den Vorteil, daß es sich um Licht mit einer hohen Energie handelt, das im Vergleich zu dem Licht aus der Halogenlampe HBO50 wesentlich tiefer in das Gewebe eindringen kann. Man kann somit nicht nur die Fluoreszenzsignale auf Oberflächen von Präparaten untersuchen, sondern es besteht die Möglichkeit, im tiefer gelegenen Gewebe Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen, deren emittiertes Licht dann im Mikroskop beobachtet werden kann. Daher kann man mit dem cLSM vor allem Proben untersuchen, die für das Lichtmikroskop bereits zu dick sind. Eine Voraussetzung ist allerdings, daß das Präparat für die Laserlichtanregung zugänglich ist. Die Laserausstattung des cLSMs besteht aus folgenden vier Lasern:

**Tab. 2.10: Laserausstattung des cLSM 510**

Laserbezeichnung	maximale Leistung [mW]	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Licht-Bereich
Coherent Enterprise 653II	80	351 364	ab 397	UV-Bereich
LASOS LGK 7812 ML-1/LGN 7812	25	458 488 514	ab 515	Grünbereich
Uniphase M. 1674 P	1	543	ab 590	Gelbbereich
LASOS LGK 7628-1	5	633	ab 660	Rotbereich

Nach der Auswahl und der Fokussierung des zu untersuchenden Bereiches auf dem Präparat durch die Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie wird bei der konfokalen Laserrastermikroskopie der zu untersuchende Bereich mit einem oder mehreren Laserlichtpunkten abgetastet. Das Licht des oder der Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe an, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das vom Präparat emittierte Licht trifft auf eine konfokale Lochblende (s. Abb. 2.5), auch Pinhole genannt, die auf der selben Höhe wie der Brennpunkt des emittierten Lichts (konfokal) der Fokusebene angeordnet ist.



**Abb. 2.5: Strahlengang des Laserlichts im cLSM** (nach LEITCH et al., 1994)

- kurzwelliges Anregungslicht
- · - · - langwelliges Emissionslicht
- ..... langwelliges Emissionslicht unterhalb der Fokusebene (Streulicht)

Durch diese Lochblende gelangen nur die Lichtstrahlen aus der Schärfeebene, während die Lichtstrahlen aus den Ebenen über und unter dem Fokusbereich als Streustrahlung nicht durch die Blende gelassen werden. Ein hinter der fokalen Lochblende liegender Photomultiplier gibt das Bild Punkt für Punkt auf dem Computer-Bildschirm wieder. Durch das Abtasten untereinanderliegender Schärfeebenen, die Übereinanderlegung dieser einzelnen Bilder und die Integration durch den Computer läßt sich aus den Einzelbildern ein Bilderstapel generieren. Dieser Bilderstapel gibt einen räumlichen Eindruck und Überblick über das abgetastete Präparat wieder. Mit der entsprechenden Software des Mikroskops ist es möglich, diesen Bilderstapel weiter zu bearbeiten.

**2.9.7.2 Bilderstellung und -bearbeitung**

Vor der Bildererstellung wurden die Laser-, die Trennspiegel- und die Filterkombinationen entsprechend der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt und aufeinander abgestimmt. Die Standardkonfiguration des cLSMs für die Untersuchung der hybridisierten Fichtennadel-Präparate ist in Tabelle 2.11 aufgeführt.

**Tab. 2.11: Standardkonfiguration des cLSMs zur Untersuchung der Fichtennadel-Präparate;** HFT = Hauptfarbteiler; NFT = Nebenfärbteiler; BP = Bandpaßfilter; LP = Langpaßfilter; die Zahlen geben die Wellenlänge des Lichtspektrums wieder

Laser	Laseranregungswellenlänge	Laserleistung	Trennspiegel	Filter
UV-Laser Enterprise	364 nm	50 – 100%	HFT UV/488/543/633	BP 385-470
LASOS LGK 7812 ML-1/LGN 7812	488 nm	50%	HFT UV/488/543/633 NFT490	BP 505-530
Uniphase M. 1674 P	543 nm	50%	HFT UV/488/543/633 NFT545	LP 560

Nachdem die Konfiguration des cLSMs abgestimmt worden war, wurde die Art der Präparat-Abtastung durch den Laserstrahl festgelegt. Die Rahmengröße des digitalen Bildes lag bei 512 x 512 Pixelfelder pro Bild, was bei Anwendung des Objektivs C-Apochromat 63x einer abgetasteten tatsächlichen Fläche von 146,2 µm x 146,2 µm in der x/y-Ebene entsprach. Die Geschwindigkeit des Laserstrahles betrug 1,76 µs für ein Pixel. Der Pixelspeicherung lag bei 8 Bit, und die Abtastung erfolgte in linearer Richtung mit einer Wiederholrate bis zu 16 mal. Eine Drehung oder eine Vergrößerung in das Präparat wurde mit dem Laser nicht vorgenommen. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Kanäle für die Abtastung vorbereitet. Für jeden benutzten Laser war ein Kanal zur Detektion des Emissionslichtes vorhanden. Entsprechend mußte für jeden Laser das Pinhole, die Detektorempfindlichkeit, die Verstärkerleistung und die Nachverstärkung eingestellt werden. Nach den Vorbereitungen für die Inbetriebnahme des cLSMs wurde nun das Präparat unter das Mikroskop gelegt und im Durchlicht gesucht und fokussiert. Im Anschluß wurde für die Bilderstellung das mikroskopische Präparat über die Aufricht-Fluoreszenz und mit dem Filtersatz 01 nach den Emissionssignalen des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI abgesucht, um feststellen zu können, ob Bakterien im Präparat vorhanden waren. Wenn keine Signale gefunden werden konnten, wurde davon ausgegangen, daß sich keine Bakterien im Präparat befanden. Diese Präparate wurden entsorgt. Waren dagegen die Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI vorhanden, wurde die Mikroskop-Einstellung geändert und von der Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie auf die konfokale Laserrastermikroskopie umgeschaltet. Unter Verwendung des UV-Lasers Coherent Enterprise wurde nun ein erstes Bild angefertigt, um zu überprüfen, ob sich die



Signale aus der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie auch mit der cLSM-Mikroskopie bestätigen ließen. War dies der Fall, wurden im weiteren Verlauf die Einstellungen des cLSMs optimiert, d.h. die Laser-Leistung, die Abtastgeschwindigkeit und -zeit, die Fokusebene, die konfokale Lochblende, die Verstärkerleistung und die Nachverstärkung sowie die Detektorempfindlichkeit wurden auf das Präparat eingestellt. Diese Optimierung wurde für jeden benutzten Laser gesondert vorgenommen, um mit jedem Laser die besten Detektionsbedingungen für die Signalerkennung zu erhalten. Diese Einstellungen waren von Laser zu Laser unterschiedlich. Damit waren alle Bedingungen erfüllt, um ein perfektes Bild in zweidimensionaler Ausdehnung zu erhalten. Für die Generierung eines Bilderstapels mußten in einem weiteren Schritt die Voraussetzungen für die Einführung einer dritten Ebene erfüllt werden, d.h. die Stapelgröße mußte zuvor festgelegt werden. Hierzu wurde unter fortlaufendem Fokussieren des Präparates bei abtastenden Lasern jeweils die erste und die letzte Bildebene bestimmt. Anschließend wurde die Stapelgröße, d.h. die Höhe des Stapels in  $\mu\text{m}$  und die Anzahl der Einzelbilder zwischen der ersten und letzten markierten Bildebene, kontrolliert, sowie darauf geachtet, daß das abzutastende Objekt sich auch tatsächlich vollständig in diesem Stapel befand. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die einzelnen Bildebenen in der Stapelhöhe überschneiden, damit kein leerer Raum zwischen den Ebenen auftrat, was zu einem Informationsverlust im späteren dreidimensionalen Bild führt. Nach diesen Kontrollen konnte nun der Bilderstapel erstellt werden. Die so erstellten Bilder und Bilderstapel wurden in den von der Software des cLSMs erstellten Datenbanken abgespeichert. Die abgespeicherten Bilder wurden nun weiter bearbeitet. Zunächst wurde ein Maßstab eingefügt und die Bilder verwechslungsfrei beschriftet. Falls notwendig wurde auch eine Kontrastverstärkung vorgenommen. Zudem wurden von den Bildern weitere Kopien erstellt, um damit Bildvarianten, wie z.B. die Laserkanalauftrennung bzw. die Intensitätsbestimmung der emittierten Fluoreszenzsignale oder die Abbildung eines Bilderstapels in seine Einzelbilder vornehmen zu können.

### 2.9.7.3 Auswertung

Für eine nähere Begutachtung der hybridisierten Fichtennadelpräparate war es zunächst wichtig, zu klären, ob über die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie Bakterien im Fichtennadelgewebe anhand von DAPI-Emissionssignalen entdeckt werden konnten. Wenn dies nicht der Fall war, mußten die Präparate als Bakterien-frei gewertet werden und wurden aussortiert. Waren DAPI-Signale zu finden, erfolgte die Aufnahme eines ersten zweidimensionalen Bildes für die nähere Analyse der aufgefundenen Probe über das cLSM. Neben einem deutlichen DAPI-Signal mußte die Probe bei der Anregung mit dem für die fluoreszenzmarkierten, im Präparat gebundenen Oligodesoxynukelotid-Sonden entsprechenden Laserlicht die jeweiligen Emissionssignale im Bild enthalten. Dies wurde anhand der Aufteilung des Bildes in die einzelnen Laserlichtka-

nähe kontrolliert. Stimmt die Signale der DAPI-Gegenfärbung mit den Signalen der Oligodesoxynukleotid-Sonden in der Lage und in der Größe im aufgeteilten Bild überein und zeigten sie sich im Gesamtbild einheitlich übereinanderliegend, konnte man davon ausgehen, daß Oligodesoxynukleotid-Sonden an Bakterien gebunden hatten, deren DNA zusätzlich mit DAPI angefärbt worden war. Zudem wurde über die Aufnahme eines Intensitätsspektrums des emittierten Lichts die entsprechende Probe kontrolliert. Auch hierbei mußten die Intensitätskurven von DAPI und den Emissionssignalen der Oligodesoxynukleotid-Sonden im selben Distanzbereich auftreten. Es folgte eine weitere Kontrolle über die Einblendung des Maßstabes. Objekte über 2 µm Größe der Einzelsignale wurden nicht als positiv gewertet. Verliefen diese Kontrollen positiv, wurde von der entsprechenden Probe ein Bilderstapel aufgenommen, der zur weiteren Auswertung diente. Im Anschluß an die qualitative Auswertung erfolgte die quantitative Auswertung der Zellzahlen der Nitrifizierer im Nadelblatt-Gewebe. Diese mußte aufgrund der trotz ausgiebigen Entwässerung und Entfärbung über die Alkoholreihe noch vorhandenen Hintergrundfluoreszenz des Nadelblattgewebes manuell vorgenommen werden. Eine klare Abgrenzung zwischen den Fluoreszenzsignalen der Fichtennadeln und den Signalen der markierten Bakterienzellen war nicht eindeutig möglich, so daß ein Computerprogramm für die automatische Bildauswertung nicht zu verwenden war. Zudem stellte sich die Vergrößerungsstufe mit dem Objektiv C-Apochromat 63x als ein Nachteil heraus, da die Vergrößerung nicht ausreichte, um eindeutige Signale für eine Computerprogramm-gestützte Quantifizierung zu erhalten. Die manuelle Auszählung der Bakterien erfolgte stets in einem Bilderstapel Einzelbild für Einzelbild sowohl in der x-, y- als auch z-Ebene, wobei die Signale der aufeinanderfolgenden Bilder in die Beurteilung einbezogen wurden. Die in einer Fichtennadel ermittelten Bakterienanzahl wurde dann entsprechend den für diese Fichtennadel vor der Hybridisierung aufgezeichneten Blattparametern zugeordnet. Durch den Abgleich aller untersuchten Fichtennadeln einer Probenahme mit und ohne Bakterienvorkommen konnte entsprechend die Menge der Bakterien auf das Frischgewicht einer Fichtennadel ermittelt werden. Aus dem Aufsummieren der Nadelfrischgewichte konnte nun die Menge der Nitrifizierer  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht bestimmt werden.

## 2.10 Geräte, Gase, Chemikalien und Enzyme

### 2.10.1 Geräte

Für die durchgeführten Arbeiten wurden i.d.R. die benutzten Geräte mit ihren entsprechenden Herstellern im Text genannt. Des weiteren sind folgende, nicht unmittelbar im Text genannte, Geräte verwendet worden:

Das bidestillierte Wasser wurde mit der Anlage „MilliQ® Water Purification System“ der Firma Millipore GmbH, Schwalbach, hergestellt. Für die Kühlung der Proben benötigtes Eis kam aus der Eismaschine „Scotsman AF10“ von der Firma Frimont s.p.a., Mailand. Flüssiger Stickstoff wurde in einem Dewar-Gefäß der Firma KGW Isotherm, Karlsruhe, transportiert und gelagert. Die Medien wurden auf den Waagen Sartorius protable PT120 bzw. PT600 (Sartorius AG, Göttingen) abgewogen und auf den Tischrührgeräten Heidolph MR-mini, Stuttgart, und IKAMAG® REO, Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen i. Brsg., gemischt. Die benutzten Kolben und Flaschen stammen von Firma Schott Glas, Mainz, bezogen von VWR International GmbH, Ismaning.

### 2.10.2 Gase und Chemikalien

BUSE GASE GmbH & Co., Bad Hönningen, Deutschland:

Kohlendioxid

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland:

Chloroform, deionisiertes Formamid, IPTG, Lysozym, Natriumdodecylsulfat, Phenol/Chloroform-Gemisch, Rotisol®, Saccharose, Tris, X-Gal, Zitronensäure

Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland:

Hefeextrakt, Pepton

Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland:

Calciumchlorid, Kupfersulfat, Manganchlorid

Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland:

flüssiger Stickstoff, gasförmiger Stickstoff

Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland:

doppelt entionisiertes Wasser, im Text als bidestilliertes Wasser bezeichnet

PLANO W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland:

Einbettungsmittel Tissue-Tek® O.C.T. Compound

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland:

Rinderserumalbumin, Gelatine

SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:

Ethidiumbromid, Ficoll 400, Gram Stain Kit, Polyvinylpyrrolidon, n-Propylgallat, Tween 20

VEB HB Labor- und Feinchemikalien, Sebnitz, Deutschland:

Agar-Agar

VWR international GmbH, Ismaning, Deutschland:

Amidoschwefelsäure, Ammoniumsulfat,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromthymolblau, Bromphenolblau, Calciumcarbonat, N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid, Chrom-(III)-Ka-

liumsulfat, 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Eisensulfat, Eisessig, Ethanol, Ethylendinitrilotetraessigsäuredinatriumsalz-Dihydrat, Fleischextrakt, Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, Formaldehydlösung, Glucose, Glycerin, Immersionsöl, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, *di*-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumnatriumtartrat, Kaliumnitrat, Kobaltchlorid, Magnesiumsulfat, N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-Dihydrochlorid, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat, *di*-Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriummolybdat, Natriumnitrit, Natrium-Perchlorat, Natriumsalz des Ethylendiamintetraacetats, Nitrat-Teststäbchen, Phenolrot, pH-Referenzpuffer pH = 4 und pH = 7, Salicylsäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Sulfanilamid, Xylencyanol, Zinksulfat

### 2.10.3 Biochemikalien

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland:

Ribonuklease I „A“

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Deutschland:

BigDye RR Terminator Cycle Sequencing Kit, Template Suppression Reagent

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland:

Agarose-1000, Standard Agarose, Desoxyribonukleosidtriphosphate, 100 bp DNA-Leiter, 1 Kb Plus DNA-Leiter™, High DNA Mass™-Leiter, M13 Forward (-20)-Primer, M13 Reverse-Primer, Proteinase K, Restriktionsenzym *EcoR* I mit REact®3-Puffer, *Taq*-DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid und Detergenz W-1, TOPO TA Cloning®-Kit

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland:

NucleoSpin® Extract 2 in 1-Kit

MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland:

Oligodesoxynukleotide für die PCR, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligodesoxynukleotid-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland:

Ampicillin-Natriumsalz, Kanamycinsulfat

## 3 Ergebnisse

Für den Nachweis, die genaue Lokalisation und die Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichte wurden zunächst die Fichtennadeln von den beiden Freilandstandorten und von den im Labor herangezogenen Fichtenkeimlingen (s. 2.2) näher charakterisiert. Im Anschluß daran erfolgte die Etablierung der PCR-Technik, der MPN-Technik und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop anhand von Bakterienstämmen. Nachdem die Untersuchungsmethoden zunächst mit Hilfe der Bakterienreinkulturen etabliert und optimiert wurden, folgte eine Wiederholung dieser Optimierungsschritte mit Fichtennadelproben, die künstlich mit den Bakterienstämmen inokuliert worden waren. Nach diesen Voruntersuchungen wurden die Proben von den beiden Untersuchungsstandorten analysiert. Zum Abschluß folgte die Untersuchung der mit Nitrifizierern inokulierten Fichtenkeimlinge, um erste Hinweise über den Besiedlungsvorgang zu erhalten.

### 3.1 Charakterisierung der Fichtennadelblätter

Um genaue Aussagen über die Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten mit autotrophen Nitrifizierern in Abhängigkeit der Fichtennadelblätter und deren Herkunft und Aussagen über den Besiedlungsvorgang durch Inokulationen von im Labor aufgezogenen Fichtenkeimlingen mit autotrophen Nitrifizierern treffen zu können, wurden zunächst die Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen sowie die Nadelblätter der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden von den Fichtennadeln die Länge, die Breite, das Gewicht der frischen Nadel, die Blattfläche und die Zahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  aufgenommen. Zusätzlich wurden das äußere Erscheinungsbild, die Nadelblatt-Oberfläche und die anatomische Nadelblattstruktur anhand eines Längsschnittes durch die Fichtennadeln aufgenommen. Die Auftrennung der Nadelproben der Jahre 2000, 2001 und 2002 nach einzelnen Nadeljahrgängen erfolgte nicht.

#### 3.1.1 Maße der Fichtennadelblätter

Die Maße der Fichtennadeln zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten sind den Tabellen 3.1 bis 3.3 zu entnehmen. Tabelle 3.1 enthält die Maße der Nadelproben des durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteten Standortes Höglwald. Das Nadelmaterial der Probenahmen der Jahre 2000 und 2001 stammte aus dem unteren Bereich der Fichtenkrone in einer Höhe von ca. 2 – 10 m. Das Nadelmaterial der Probenahme des Jahres 2002 wurde mit Hilfe eines Baumsteigers direkt aus den Fichtenkronen in ca. 35 m Höhe genommen (s. 2.3). Die in der Tabelle 3.1 ange-

gegebenen Werte geben repräsentativ die Mittelwerte aus jeweils 100 Fichtennadeln je Probenahme sowie die zugehörige Standardabweichung wieder. Die Länge der Nadeln betrug bei allen Proben im Schnitt 15 mm, die Breite etwa 1,0 mm. Das Gewicht der frischen Fichtennadeln aus den Jahren 2000 und 2001 lag bei etwa 5 mg, bei den Nadelproben aus dem oberen Kronenraum im Jahr 2002 bei ca. 8 – 9 mg. Die Blattfläche erreichte eine Größe von ca. 36,5 mm<sup>2</sup> bei den Nadeln der Jahre 2000 und 2001, im Jahr 2002 war die Blattfläche im Schnitt mit 39 mm<sup>2</sup> geringfügig, aber nicht signifikant, größer. Eine ähnliche Tendenz zeigte die Anzahl der Spaltöffnungen mm<sup>-2</sup> Blattfläche. In den Jahren 2000 und 2001 konnten bei den Nadeln aus dem unteren Kronenbereich etwa 60 Spaltöffnungen mm<sup>-2</sup> Blattfläche ermittelt werden, bei den Nadeln aus dem oberen Kronenbereich waren etwa 84 Spaltöffnungen mm<sup>-2</sup> Blattfläche zu finden. Die Fichtennadeln aus dem oberen Kronenbereich waren im Vergleich zu den Nadelproben aus dem unteren Kronenbereich zwar nicht länger und breiter, jedoch deutlich schwerer und besaßen eine geringfügig größere Nadelblattoberfläche und mehr Spaltöffnungen auf einen mm<sup>-2</sup> Blattfläche.

**Tab. 3.1: Maße der Fichtennadeln vom Standort Höglwald;** Mittelwerte aus jeweils 100 Nadeln; Standardabweichung in Klammern

Zeitpunkt der Probenahme	Länge [mm]	Breite [mm]	Gewicht [mg]	Blattfläche [mm <sup>2</sup> ]	Spaltöffnungen mm <sup>-2</sup> Blattfläche
Herbst 2000	15,2 (± 2,2)	1,0 (± 0,1)	4,22 (± 2,18)	36,2 (± 11,2)	56,3 (± 19,6)
Frühling 2001	14,9 (± 1,7)	1,0 (± 0,1)	5,70 (± 2,19)	37,5 (± 7,1)	62,4 (± 16,0)
Herbst 2001	14,4 (± 1,5)	1,0 (± 0,1)	4,43 (± 0,94)	36,1 (± 6,3)	59,8 (± 9,7)
Frühling 2002	15,8 (± 1,5)	1,1 (± 0,1)	9,85 (± 1,92)	40,4 (± 7,3)	88,3 (± 21,4)
Herbst 2002	15,0 (± 2,2)	1,0 (± 0,1)	7,80 (± 1,52)	38,2 (± 8,9)	81,1 (± 19,7)

In der Tabelle 3.2 sind die Maße der Nadelproben vom Standort Villingen, der durch Stickstofflimitierung gekennzeichnet ist, wiedergegeben. Die Probenahmen entsprachen der Vorgehensweise wie am Standort Höglwald. Die Länge der Fichtennadeln von Villingen betrug im Durchschnitt 15 mm, während die Breite etwa 1,1 mm aufwies. Das Nadelfrischgewicht der Fichtennadeln der Jahre 2000, 2001 und Frühling 2002 betrug etwa 5 mg. Die Nadelprobe des Herbstes 2002 ließ mit 13,02 mg im Vergleich zu den früheren Nadelproben ein deutlich höheres Frischgewicht erkennen. Mit einer Blattfläche von 51,3 mm<sup>2</sup> waren die Fichtennadeln des Herbstes 2002 größer als die Blattflächen der Fichtennadeln der Jahre 2000, 2001 und des Frühlings 2002 mit im Durchschnitt von 39 mm<sup>2</sup>. Vergleich man jedoch die Standardabweichungen, so zeigte sich, daß die Werte nicht signifikant voneinander abwichen. Ebenso verhielt es sich mit der Anzahl der Spaltöffnungen mm<sup>-2</sup> Blattfläche. Bei den Fichtennadeln der Jahre 2000 und 2001 waren etwa 70 Spaltöffnungen mm<sup>-2</sup> Blattfläche zu finden, bei den Nadeln aus dem oberen

Kronenbereich des Jahres 2002 hingegen etwa 84 Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche. Auch in diesem Fall unterschieden sich die Meßwerte nicht signifikant. Die Fichtennadeln vom Standort Villingen, die im Frühling 2002 aus den Kronen genommen wurden, waren im Vergleich zu den Fichtennadeln aus den Jahren 2000 und 2001 kürzer und schmaler. Eine schwache, jedoch nicht signifikante Tendenz zu einer größeren Blattoberfläche und einer erhöhten Anzahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche ließ sich bei den Fichtennadeln aus dem oberen Kronenraum im Vergleich zu den Proben aus den Jahren 2000 und 2001 erkennen. Die Fichtennadeln des Herbstes 2002 wiesen hingegen ein deutlich höheres Nadelfrischgewicht, eine größere Blattfläche und entsprechend mehr Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche auf.

**Tab. 3.2: Maße der Fichtennadeln vom Standort Villingen;** Mittelwerte aus jeweils 100 Nadeln; Standardabweichung in Klammern

Zeitpunkt der Probenahme	Länge [mm]	Breite [mm]	Gewicht [mg]	Blattfläche [ $\text{mm}^2$ ]	Spaltöffnungen $\text{mm}^{-2}$ Blattfläche
Herbst 2000	14,3 ( $\pm$ 1,3)	1,0 ( $\pm$ 0,1)	5,39 ( $\pm$ 0,98)	36,1 ( $\pm$ 5,7)	72,0 ( $\pm$ 11,4)
Frühling 2001	15,7 ( $\pm$ 2,0)	1,1 ( $\pm$ 0,1)	6,31 ( $\pm$ 1,32)	42,5 ( $\pm$ 7,8)	67,4 ( $\pm$ 9,7)
Herbst 2001	16,6 ( $\pm$ 1,9)	1,1 ( $\pm$ 0,1)	7,58 ( $\pm$ 1,28)	45,6 ( $\pm$ 8,2)	70,0 ( $\pm$ 10,9)
Frühling 2002	14,2 ( $\pm$ 1,8)	1,1 ( $\pm$ 0,1)	5,24 ( $\pm$ 1,11)	36,2 ( $\pm$ 7,2)	79,1 ( $\pm$ 12,5)
Herbst 2002	17,1 ( $\pm$ 2,8)	1,1 ( $\pm$ 0,2)	13,02 ( $\pm$ 3,55)	51,3 ( $\pm$ 13,1)	88,1 ( $\pm$ 18,5)

Einen Überblick über die Maße der Fichtennadeln der in Freiburg unter kontrollierten Laborbedingungen herangezogenen Fichtenkeimlinge gibt Tabelle 3.3. Im Jahr 2000 und 2001 wurde je eine Versuchsreihe durchgeführt, in der die unter sterilen Bedingungen herangezogenen Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert wurden (s. 2.6.7). Bei jeder Versuchsreihe wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Nadelproben der heranwachsenden Fichtenkeimlinge genommen. Die Fichtenkeimlinge besaßen zu den Zeitpunkten der Probenahmen ein Alter von 2, 4 und 6 Monaten. Die Länge der Fichtennadeln der Versuchsreihe 2000 nahm mit zunehmendem Alter der Fichtenkeimlinge von 14,7 mm auf 21,2 mm zu. Ebenso verhielt es sich mit der Breite, die auf einen Endwert von 0,8 mm zunahm. Das Gewicht der frischen Nadeln wuchs von 1,81 mg auf 2,52 mg an. Entsprechend stieg die Blattfläche von  $19,0 \text{ mm}^2$  auf  $28,4 \text{ mm}^2$  an, und die Spaltöffnungszahlen stiegen von 28,6 auf 30,2 Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche. Für die Versuchsreihe des Jahres 2001 zeigte die Länge der Fichtennadeln einen Zuwachs von 14,7 mm auf 16,3 mm und die Breite von 0,6 mm auf 0,7 mm. Das Frischgewicht der Nadeln stieg mit zunehmendem Alter der Nadeln von 1,74 mg auf 2,42 mg an, schien jedoch nach 6 Monaten Wachstum der Keimlinge wieder leicht auf 2,11 mg abzunehmen. Diese Abnahme war jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht signifikant. Dieselbe Tendenz zeichnete

sich bei der Blattfläche ab. Diese erreichte einen Wert von etwa  $22,6 \text{ mm}^2$  nach 4 Monaten und nahm mit 6 Monaten Alter wieder leicht auf einen Wert von  $20,2 \text{ mm}^2$  ab. Auch die Zahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche stieg von 26,4 Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche nach 2 Monaten auf 28,1 Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche nach 4 Monaten an, um nach 6 Monaten leicht auf 26,8 Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche abzunehmen. Auch diese Abnahmen waren unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht signifikant.

**Tab. 3.3: Nadel-Maße der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge; Mittelwerte aus jeweils 100 Nadeln; Standardabweichung in Klammern**

Jahr der Versuchsreihe	Probenbezeichnung	Alter der Fichtenkeimlinge	Länge [mm]	Breite [mm]	Gewicht [mg]	Blattfläche [ $\text{mm}^2$ ]	Spaltöffnungen $\text{mm}^{-2}$ Blattfläche
2000	t <sub>0</sub>	2 Monate	14,7 (± 2,3)	0,7 (± 0,1)	1,81 (± 0,55)	19,0 (± 4,7)	28,6 (± 9,8)
	t <sub>1</sub>	4 Monate	18,7 (± 4,1)	0,7 (± 0,1)	2,32 (± 0,78)	24,2 (± 7,3)	29,0 (± 9,3)
	t <sub>2</sub>	6 Monate	21,2 (± 3,1)	0,8 (± 0,1)	2,52 (± 0,70)	28,4 (± 5,3)	30,2 (± 9,4)
2001	f <sub>1</sub>	2 Monate	14,7 (± 2,1)	0,6 (± 0,1)	1,74 (± 0,47)	18,1 (± 4,0)	26,4 (± 8,0)
	f <sub>2</sub>	4 Monate	15,6 (± 2,5)	0,7 (± 0,1)	2,42 (± 0,88)	22,6 (± 6,0)	28,1 (± 8,3)
	f <sub>3</sub>	6 Monate	16,3 (± 2,8)	0,7 (± 0,1)	2,11 (± 0,72)	20,2 (± 6,2)	26,8 (± 11,1)

Man kann zusammenfassen, daß mit zunehmendem Alter sowohl bei der Versuchsreihe im Jahr 2000 als auch im Jahr 2001 die Länge, das Nadelfrischgewicht und die Blattfläche der Nadeln von den Fichtenkeimlinge signifikant anstiegen. Bei der Breite und der Anzahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche war ebenfalls ein Anstieg zu erkennen, dieser war jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht signifikant.

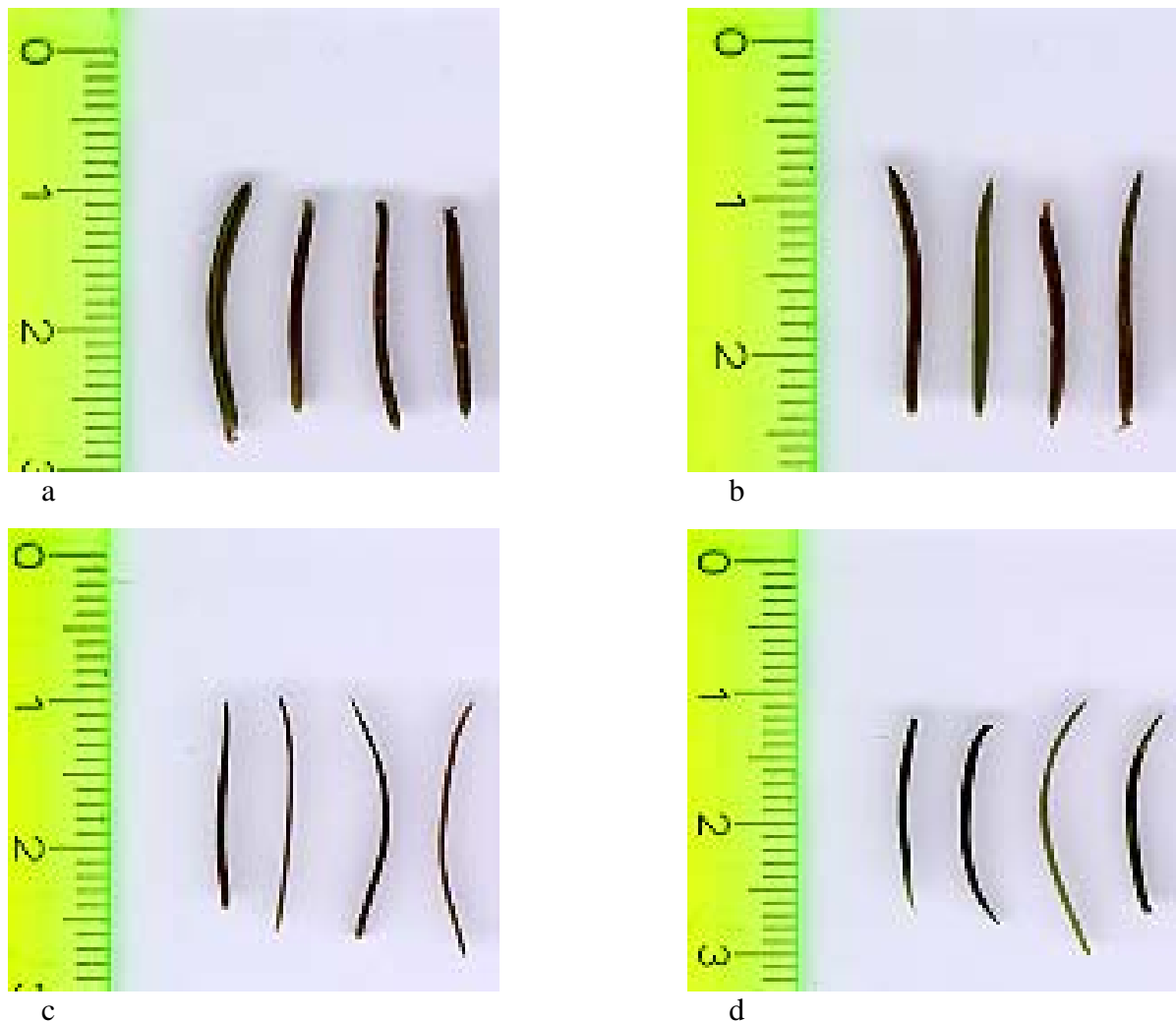
### 3.1.2 Erscheinungsbild der Fichtennadeln

Um ausschließen zu können, daß aufgrund der unterschiedlichen Standorte die Fichtennadeln evtl. abweichende oder die Besiedlung beeinflussende Strukturen aufwiesen, und um die Vergleichbarkeit der Nadelproben zu gewährleisten, wurde zunächst das äußere Erscheinungsbild aller untersuchten Fichtennadeln überprüft. Im nächsten Schritt wurde die Blattoberfläche der Fichtennadeln mikroskopisch auf Veränderungen hin untersucht. Zusätzlich wurden Längsschnitte der Fichtennadeln angefertigt, um einen Vergleich der Struktur des Apoplasten vornehmen zu können. Dieser Überprüfung wurde auch die Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlingen unterzogen.



### 3.1.2.1 Äußeres Erscheinungsbild

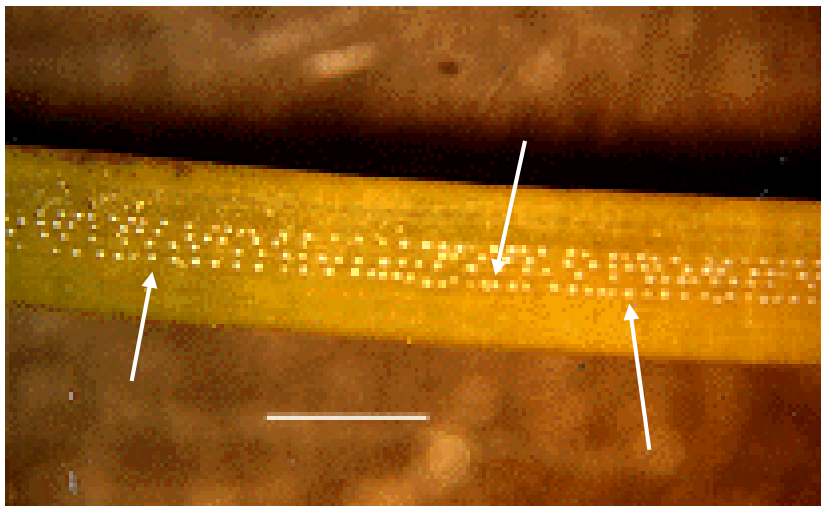
Abbildung 3.1 a bis d zeigt repräsentativ das äußere Erscheinungsbild der Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen (Abb. 3.1 a und b) des Frühlings 2002 bzw. der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Keimlinge der Versuchsreihe 2000 und 2001 (Abb. 3.1 c und d) im Keimlingsalter von 4 Monaten. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die Fichtennadeln der Freilandstandorte in ihrer Länge, ihrer Form und Breite als auch im Erscheinungsbild kaum voneinander unterscheiden. Dies gilt auch für die Fichtennadeln der beiden Versuchsreihen der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge. Die Nadeln der adulten Fichten von den Standorten Höglwald und Villingen sind eindeutig breiter und schwerer als die Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge. Sie besitzen eine größere Nadelblattoberfläche und eine höhere Anzahl von Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche.



**Abb. 3.1: Äußeres Erscheinungsbild der Fichtennadeln; a:** Fichtennadeln vom Höglwald, Frühling 2002; **b:** Fichtennadeln von Villingen, Frühling 2002; **c:** Fichtennadeln von im Labor herangezogenen Keimlingen, Versuchsreihe Jahr 2000; **d:** Fichtennadeln von im Labor herangezogenen Keimlingen, Versuchsreihe Jahr 2001

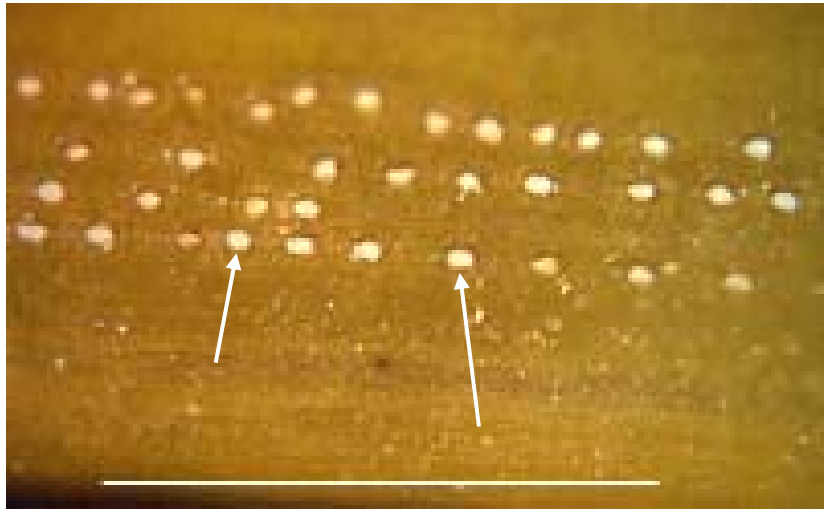
### 3.1.2.2 Nadelblatt-Oberfläche

Die Blattoberflächen der Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen sowie der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Keimlinge wurden unter dem Mikroskop näher untersucht, um eventuelle Abweichungen auf den Nadelblattoberflächen aufzuzeigen, die, bedingt durch die unterschiedlichen Standorte bzw. das Alter der Fichtennadeln, einen entscheidenden Einfluß auf die Besiedlung der Fichtennadeln mit autotrophen Nitrifizierern haben könnten. Das Hauptaugenmerk richtete sich besonders auf strukturelle Veränderungen der Wachsschicht bzw. der Epidermis der Fichtennadeln, einen möglicherweise vorhandenen Belag und dessen Stärke auf den Fichtennadeln und die Lage und Erscheinungsbild der Stomata der Fichtennadeln. Repräsentativ sind in Abbildung 3.2 und 3.3 die Oberflächen von Fichtennadeln vom Standort Villingen aus dem oberen Kronenbereich zu sehen. Abbildung 3.2 zeigt die Oberfläche einer Fichtennadel der Probenahme aus dem Frühling 2002 bei einer 25fachen Vergrößerung.



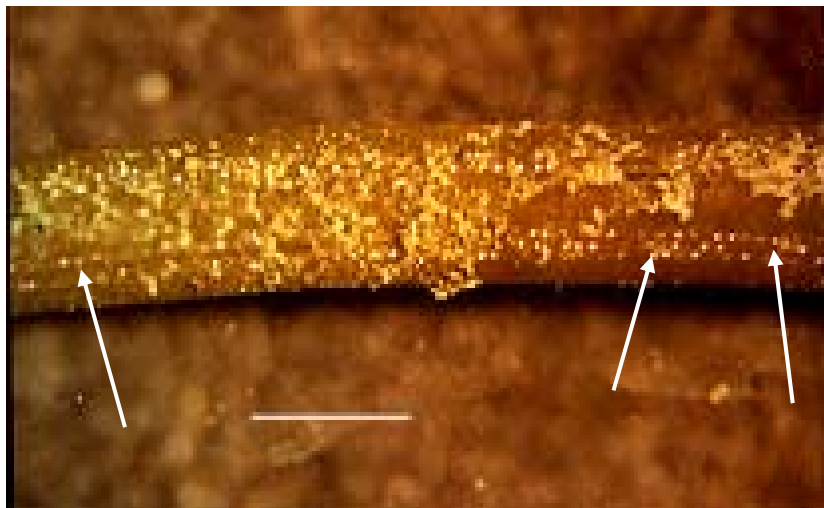
**Abb. 3.2: Blattoberfläche einer Fichtennadel vom Standort Villingen;** die Oberfläche ist gänzlich frei von jedem Belag; die Pfeile zeigen die an den weißen Wachskappen erkennbaren Stomatareihen; 25fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

Die Nadelblattoberfläche ist gänzlich frei von jedem Belag. Man kann deutlich die einzelnen Stomatareihen erkennen, die durch weiße Wachskappen über den Vorhöfen der Spaltöffnungen (Pfeile) gekennzeichnet sind (BREHMER, 1981; FINK, 1996). Eine strukturelle Veränderung der Wachs Oberfläche bzw. der Epidermis ist nicht zu erkennen. In Abbildung 3.3 sind die Stomata einer Fichtennadel aus dem Frühling 2002 bei 100facher Vergrößerung zu sehen. Deutlich sind die Stomatareihen zu erkennen, die mit weißen Wachskappen über den Vorhöfen der Spaltöffnungen bedeckt sind (Pfeile). Auch bei dieser Vergrößerung ist klar zu erkennen, daß die Fichtennadel keinen sichtbaren Belag aufweist.



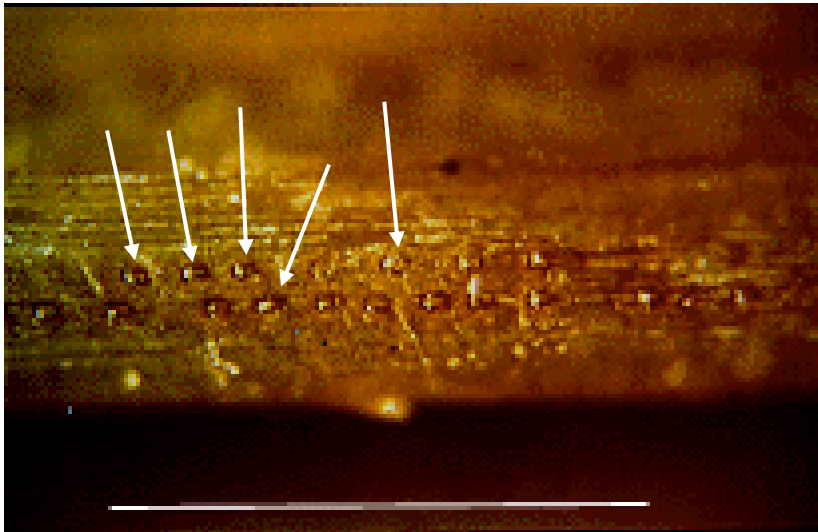
**Abb. 3.3: Stomata einer Fichtennadel vom Standort Villingen;** die Pfeile zeigen die mit Wachskappen bedeckten Stomatareihen; 100fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen repräsentativ die Oberflächen von Fichtennadeln vom Standort Höglwald aus dem oberen Kronenbereich.



**Abb. 3.4: Blattoberfläche einer Fichtennadel vom Standort Höglwald;** ein dichter, fast die ganze Oberfläche bedeckender Belag ist zu erkennen; die Pfeile zeigen freiliegende Stomatareihen; 25fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

Sehr deutlich ist in Abbildung 3.4 zu sehen, daß die Oberfläche der Fichtennadel aus dem Frühling 2002 einen dichten Belag aufweist und dieser sich fast über die gesamte Oberfläche verteilt. Die Reihen der Stomata (Pfeile) sind nur teilweise zu erkennen und liegen z.T. unter dem Belag verborgen. Strukturelle Veränderungen der Wachsschicht oder der Epidermis sind nicht zu erkennen. Die Abbildung 3.5 zeigt die Stomata einer Fichtennadel aus dem Frühling 2002 bei einer 100fachen Vergrößerung an einer Stelle, die nicht mit dem dichten Belag bedeckt ist. Man kann klar erkennen, daß die weiße Wachsschicht, die gewöhnlich den Vorhof der Stomata abdeckt, nicht vorhanden ist und die Stomata offenliegen (Pfeile).



**Abb. 3.5: freiliegende Stomata einer Fichtennadel vom Standort Höglwald;** die Pfeile zeigen freiliegende Stomata, denen die Wachskappen fehlen; 100fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

Die Nadelblattoberflächen der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge der Versuchsreihen aus den Jahren 2000 und 2001 sind repräsentativ in den Abbildungen 3.6 und 3.7 zu sehen. Die Abbildung 3.6 zeigt die Oberfläche einer Fichtennadel des Jahres 2000 in einer 25fachen Vergrößerung. Die Oberfläche ist frei von Belag und die Stomatareihen sind an ihren weißen Wachskappen deutlich zu erkennen. Veränderungen oder strukturelle Besonderheiten der Wachsschicht oder der Epidermis der Fichtennadel sind nicht zu sehen. Die Oberfläche einer Fichtennadel des Jahres 2001 ist in Abbildung 3.7 abgebildet. Auch hier ist zu erkennen, dass die Oberfläche gänzlich frei von Belag ist und die Reihen der Stomata durch die weißen Wachskappen über den Vorhöfen der Spaltöffnungen klar gekennzeichnet sind.



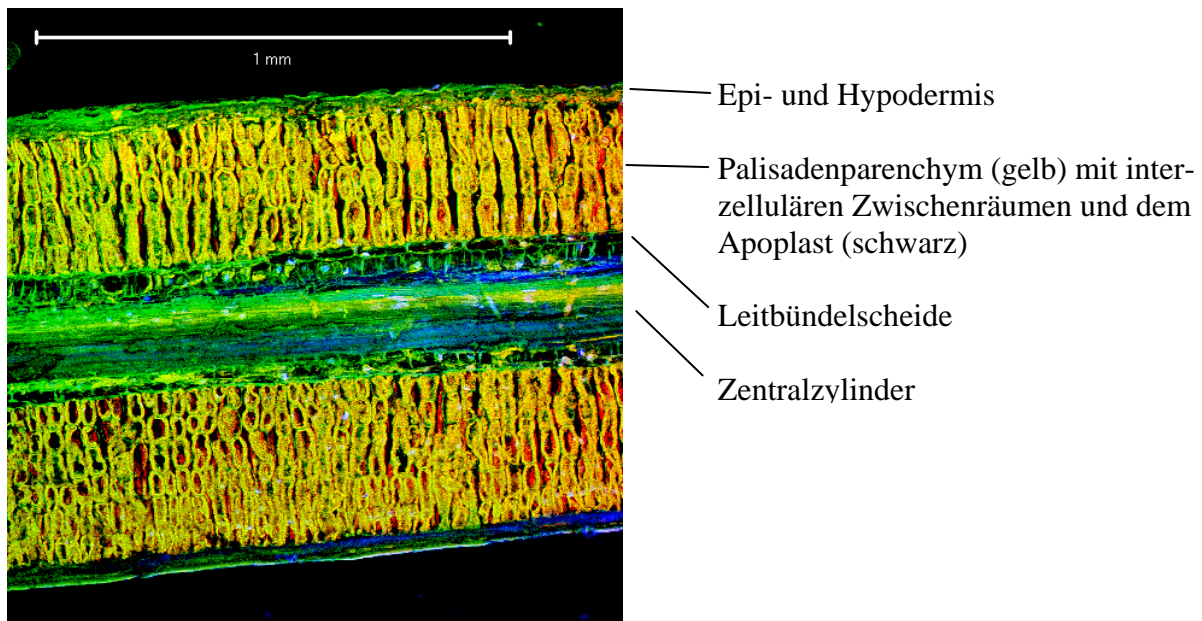
**Abb. 3.6: Blattoberfläche einer Nadel eines im Labor herangezogenen Fichtenkeimlings des Jahres 2000;** die Oberfläche ist gänzlich frei von jedem Belag; die Stomatareihen sind mit weißen Wachskappen bedeckten; 25fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm



**Abb. 3.7: Blattoberfläche einer Nadel eines im Labor herangezogenen Fichtenkeimlings des Jahres 2001;** die Oberfläche ist gänzlich frei von jedem Belag; die Stomatareihen sind mit weißen Wachskappen bedeckten; 25fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

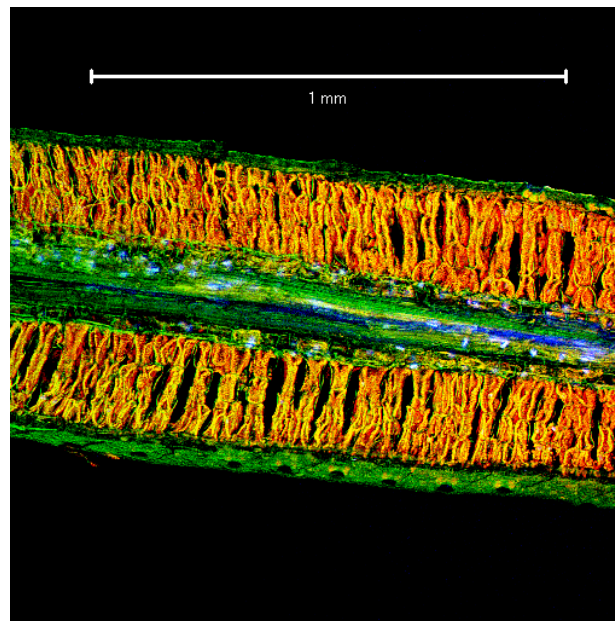
### 3.1.2.3 Nadelblatt-Apoplast

Um den Nachweis und die genaue Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten vornehmen zu können, war es notwendig, den Apoplasten der Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen sowie den Apoplasten der Fichtennadeln von den im Labor herangezogenen Fichtenkeimlingen näher zu betrachten. Zu diesem Zweck wurden Längsschnitte der Fichtennadeln angefertigt und unter dem konfokalen Laserrastermikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung auf den strukturellen Aufbau des Apoplasten hin untersucht. Die Abbildungen 3.8, 3.9 und 3.10 zeigen repräsentativ die Längsschnitte der Fichtennadeln bei einer 100fachen Vergrößerung. In der Abbildung 3.8 ist der Längsschnitt durch eine Fichtennadeln vom Standort Höglwald aus dem Frühling 2002 zu sehen. Von außen ist die Nadel durch eine Epidermis, der eine Hypodermis folgt, abgegrenzt. Es folgt das Palisadenparenchym, dessen in der Abbildung gelb erscheinenden Zellen in Reihen senkrecht von der Hypodermis zur Leitbündelscheide reichen. Die Interzellularen und der apoplastische Raum sind in der Abbildung schwarz. Der Leitbündelscheide folgt der Zentralzylinder, der in der Abbildung 3.8 blaugrün erscheint und in der Mitte der Nadel liegt (NAPP-ZINN, 1966; BRAUNE et al., 1991; FINK, 1996). Deutlich kann man erkennen, daß das Palisadenparenchym mit seinen Zellen gut ausgebildet ist und der Interzellularräum fein gegliedert und sehr kleinräumig strukturiert ist.



**Abb. 3.8: Apoplast einer Fichtennadel vom Standort Höglwald;** das Palisadenparenchym (gelb) ist gut ausgebildet und der interzelluläre Raum ist sehr kleinräumig gegliedert; 100fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

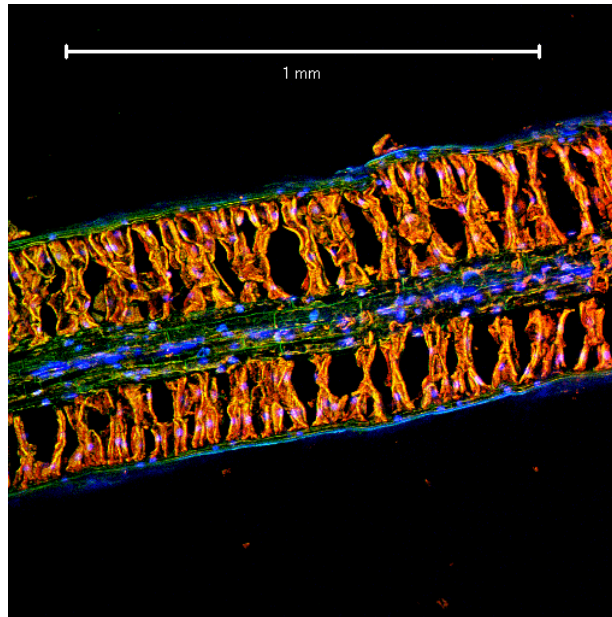
Abbildung 3.9 zeigt einen Längsschnitt durch eine Fichtennadel vom Standort Villingen des Frühlings 2002. Der strukturelle Aufbau gleicht dem Aufbau, der schon aus der Abbildung 3.8 von dem Längsschnitt der Fichtennadel vom Standort Höglwald bekannt ist und dort beschrieben wurde. Auch hier ist das Palisadenparenchym mit seinen Zellen gut ausgebildet und der Interzellularraum kleinräumig strukturiert.



**Abb. 3.9: Apoplast einer Fichtennadel vom Standort Villingen;** das Palisadenparenchym (gelb) ist gut ausgebildet; der interzelluläre Raum ist kleinräumig gegliedert; 100fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm



Einen Längsschnitt durch eine 4 Monate alten Fichtennadel aus dem Labor der Versuchsreihe 2000 stellt Abbildung 3.10 dar.



**Abb. 3.10: Apoplast einer 4 Monate alten Fichtennadel;** im Labor herangezogener Fichtenkeimling der Versuchsreihe des Jahres 2000; das Palisadenparenchym (orange) ist schwach entwickelt und der interzelluläre Raum ist großräumig gegliedert; 100fache Vergrößerung; Maßstab: 1 mm

Die Zellen des Palisadenparenchyms, die in der Abbildung orange erscheinen, sind in den jungen Nadeln entsprechend schwach ausdifferenziert. Die interzellulären Räume sind großräumig strukturiert (NAPP-ZINN, 1966). Der interzelluläre Raum und die Struktur des Apoplasten war in den Fichtennadeln aus dem Kronenbereich von den Standorten Höglwald und Villingen deutlich kleinräumiger strukturiert und setzte sich aus vielen gegliederten Räumen zwischen den Zellen zusammen. Ein Unterschied zwischen den Fichtennadeln vom Standort Höglwald war im Vergleich zu den Fichtennadeln vom Standort Villingen nicht zu erkennen. Die 4 Monate alten Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlingen zeigten hingegen ein noch nicht ausdifferenziertes Palisadenparenchym. Der interzelluläre Raum war noch sehr großräumig und die Struktur des Apoplasten schwach gegliedert.

Zusammenfassend hat die Charakterisierung der Fichtennadelblätter ergeben, daß zwischen den Fichtennadeln aus der Krone der adulten Fichten in der Breite und dem Gewicht keine signifikanten Unterschiede bestand. Auch die Blattfläche und die Zahl der Spaltöffnungen stimmten überein. Die Werte der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Keimlinge der beiden Versuchsreihen der Jahre 2000 und 2001 unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant. Ein Unterschied im äußeren Erscheinungsbild zwischen den Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen konnte nicht nachgewiesen werden, ebensowenig wie bei den Nadeln aus dem La-

bor. Die Untersuchung der Blattoberflächen ergab, daß die Fichtennadeln vom Höglwald einen dichten Belag aufwiesen und den Stomata die Wachskappen über den Vorhöfen der Spaltöffnungen fehlten. Die Nadeln vom Standort Villingen und die jungen Fichtennadeln aus dem Labor zeigten keinen Belag. Die Stomata waren bei diesen Fichtennadeln alle mit weißen Wachskappen bedeckt. Die mikroskopische Untersuchung der Nadelblätter ergab kleinräumige Strukturen der interzellulären Zwischenräumen zwischen den adulten Fichtennadeln von den Standorten Höglwald und Villingen. Bei den 4 Monate alten Fichtennadeln aus dem Labor zeigte sich hingegen der Nadelaufbau mit einem noch nicht fertig ausdifferenzierten Palisadenparenchym und einer entsprechend großräumigen Struktur des interzellulären Raumes im Palisadenparenchym.

## 3.2 Etablierung der Nachweismethoden

Für die Etablierung der Nachweismethoden der Keimzahlbestimmung über die MPN-Technik, der PCR-Technik und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop wurden zunächst die Methoden mit Bakterienkulturen getestet, anschließend die Bedingungen optimiert und erneut überprüft. Im zweiten Schritt erfolgte die Überprüfung der Nachweismethoden anhand von Fichtennadelproben, die im Labor unter sterilen Bedingungen angezogen wurden und künstlich mit den Bakterienstämmen inokuliert wurden, um herauszufinden, ob die Inhaltsstoffe aus den aufgeschlossenen Fichtennadeln und den Fichtennadelpräparaten die Nachweismethoden beeinträchtigen würden.

### 3.2.1 Optimierung mit Hilfe der Bakterienkulturen

#### 3.2.1.1 Auswahl der Oligodesoxynukleotide

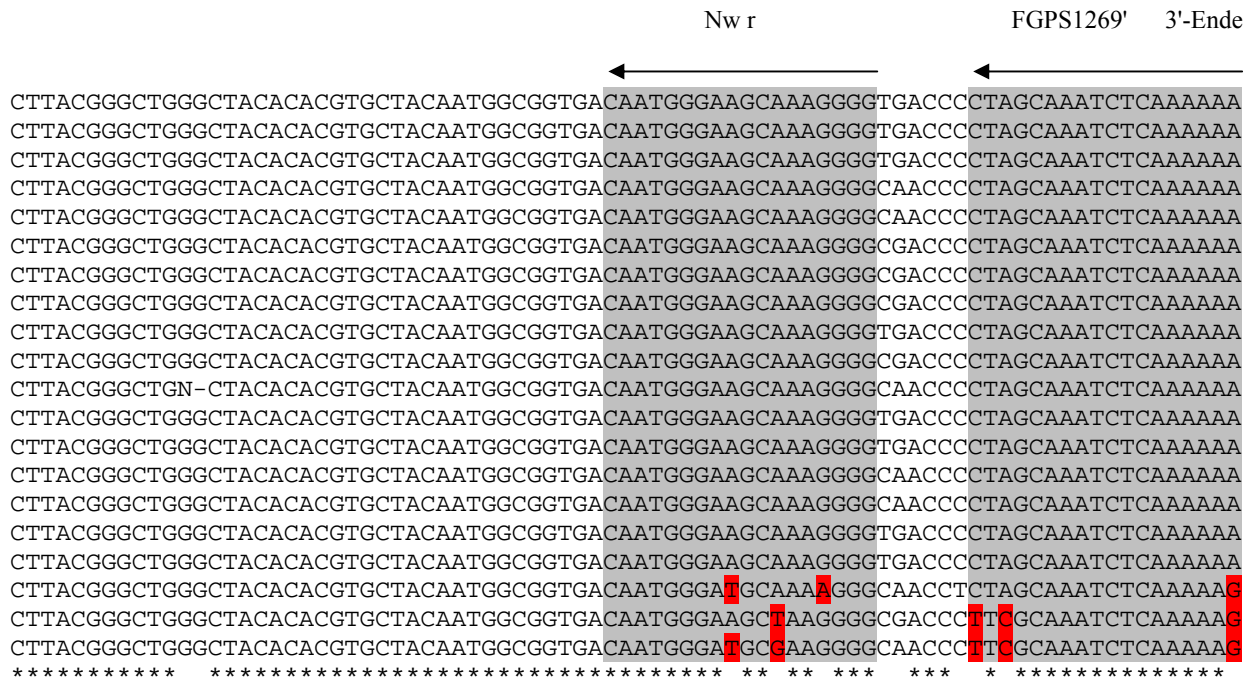
Die Auswahl und die Überprüfung der Oligodesoxynukleotide erfolgte nach der in Abschnitt 2.8.8.1 genannten Vorgehensweise. Die Oligodesoxynukleotide konnten hauptsächlich aus der Literatur entnommen werden. Neben den Oligodesoxynukleotiden aus der Literatur für die Gattung *Nitrobacter* wurden für die PCR-Technik zusätzlich neue ausgewählt, da von den in der Literatur genannten Oligodesoxynukleotide das Oligodesoxynukleotid „FGPS872“ nicht spezifisch für die Gattung *Nitrobacter* war, sondern auf viele Bakteriengattungen angewendet werden konnte (DEGRANGE & BARDIN, 1995). Zu diesem Zweck wurden alle aus den Gendatenbanken erhältlichen 16S rRNA-DNA-Sequenzen der Gattung *Nitrobacter* und je eine DNA-Sequenz des 16S rRNA-Moleküls von *Rhodopseudomonas palustris* und *Bradyrhizobium japonicum*, die phylogenetisch äußerst eng mit den Bakterien der Gattung *Nitrobacter* verwandt sind, ausgewählt und mit dem Computer-Programm „CLUSTAL W“ miteinander verglichen, um überein-



stimmende und unterschiedliche, spezifische Basenbereiche herauszusuchen. Die Abbildung 3.11 zeigt den Gensequenzvergleich. Aus der Abbildung kann man erkennen, daß das Oligodesoxynukleotid FGPS872 (grau) in allen DNA-Sequenzen, auch bei den eng verwandten Bakterienarten *R. palustris* und *B. japonicum*, eine nahezu 100%ige Übereinstimmung aufweist. Lediglich in der Sequenz von *N. sp.* (KB215) tritt eine Abweichung auf. Man kann deutlich sehen, daß dieses Oligodesoxynukleotid nicht spezifisch für die Gattung *Nitrobacter* ist und daher nur bedingt geeignet ist. Das Gegenstück zu diesem Oligodesoxynukleotid, das Oligodesoxynukleotid FGPS1269' (grau), besitzt hingegen drei unterschiedliche Basen (rot) in der Basensequenz von *R. palustris* und *B. japonicum*. Dieses Oligodesoxynukleotid ist daher spezifisch für die Gattung *Nitrobacter*. Das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid Nw f (grau) zeigt im DNA-Sequenzvergleich eine unterschiedliche Base (rot) bei den Bakterien *R. palustris* und *B. japonicum*. Das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid ist daher spezifisch für die Gattung *Nitrobacter*. Das entsprechende Gegenstück, das Oligodesoxynukleotid Nw r (grau), zeigt gleichfalls Unterschiede in der Basenabfolge (rot) bei den Bakterien *R. palustris* und *B. japonicum*. Die Basensequenzen der *Nitrobacter*-Arten stimmen alle überein. Lediglich die Basensequenz von *N. sp.* (Uncul.) weicht ab. Folglich kann man festhalten, daß das aus der Literatur entnommene Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' nur ein Oligodesoxynukleotid enthielt, das wirklich spezifisch für die Gattung *Nitrobacter* war, während das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r im Vergleich zu *R. palustris* und *B. japonicum* Basenabweichungen in beiden Oligodesoxynukleotiden besaß. Damit war das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar spezifischer als das Paar aus der Literatur und für eine PCR grundsätzlich einsetzbar.

	5'-Ende	FGPS872
		→
N alkalicus (AN1)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N alkalicus (AN2)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N alkalicus (AN4)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N hamburgensis	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N hamburg. (Nb14)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N winogradskyi	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N wino. ATCC14123	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N wino. ATCC25381	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N wino. (w)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA- GC
N wino. IF014297	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
Nitrobacter sp	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp (KB212)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCC -GCACAAGCGGTG -AGCATGTGGTTTAATTCGGCGC
N sp (KB215)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCC -GCTCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp (NRB5220)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp (PjN1)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGGGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp (R6)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp (TH21)	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
N sp Uncul	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGAWWTAATTCGA- GC
Rhodopseudomonas	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
Bradyrhizobium	TTAAA	ACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGC
	*****	***** ** ** *****





**Abb. 3.11: Spezifität der Oligodesoxynukleotide für *Nitrobacter***; Vergleich nicht codierender DNA-Sequenzen der 16S rRNA-Moleküle von *Nitrobacter* mit *R. palustris* und *B. japonicum*; die Bezeichnung der Oligodesoxynukleotide steht über den jeweilig grau unterlegten Basensequenzen (s. Tab. 2.2); die Pfeile zeigen die Amplifikationsrichtung der *Taq*-DNA-Polymerase; rot unterlegt: Abweichungen in den ausgewählten Basensequenzen der Oligodesoxynukleotide; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile mit einem Stern gekennzeichnet; die aufgeführten DNA-Sequenzen sind in den Gendatenbanken unter folgenden Accession-Nummern registriert: *N. alkalicus* (AN1): AF069956 / *N. alkalicus* (AN2): AF069957 / *N. alkalicus* (AN4): AF069958 / *N. hamburgensis*: L11663 / *N. hamburg.* (Nb14): L35502 / *N. winogradskyi*: AY055796 / *N. wino.* ATCC14123: L35507 / *N. wino.* ATCC25381: L35506 / *N. wino.* (W): L11661 / *N. wino.* IFO14297: AF363288 / *Nitrobacter sp.*: L11662 / *N. sp.* (KB212): AY055798 / *N. sp.* (KB215): AY055794 / *N. sp.* (NRB5220): AY055797 / *N. sp.* (PJN1): AY055795 / *N. sp.* (R6): L35511 / *N. sp.* (TH21): AF080257 / *N. sp.* (Uncul.): AF257076 / *Rhodopseudomonas palustris*: AF314064 / *Bradyrhizobium japonicum*: D11345

Um die Spezifität des aus der PCR-Reaktion mit dem Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r zu erwartenden PCR-Amplifikates zu überprüfen, wurde die zwischen diesen Oligodesoxynukleotiden eingefasste DNA-Sequenz mit den Daten der Gendatenbank abgeglichen. Die Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis dieses Abgleichs. Das PCR-Amplifikat erreicht bei einem Abgleich mit den 16S rRNA-DNA-Sequenzen aus der Gendatenbank „GenBank“ vollständige bzw. 99%ige Übereinstimmung mit den DNA-Sequenzen der Gattung *Nitrobacter*.

**1) [AY055796]: *Nitrobacter winogradskyi*; Identität = 236/236 (100%)**

cggagcatgagcaggtgctgcatggctgttgcagctcggtcgatggtgggtaagtcccgcaacgagc  
 gcaacccccgctccttagttgctaccatttagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
 gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgacaatgggaagcaa  
 agggg

### 3 Ergebnisse

---

2) [AY055798] *Nitrobacter sp.* KB212; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

3) [AY055795] *Nitrobacter sp.* PJN1; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

4) [AY055794] *Nitrobacter sp.* KB215; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

5) [AF069958] *Nitrobacter alkalicus strain AN4*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

6) [AF069956] *Nitrobacter alkalicus strain AN1*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

7) [AF080257] *Nitrobacter sp.* TH21; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

8) [L35507] *Nitrobacter winogradskyi (ATCC 14123)*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

9) [L35511] *Nitrobacter sp. (strain R6)*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

10) [L35506] *Nitrobacter winogradskyi (ATCC 25381)*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcccgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatthagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgaCaatgggaagcaa  
agggg

11) [L35502] *Nitrobacter hamburgensis* (strain Nb14); Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

12) [L11661] *Nitrobacter winogradskyi*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

13) [L11663] *Nitrobacter hamburgensis*; Identität = 235/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

14) [AF069957] *Nitrobacter alkalicus* strain AN2; Identität = 234/236 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

15) [AY055797] *Nitrobacter* sp. NRB5220; Identität = 235/237 (99%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

16) [AF314064] *Rhodopseudomonas palustris* strain BIS10; Identität = 233/236 (98%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

·  
·

44) [D11345] *Bradyrhizobium japonicum*; Identität = 232/236 (98%)

cggagcatggagcacaggTgctgcatggctgtTgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcgcaacgagc  
gcaacccccgtccttagttgctaccatTTtagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgaggaaggtg  
gggatgacgtcaagtccctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcgggtgacaatgggaagcaa  
agggg

**Abb. 3.12: Spezifität des PCR-Amplifikates mit den Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r;** die höchsten Identitäten erreichen nur die 16S rRNA-DNA-Sequenzen der Gattung *Nitrobacter*; grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r; rot unterlegt: abweichende Basen im Vergleich zur ersten Gensequenz von *Nitrobacter winogradskyi* (AY055796); Stand: 2003

So stammen die ersten 15 aufgeführten nicht codierenden DNA-Sequenzen alle von der Gattung *Nitrobacter*, bis an der 16. Stelle zum ersten Mal das phylogenetisch nah verwandte Bakte-

rium *R. palustris* mit einer Identität von 98% auftritt. Auch das Bakterium *B. japonicum*, welches ebenfalls phylogenetisch der Gattung *Nitrobacter* sehr nahe steht, erreicht eine Übereinstimmung von 98%, ist jedoch bei dem Abgleich noch hinter *R. palustris* an Position 44 zu finden. Bedeutend wichtiger als die Übereinstimmung in % war jedoch die Tatsache, daß nicht übereinstimmenden Basen, die in Abbildung 3.12 rot unterlegt sind, bei den Sequenzen von *R. palustris* und *B. japonicum* genau im Bereich der neu ausgewählten Oligodesoxynukleotide zu liegen kamen. Durch eine entsprechende Optimierung der Bedingungen und eine Steigerung der Stringenz bei der PCR-Anwendung konnte damit verhindert werden, daß die Oligodesoxynukleotide sich fehlerhaft an mögliche 16S rRNA-DNA-Sequenzen der phylogenetisch nah verwandten Bakterien anlagern konnten. So konnten mit der entsprechenden Einstellung bei der PCR-Anwendung tatsächlich nur die 16S rRNA-DNA-Sequenzen der Bakterien der Gattung *Nitrobacter* amplifiziert werden. Somit war es gelungen, ein weiteres spezifisches Oligodesoxynukleotid-Paar für die Gattung *Nitrobacter* auszuwählen.

Der nächste Schritt bestand darin, alle ausgewählten Oligodesoxynukleotide (s. Tab. 2.2 und 2.6) mit allen in den Gendatenbanken vorhandenen, aktuellen (Stand: Frühjahr 2003) DNA-Sequenzen für das 16S rRNA-Molekül aller autotropher Nitrifizierer zu vergleichen und nachzuprüfen, ob die Oligodesoxynukleotide und die Oligodesoxynukleotid-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in den Gensequenzen enthalten waren, ihre Lage in der Sequenz festzustellen und mögliche Basenunterschiede aufzudecken. Bei den Ammoniak-Oxidierern wurden die 4 Gattungen *Nitrosomonas* (113 Gensequenzen), *Nitrosospira* (95 Gensequenzen), *Nitrosovibrio* (7 Gensequenzen) und *Nitrosococcus* (11 Gensequenzen) untersucht. Abbildung 3.13 zeigt beispielhaft eine Überprüfung der 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. europaea* C31.

```

5' -ttgccggcgagtgccgaacgggtgagtaatacatcggaacgtgtccttaagtggggaataacgcatcgaaaga
3' -aacggccgctcaccgcttgcccactcattatgtagccttgacaggaattcacccttattgcgtagctttct
      CTO 189fA/B,C  →
tgtgmnaataaccgcatatctctnnggagaaaagcaggggatcgcaagacacctgcegetaaaggagcggccgatgtct
acacnnttatggcgtagaganncctcttttcgtcccctagcgttctggaacgcgatttctcgcggctacaga

gattagctagttggtggggtaaaggcttaccaggcaacgatcagtagttggtctgagaggacggccaaccacact
ctaactgatcaaccacccatttccgaatgggtccggtgctagtcacatcaaccagactctcctgcccgggttggtgta
      ← RT1r
gggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatTTTggacaatgggcnngcctgatcc-3'
cctgactctgtgccgggtctgaggatgccctccgctctcacccttaaaacctgttaccgcnnncggactagg-5'

```

**Abb. 3.13:** DNA-Sequenz für das 16S rRNA-Molekül von *N. europaea* C31; blau: Bindungsstelle der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190, spezifisch für die Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -Proteobacteria; rot: Bindungsstelle für die allgemeine Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338, spezifisch für alle *Eubacteria*; unterstrichen und fettgedruckt: die Oligodesoxynukleotide für die PCR; die Pfeile geben die Amplifikationsrichtung der *Taq*-DNA-Polymerase für den jeweiligen DNA-Strang an

In allen DNA-Sequenzen für das 16S rRNA-Molekül der Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -*Proteobacteria* ließen sich die Oligodesoxynukleotide nachweisen, nicht jedoch bei Ammoniak-Oxidierern der  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Somit war nicht nur die Spezifität der Oligodesoxynukleotide gegeben, sondern auch sichergestellt, daß diese tatsächlich in den Datensätzen spezifisch nachgewiesen werden konnten. Diese Tatsache war für eine spätere genaue Zuordnung und Auswertung weiterer Ergebnisse, z.B. aus der Sequenzierung von grundlegender Bedeutung. Die Überprüfung der Oligodesoxynukleotide für die Nitrit-Oxidierer ergab, daß diese nur bei den 22 DNA-Sequenzen der Gattung *Nitrobacter* zu finden waren. Abbildung 3.14 zeigt repräsentativ eine Überprüfung der 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. winogradskyi*.

```

5' - ccaaaactcctacgggagggcagcagctggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgccgcgtg
3' - ggtt tgaggatgccctccgtcgtcaccacctataacctgttaccgcggttcggactaggtcgttacggcgcac

agtgatgaaggccctagggttgtaagctcttttgtgcggggaagataatgacggtagccgaagaataagccccggc
tcactacttccgggatcccaacatttcgagaaaacacgcccttctattactgccatggcggttcttattcggggcgg

taacttcgtgccagcagccgcggttaatacgaagggggctagcgttgctcggaattactgggcgtaaaggggtcgcta
attgaagcacgggtcgtcggcgccattatgcttccccgatcgcaacgagccttaatgaccgcatttcccacgcat

ggcgggtctttaagt caggggtgaaatcctggagctcaactccagaactgcctttgatactgaggatcttgagttc
ccgccagaaattcagtcaccactttaggacctcgagttgaggtcttgacggaaactatgactcctagaactcaag

gggagaggtgagtggaactgaggtgtagaggtgaaattcgttagatattcgcgaagaacaccagtgccgaaggcggc
ccctctccactcaccttgacgctcacatctccactttaagcatctataagcgttcttgtggtcaccgcttccgccc

tcactggccccgatactgacgctnaggcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcc
agtgaccgggctatgactgcgantccgtgctttcgcaccctcgtttgtcctaattctatgggacatcaggtgccc

gtaaacgatgaatgccagccgttagtgggttactcactagtgggcgagcctaacgctttaagcattccgcctgggg
catttgctacttacggtcggcaatcacccaaatgagtgatcaccgcgctcgattgcgaaattcgtaaggcggacccc

      FGPS872      →
agtacggtcgcaaga ttaaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaaagcggtgaggcatgtggtttaattcga
tcatgccagcgttctaattttgagtttccttaactgccccggcggttcgccacctcgtaacacaaattaagct
                                                    Nw f
cgcaacgcgcagaaccttaccagcccttgacatgtccatgaccggtcgcagagatgtgaccttctctt gggagcat
gcggtgcgcgctcttggaaatggtcgggaactgtacaggtactggccagcgtctctacactggaagagaa gcctcgta
→
ggagcacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgctcgtgagatggtgggttaagtcggcaacgagcgcgaacc
cctcgtgtccacgacgtaccgacagcagtcgagcacagcactctacaaccaattcagggcgttgctcgcgtggg

ccgtccttagttgctaccatttagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgcgaggaaggtggggatg
ggcaggaatcaacgatggttaaatcaactcgtgagattcctctgacggccactattcggcgctccttccaccctac

acgtcaagtcctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgacaatgggaagcaaagggg
tgcagttcaggagtaccgggaatgcccgaccgatgtgtgcacgatgttaccgcaact gttacccttcgtttcccc
                                                    Nw r
cgaccctagcaaatctcaaaaaaacgctcagttcggattgggctctgcaaccgagcccatga-3'
gctgggg gatcgtttagagttttttggcagagtcagcctaaccgagacgttgggctcgggtact-5'
←
      FGPS1269'

```

**Abb. 3.14:** DNA-Sequenz für das 16S rRNA-Molekül von *N. winogradskyi*; grün: Bindungsstelle der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3, spezifisch für die Gattung *Nitrobacter*; rot: Bindungsstelle für die Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338, spezifisch für alle *Eubacteria*; unterstrichen und fettgedruckt: Oligodesoxynukleotide für die PCR; die

Pfeile geben die Amplifikationsrichtung der *Taq*-DNA-Polymerase für den jeweiligen DNA-Strang an

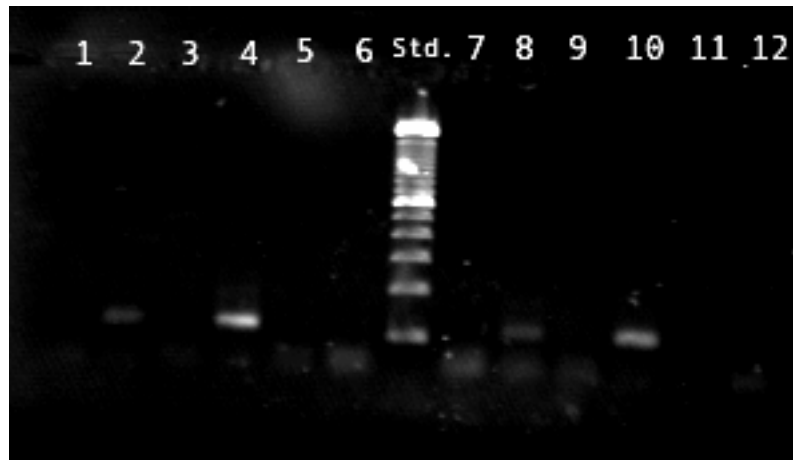
Bei den Gattungen *Nitrospira* (32 Sequenzen), *Nitrococcus* (1 Gensequenz) und *Nitrospina* (7 Gensequenzen) war hingegen nur die Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 - spezifisch für alle *Eubacteria* - nachzuweisen. Damit waren die Oligodesoxynukleotide tatsächlich nur für die Gattung *Nitrobacter* spezifisch. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß alle aus der Literatur und der Gendatenbank ausgewählten Oligodesoxynukleotide, sowohl für die Anwendung in der PCR-Technik als auch in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung theoretisch spezifisch für die entsprechenden Bakteriengruppen waren und dies durch eine Überprüfung an aktuellen DNA-Sequenzen bestätigt werden konnte.

#### 3.2.1.2 PCR-Testreihen der ausgewählten Oligodesoxynukleotide

Um den direkten Nachweis von autotrophen Nitrifizierern aus den MPN-Ansätzen und später aus den Fichtennadeln-Proben über die PCR-Technik führen zu können, war es nach der Auswahl der entsprechenden Oligodesoxynukleotide notwendig, die Reaktionsbedingungen für die PCR-Anwendung zu optimieren und die Spezifität der Oligodesoxynukleotide durch praktische Testreihen zu kontrollieren. Für die ersten Testreihen der PCR-Anwendung wurden zunächst die DNA-Abschnitte des 16S rRNA-Moleküls anhand der Reinkulturen und der autotrophen Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes amplifiziert. Neben der Funktionalität der PCR-Anwendung wurden die Auswirkungen einer 10%igen Magermilchlösung getestet. Dieser Zusatz sollte potentielle pflanzliche Inhibitorsubstanzen abfangen, was insbesondere bei DNA-Präparationen aus Pflanzenmaterial hilfreich sein konnte ([www.biologie.uni-ulm.de/bio2/knoop/met.html](http://www.biologie.uni-ulm.de/bio2/knoop/met.html)). Abbildungen 3.15 bis 3.17 zeigen die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Testreihen. Für die Positivkontrolle der Ammoniak-Oxidierer wurde als Ausgangsmaterial die DNA von *N. europaea* C31 verwendet. Die Negativkontrollen wurden mit der DNA von *E. coli* TG1, *R. rhodochrous*, *N. winogradskyi* und einer Leerprobe, bei der die DNA durch steriles bidestilliertes Wasser ersetzt worden war, durchgeführt. Daneben wurde die DNA der Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes eingesetzt, um die Anwesenheit der Ammoniak-Oxidierer zu überprüfen. Die Abbildung 3.15 zeigt das Ergebnis dieses PCR-Testlaufes. Während in den Spuren 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11 und 12, welche die Negativkontrollen repräsentieren, keine DNA-Banden im Agarose-Gel zu erkennen sind, kann man in den Spuren 2 und 8, die als Ausgangsmaterial die DNA von *N. europaea* C31 enthielten, deutlich zwei DNA-Banden im Agarose-Gel erkennen, die entsprechend der Basenlänge des Amplifikates von 116 Basen im Vergleich mit dem Größenstandard in der richtigen Höhe liegen. Auch in den Spuren 4 und 10, die als Ausgangsmaterial die DNA der aus dem Höglwald angereicherten autotrophen Nitrifizierer ent-



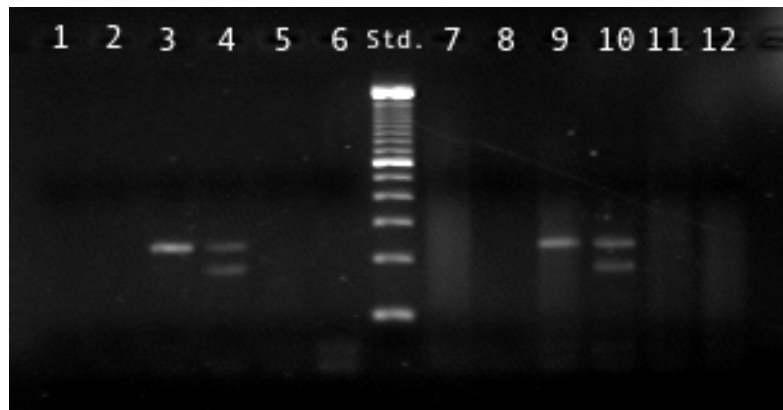
hielten, kann man zwei DNA-Banden erkennen, die in ihrer Lage den Banden von *N. europaea* C31 gleichen und die entsprechende Länge im Agarose-Gel aufweisen.



**Abb. 3.15: PCR-Positivkontrolle für Ammoniak-Oxidierer;** deutlich sind die PCR-Amplifikate in den Spuren 2, 4, 8 und 10 zu sehen; Spur: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Nitrifizierer vom Höglwald, 5. *R. rhodochrous*, 6. Probe mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Nitrifizierer vom Höglwald, 11. *R. rhodochrous*, 12. Probe mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler PCR-Ansatz; Probe 7 - 12 PCR-Ansatz mit 10%iger Magermilch-Lösung

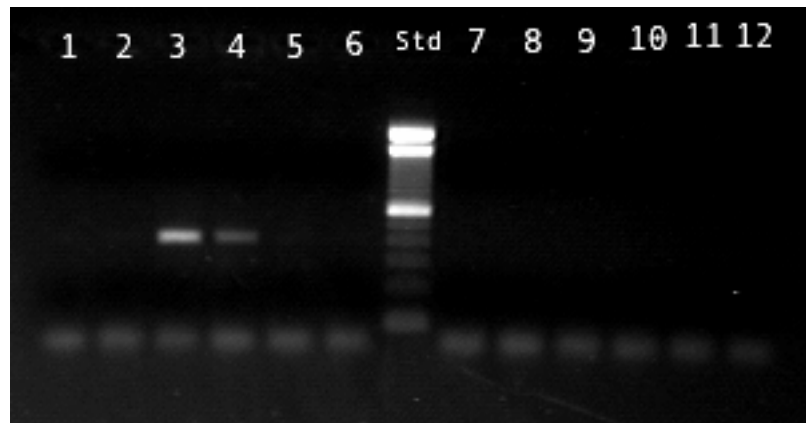
Aus den Testreihen konnte man entnehmen, daß die PCR-Anwendung zur Amplifikation des 16S rRNA-DNA-Sequenzabschnittes mit den Oligodesoxynukleotiden für die Ammoniak-Oxidierer erfolgreich verlaufen war. Erstmals wurde anhand der PCR-Technik gezeigt, daß sich in der Nitrifizierer-Mischkultur aus der organischen Auflage des Höglwaldes Ammoniak-Oxidierer nachweisen ließen. Die Testreihe zur Kontrolle der Oligodesoxynukleotide für die Amplifikation des entsprechenden 16S rRNA-DNA-Sequenzabschnittes der Nitrit-Oxidierer wurde zunächst mit den neu ausgewählten Oligodesoxynukleotiden Nw f und Nw r durchgeführt, anschließend erfolgte der Test mit den aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotiden FGPS872 und FGPS1269'. In diesen Ansätzen diente als Positivkontrolle die DNA von *N. winogradskyi*, während das übrige DNA-Ausgangsmaterial die Negativkontrolle bildete. Die DNA-Vorlage der autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes sollte auf das Vorkommen von Nitrit-Oxidierern überprüft werden. Aus Abbildung 3.16 kann man das Ergebnis der Testreihe mit den neu ausgewählten Oligodesoxynukleotiden Nw f und Nw r entnehmen. Die Spuren, die als Ausgangsmaterial die DNA für die Negativkontrollen enthielten, also 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11 und 12, zeigen erwartungsgemäß keine DNA-Banden im Agarose-Gel. Die Spuren mit der DNA von *N. winogradskyi*, Spur 3 und 9, zeigen hingegen DNA-Banden, die im Vergleich mit dem Größenstandard und der Länge von 236 Basen auf der richtigen Höhe liegen. Die Spuren 4 und 10, welche die DNA der Nitrifizierer vom Standort Höglwald enthalten, zeigen jeweils zwei

DNA-Banden. Die oberen DNA-Banden entsprechen der Länge und der Lage im Agarose-Gel dem DNA-Signal aus der Positivkontrolle von *N. winogradskyi* (vgl. Spur 3 und 9).



**Abb. 3.16: PCR-Positivkontrolle für Nitrit-Oxidierer mit den Oligodesoxynukleotiden Nw f und Nw r;** man kann klar die PCR-Amplifikate in den Spuren 3, 4, 9 und 10 sehen; die Spuren 4 und 10 zeigen zusätzlich zwei weitere DNA-Banden; Spur: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Nitrifizierer vom Höglwald, 5. *R. rhodochrous*, 6. Probe mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Nitrifizierer vom Höglwald, 11. *R. rhodochrous*, 12. Probe mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler PCR-Ansatz; Probe 7 - 12 PCR-Ansatz mit 10%iger Magermilch-Lösung

Daneben sind deutlich kürzere Banden mit einer Länge von ca. 190 Basen zu erkennen. Die oberen Banden in den Spuren mit der DNA der Nitrifizierer vom Höglwald zeigten, daß Nitrit-Oxidierer vorhanden waren. Bei den unteren Banden konnte es sich um Artefakte einer fehlerhaften PCR-Reaktion handeln oder das DNA-Ausgangsmaterial enthielt DNA-Sequenzen, die eine unerwartete Bindungsstelle für die Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r boten. Die Nitrit-Oxidierer waren mit den Oligodesoxynukleotiden Nw f und Nw r nachzuweisen. In einem weiteren Test wurden die aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotide FGPS872 und FGPS1269' für die Nitrit-Oxidierer überprüft. Das DNA-Ausgangsmaterial wurde entsprechend dem Test für die Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r (s. o.) verwendet. In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse dieser Testreihe zu sehen. Die Negativkontrollen in den Spuren 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11 und 12 zeigen erwartungsgemäß keine DNA-Banden im Agarose-Gel. Von den Positivkontrollen ist nur in der Spur 3 eine deutliche DNA-Bande zu erkennen, während in Spur 9 keine DNA-Bande zu finden ist. Die DNA-Bande aus Spur 3 weist im Vergleich mit dem Größenstandard die richtige Länge von 397 Basen auf und liegt im Agarose-Gel an der erwarteten Position. In Spur 4 ist das Amplifikat mit der DNA der Nitrifizierer vom Höglwald zu erkennen. Es zeigt sich nur eine DNA-Bande. Das ließ darauf schließen, daß es sich in der DNA-Probe der Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes tatsächlich um Nitrit-Oxidierer, genauer um Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*, handelte.



**Abb. 3.17: PCR-Positivkontrolle für Nitrit-Oxidierer mit den Oligodesoxynukleotiden FGPS872 und FGPS1269'**; in den Spuren 3 und 4 sind die PCR-Amplifikate gut zu erkennen; im Ansatz mit 10% Magermilch fehlen diese Banden; Spur: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Nitrifizierer vom Höglwald, 5. *R. rhodochrous*, 6. Probe mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Nitrifizierer vom Höglwald, 11. *R. rhodochrous*, 12. Probe mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler PCR-Ansatz; Probe 7 - 12 PCR-Ansatz mit 10%iger Magermilch-Lösung

Als Fazit aus den Testreihen konnte man festhalten, daß über die PCR-Anwendungen die autotrophen Nitrifizierer nachzuweisen waren. Bei den Oligodesoxynukleotiden für die Ammoniak-Oxidierer verlief der Test perfekt. Bei den Testreihen für die Nitrit-Oxidierern mußte man bei der Verwendung der neu ausgewählten Oligodesoxynukleotiden Nw f und Nw r mit Artefakten rechnen.

### 3.2.1.3 Kontrolle der PCR-Amplifikate durch Sequenzierung

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikate der Testreihen wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um sicherzustellen, daß die DNA-Banden im Agarose-Gel tatsächlich den gewünschten Abschnitt der 16S rRNA-Gensequenz der autotrophen Nitrifizierer wiedergaben und nicht auf Artefakte durch eine fehlerhafte Bindung der Oligodesoxynukleotide oder auf ein Amplifikat eines falschen Gens beruhten. Zusätzlich sollte im Anschluß durch einen Abgleich der gewonnenen Sequenzen mit den verschiedenen Gendatenbanken geklärt werden, zu welchen Gruppen die autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes zuzuordnen waren. Im ersten Schritt wurde nach der Klonierung der PCR-Amplifikate von *N. europaea* C31 (s. Abb. 3.15, Spur 2) die Sequenzierung der Positivkontrolle vorgenommen, um zu testen, wie exakt die PCR-Reaktion und die folgende Sequenzierung abgelaufen waren. Der Vergleich der DNA-Sequenz des PCR-Amplifikates von *N. europaea* C31 mit der aus der Gendatenbank erhaltenen DNA-Sequenz für das 16S rRNA-Molekül von *N. europaea* C31 sollte vollständig übereinstimmen. Die Sequenzierung wurde sowohl für den codierenden als auch den nicht codierenden DNA-Strang vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Der Vergleich der

durch die Sequenzierung gewonnenen DNA-Sequenzen der PCR-Amplifikate (Klon 14.3 und 14.4) mit dem aus der GenDatenbank „GenBank“ erhaltenen Abschnitts der DNA-Sequenz von *N. europaea* C31 zeigt deutlich die fast vollständige Übereinstimmung der Sequenzen aus der PCR-Reaktion und der originalen Sequenzen aus der Datenbank.

nicht codierender DNA-Strang:

```
AO14.3r GGAGGAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTAAAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
AO14.4r GGAGGAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTAAAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
C31 GGAGAAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTAAAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
**** * * * * *
```

```
AO14.3r AGTTGGTGGGGTACAGGCTTACCAAGGCAACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
AO14.4r AGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
C31 AGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
***** * * * * *
```

codierender DNA-Strang:

```
AO14.3f CGTCCTCTCAGACCAACTACTGATCGTTGCCTTGGTAAGCCTTACCCCACCAACTAGCT
AO14.4f CGTCCTCTCAGACCAACTACTGATCGTTGCCTTGGTAAGCCTTTACCCCACCAACTAGCT
C31 CGTCCTCTCAGACCAACTACTGATCGTTGCCTTGGTAAGCCTTTACCCCACCAACTAGCT
***** * * * * *
```

```
AO14.3f AATCAGACATCGGCCGCTCCTTTAGCGCAAGGTCTTGCATCCCCTACTTTCCTCC
AO14.4f AATCAGACATCGGCCGCTCCTTTAGCGCAAGGTCTTGCATCCCCTACTTTCCTCC
C31 AATCAGACATCGGCCGCTCCTTTAGCGCAAGGTCTTGCATCCCCTGCTTTTCTCC
***** * * * * *
```

**Abb. 3.18: DNA-Sequenzvergleich *N. europaea* C31;** die 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. europaea* C31 (M96399) aus der Computerdatenbank „GenBank“ im Vergleich mit den sequenzierten Klonen AO 14.3 und AO 14.4, welche das PCR-Amplifikat desselben Organismus (*N. europaea* C31) enthalten; grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide; rot unterlegt: abweichende Basen; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

Die rot markierten Basenabweichungen in Abbildung 3.18 in den grau unterlegten Bereichen der Oligodesoxynukleotide sind auf die in den Oligodesoxynukleotiden absichtlich eingefügten variablen Basenpositionen zurückzuführen (s. Tab. 2.2). Diese wurden eingesetzt, um alle Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -Proteobacteria über die PCR-Anwendung detektieren zu können. Mit diesen austauschbaren Basenpositionen konnten sowohl die Arten der Gattung *Nitrosomonas* als auch der Gattung *Nitrospira* nachgewiesen werden. Denselben Zweck erfüllte das Oligodesoxynukleotid CTO 189fC. Daher konnten diese Stellen als korrekt gewertet werden. Die in Klon AO14.3 (erste Zeile) fehlerhafte Base Guanin wurde auf einen fehlerhaften Einbau während der PCR-Reaktion oder des Sequenzierungsansatzes zurückgeführt. Trotz dieses Fehlers wurde jedoch diese DNA-Sequenz als korrekt gewertet, da sie fast vollständig mit der Ursprungs-Gensequenz von *N. europaea* C31 übereinstimmte. Aus diesem Sequenzvergleich wurde geschlossen,

daß die PCR-Reaktion zur Amplifikation des ausgewählten Abschnittes der 16S rRNA-Gensequenz der Ammoniak-Oxidierer vollständig und richtig ablaufen würden.

Ein entsprechender Sequenzvergleich wurde mit den PCR-Proben aus den Testreihen für den Nitrit-Oxidierer *N. winogradskyi* durchgeführt. Zunächst wurde die Sequenzierung der Positivkontrolle aus dem Ansatz mit dem Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r vorgenommen (s. Abb. 3.16, Spur 3). Das Ergebnis ist aus Abbildung 3.19 zu entnehmen.

nicht codierender DNA-Strang:

```

NO3. 2f CGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGT
NO3. 3f CGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGT
Wf      CGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGT
*****

NO3. 2f TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTA
NO3. 3f TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTA
Wf      TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTA
*****

NO3. 2f AGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC
NO3. 3f AGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC
Wf      AGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC
*****

NO3. 2f TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGG
NO3. 3f TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGG
Wf      TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGG
*****

```

codierender DNA-Strang:

```

NO3. 2r CCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGC
NO3. 3r CCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGC
Wr      CCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGC
*****

NO3. 2r CATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGA
NO3. 3r CATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGA
Wr      CATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGA
*****

NO3. 2r GTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
NO3. 3r GTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
Wr      GTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
*****

NO3. 2r AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTCCATGCTCCG
NO3. 3r AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTCCATGCTCCG
Wr      AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTCCATGCTCCG
*****

```

**Abb. 3.19: DNA-Sequenzvergleich *N. winogradskyi* für Nw f und Nw r;** die 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* W (L11661) aus der Computerdatenbank „GenBank“ im Vergleich mit den sequenzierten Klonen NO 3.2 und NO 3.3, welche das PCR-Amplifikat aus demselben Organismus (*N. winogradskyi*) enthalten; grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

Erwartungsgemäß sollte der Vergleich der aus der Gendatenbank erhaltenen DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* mit der aus der Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* übereinstimmen. Wie man aus Abbildung 3.19 sehen kann, stimmen die Sequenzen der Klonen NO3.2 und NO3.3 vollständig mit der DNA-Sequenz aus der Gendatenbank überein. Damit verliefen sowohl die PCR-Reaktionen als auch die Sequenzierungsansätze fehlerlos und gaben das erwartete Ergebnis perfekt wieder. Das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r konnte angewendet werden. Abschließend wurde ein Sequenzvergleich mit dem aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' aus der Positivkontrolle *N. winogradskyi* (s. Abb. 3.17, Spur 3) vorgenommen. Der Vergleich mit der aus der Gendatenbank erhaltenen DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* sollte auch in diesem Fall vollständig übereinstimmen. Die Abbildung 3.20 zeigt diesen Sequenzvergleich.

codierender DNA-Strang:

```

NO9 . 2f TTTTTTGAGATTTGCTAGGGGTCACCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCAC
NO3 . 5f TTTTTTGAGATTTGCTAGGGGTCACCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCAC
Wf      TTTTTTGAGATTTGCTAGGGGTCACCCCTTTGCTTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCAC
      *****

NO9 . 2f GTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCGCGG
NO3 . 5f GTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCGCGG
Wf      GTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCGCGG
      *** *****

NO9 . 2f CTTATCACCGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGGT
NO3 . 5f CTTATCACCGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGGT
Wf      CTTATCACCGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGGT
      *****

NO9 . 2f TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
NO3 . 5f TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
Wf      TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
      *****

NO9 . 2f CACCTGTGCTCCATGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCATGGACATGTC
NO3 . 5f CACCTGTGCTCCATGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCATGGACATGTC
Wf      CACCTGTGCTCCATGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCATGGACATGTC
      *****

NO9 . 2f AAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
NO3 . 5f AAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
Wf      AAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
      *****

NO9 . 2f GGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAA
NO3 . 5f GGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAA
Wf      GGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAA
      *****

```

nicht codierender DNA-Strang:

```

NO9 . 2r CTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGC
Wf      TTAAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGC
      *****

```

```

NO9 . 2r  AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGCAGAGATGTGAC
Wr        AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGCAGAGATGTGAC
          *****

NO9 . 2r  CTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGA
Wr        CTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGA
          *****

NO9 . 2r  TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGA
Wr        TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGA
          *****

NO9 . 2r  GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAA-----
Wr        GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCT
          *****

```

**Abb. 3.20: DNA-Sequenzvergleich *N. winogradskyi* für FGPS872 und FGPS1269'**; die 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* W (L11661) aus der Computerdatenbank „GenBank“ im Vergleich mit den sequenzierten Klonen NO 3.5 und NO 9.2, die das PCR-Amplifikat aus demselben Organismus (*N. winogradskyi*) enthalten; grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide FGPS872 und FGPS1269'; rot unterlegt: abweichende Basen; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

Als Ergebnis konnte festgehalten werden, daß die DNA-Sequenzen für das 16S rRNA-Molekül nahezu vollständig übereinstimmen. Die rot unterlegten Basen im codierenden DNA-Strang der Klone konnten entweder auf fehlerhafte Enzymreaktionen der *Taq*-DNA-Polymerase bzw. auf eine fehlerhafte Auswertung der Fluoreszenzsignale durch das Sequenziergerät zurückgeführt werden. Dies war der Grund für die unvollständige Wiedergabe der DNA-Sequenzen des nicht codierenden DNA-Stranges. Die Sequenz des Klons NO 3.5r war wegen eines fehlerhaften Sequenzierungsansatzes nicht auswertbar. Dennoch wurde die PCR-Reaktion und die anschließende Sequenzierung als erfolgreich angesehen, da die Ergebnisse des codierenden DNA-Stranges nahezu vollständig mit der aus der GenDatenbank „GenBank“ erhaltenen 16S rRNA-DNA-Sequenz für *N. winogradskyi* übereinstimmten. Die Ergebnisse aus den Sequenzierungen der Positivkontrollen der PCR-Testreihen hatten eindeutig gezeigt, daß nicht nur die PCR-Anwendungen fehlerlos verliefen, sondern daß durch die ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paare tatsächlich die DNA-Sequenzabschnitte der 16S rRNA-Gene der autotrophen Nitrifizierer amplifiziert werden konnten. Damit waren die Oligodesoxynukleotide für die weiteren Untersuchungen einsetzbar. Zusätzlich zur Sequenzierung der PCR-Produkte aus den Positivkontrollen zum Nachweis der Anwendbarkeit der Oligodesoxynukleotid-Paare zur Detektion der Nitrifizierer wurden auch die DNA-Sequenzen der PCR-Amplifikate der autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes über eine Sequenzierung kontrolliert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit den 16S rRNA-DNA-Sequenzen der GenDatenbank „GenBank“ verglichen, um Aussagen treffen zu können, welchen Gattungen diese autotrophen Nitrifizierer höchstwahrscheinlich zuzuordnen waren.

Zunächst wurden die PCR-Amplifikate der Ammoniak-Oxidierer (s. Abb. 3.15, Spur 4) näher untersucht. Abbildung 3.21 zeigt den Vergleich der durch die Sequenzierung erhaltenen 16S rRNA-DNA-Sequenzen der Klone AO22.1 und AO4.4 im Vergleich zu den aus der GenDatenbank gewonnenen DNA-Sequenzen der Bakterien *Nitrosospira multiformis* ATCC25196, *Nitrosospira multiformis* und *Nitrosomonas europaea* C31.

nicht codierender DNA-Strang:

```

AO22.1r      GGAGCAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
AO4.4r       GGAGCAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
Nm 25196     GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
N multif     GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
N euro C31   GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
            ****  ****  *****
AO22.1r      AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
AO4.4r       AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
Nm 25196     AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
N multif     AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
N euro C31   AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
            *****  *****

```

**Abb. 3.21: DNA-Sequenzvergleich der Ammoniak-Oxidierer Höglwald;** die 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. europaea* C31 (M96399), *Nitrosospira multiformis* ATCC25196 (L35509) und *N. multiformis* C71 (M96401) aus der Computerdatenbank „GenBank“ im Vergleich mit den DNA-Sequenzen der Klone AO 4.4 und AO 22.1, welche das PCR-Amplifikat der Ammoniak-Oxidierer der autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes enthalten; grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide; rot unterlegt: abweichende Basen; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

Der Vergleich zeigt, daß die Ammoniak-Oxidierer aus der Höglwald-Kultur der Gattung *Nitrosospira* angehören. Die 16S rRNA-DNA-Sequenzen stimmen deutlich mit den Sequenzen von *Nitrosospira multiformis*, früher *Nitrosolobus multiformis*, überein, während zu *Nitrosomonas europaea* eindeutige Abweichungen in der Basenabfolge der DNA-Sequenz zu erkennen sind. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde mit der ermittelten DNA-Sequenz des Klons AO 22.1 ein Abgleich in der Datenbank „GenBank“ vorgenommen. Das Ergebnis des Abgleiches ist in Tabelle 3.4 wiedergegeben. Der Sequenzvergleich des Klons AO 22.1 mit den DNA-Sequenzen der GenDatenbank hat eindeutig in der überwiegenden Mehrzahl 16S rRNA-DNA-Sequenzen von Bakterien der Gattung *Nitrosospira*, insbesondere *Nitrosospira multiformis*, zum Ergebnis. Die grau unterlegten Felder zeigen Bakterien an, die nicht der Gattung *Nitrosospira* zugeordnet werden können. Diese wurden für eine Auswertung nicht berücksichtigt, da diese bisher noch nicht eindeutig identifiziert sind. Bei den angereicherten Ammoniak-Oxidierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Ammoniak-Oxidierer der Gattung *Nitrosospira*, höchstwahrscheinlich sogar um *Nitrosospira multiformis*.



**Tab. 3.4: Datenbankabgleich der DNA-Sequenz der Ammoniak-Oxidierer Höglwald;** in der Tabelle sind die ersten 29 Nennungen wiedergegeben, geordnet nach der höchsten Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung; Accession-Nummer: Ordnungsnummer der entsprechenden Gensequenz in der Gendatenbank; das sequenzierte PCR-Amplifikat besitzt eine Gesamtlänge von 116 Basen; grau unterlegt: Bakterien, die nicht der Gattung *Nitrosospira* zugeordnet werden können; Stand: 2003

Rangfolge	Accession-Nummer	Bezeichnung Gensequenz	Identität in %	Übereinstimmende Basen
1	AJ131808	uncultured beta proteobacterium 16S rRNA	100	110 / 110
2	AJ131807	uncultured beta proteobacterium 16S rRNA	100	110 / 110
3	AY123807	Nitrosospira multiformis 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
4	AY123805	Nitrosospira sp. Nv6 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
5	AY123804	Nitrosospira sp. Nsp17 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
6	AY123802	Nitrosospira sp. Nsp2 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
7	AF353163	Nitrosospira sp. PJA1 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
8	AF353156	Nitrosospira sp. TCH716 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
9	AB070984	Nitrosospira multiformis gene for 16S rRNA	98	114 / 116
10	AJ298725	Nitrosospira sp. 39-19 partial 16S rRNA	98	114 / 116
11	AJ298747	Nitrosospira sp. Nv6 partial 16S rRNA gene	98	114 / 116
12	AJ298746	Nitrosospira tenuis partial 16S rRNA gene	98	114 / 116
13	AJ298743	Nitrosospira sp. Nsp17 partial 16S rRNA gene	98	114 / 116
14	Z69180	Beta-proteobacterium sp. partial 16S rRNA	98	114 / 116
15	AJ003778	Unidentified beta proteobacterium 16S rRNA	98	114 / 116
16	Z69156	Beta-proteobacterium sp. partial 16S rRNA	98	114 / 116
17	U56627	Nitrosospira sp. clone D110 16S ribosomal	99	111 / 112
18	U56624	Nitrosospira sp. clone D23 16S ribosomal	98	114 / 116
19	U56623	Nitrosospira sp. clone D18 16S ribosomal	98	114 / 116
20	U56621	Nitrosospira sp. clone H38 16S ribosomal	98	114 / 116
21	U56619	Nitrosospira sp. clone H20 16S ribosomal	98	114 / 116
22	U56616	Nitrosospira sp. clone H16 16S ribosomal	98	114 / 116
23	U62872	Unidentified beta proteobacterium 16S rRNA	98	114 / 116
24	L35509	Nitrosolobus multiformis (ATCC25196) 16S r	98	114 / 116
25	M96401	Nitrosolobus multiformis 16S ribosomal RNA	98	114 / 116
26	AF304047	Uncultured Nitrosospira sp. B10 16S ribosom	99	110 / 111
27	AJ271103	Uncultured Nitrosospira rt16S-9 partial 16S ri	99	110 / 111
28	AJ271102	Uncultured Nitrosospira rt16S-8 partial 16S ri	99	110 / 111
29	AJ271101	Uncultured Nitrosospira rt16S-7 partial 16S ri	99	110 / 111

Nach der Bestimmung der Ammoniak-Oxidierer wurden die PCR-Amplifikate der Nitrit-Oxidierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes sequenziert. Hierzu wurde das PCR-Amplifikat des aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paares FGPS872 und FGPS1269' verwendet (s. Abb. 3.17, Spur 4), da dieses PCR-Amplifikat die DNA-Sequenz der Oligodesoxynukleotide Nw f und Nw r enthält. Durch die Untersuchung des längeren PCR-Amplifikates konnte somit auch das kürzere PCR-Amplifikat untersucht werden. In Abbildung 3.22 wird der Vergleich der DNA-Sequenz des Klons NO 10.2, die durch die Sequenzierung erhalten wurde,

mit den DNA-Sequenzen der *Nitrobacter*-Stämme *N. sp.* TH21, *N. sp.* R6 und *N. winogradskyi* ATCC 25381, deren DNA-Sequenzen aus der GenDatenbank stammten, gezeigt.

nicht codierender DNA-Strang:

```

TH21      TTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
R6        TTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
ATCC25381 TTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
NO10.2r   TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
          *****

TH21      ACGCAACGCGCAG-AACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTTCGCAGAGATGTG
R6        ACGCAACGCGCAG-AACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTTCGCAGAGATGTG
ATCC25381 ACGCAACGCGCAG-AACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTTCGCAGAGATGTG
10.2r     ACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTTCGCAGAGATGTG
          *****

TH21      ACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
R6        ACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
ATCC25381 ACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
10.2r     ACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
          *****

TH21      GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTT
R6        GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTT
ATCC25381 GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTT
10.2r     GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTT
          *****

TH21      GAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
R6        GAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
ATCC25381 GAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
10.2r     GAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTC
          *****

TH21      CTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCA
R6        CTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCA
ATCC25381 CTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCA
10.2r     CTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACC-----
          *****

TH21      AAGGGGTGACCCCTAGCAAATCTCAAAAAA--
R6        AAGGGGTGACCCCTAGCAAATCTCAAAAAACC
ATCC25381 AAGGGGCGACCCCTAGCAAATCTC-----
10.2r     -----
    
```

**Abb. 3.22: DNA-Sequenzvergleich der Nitrit-Oxidierer Höglwaldes;** die 16S rRNA-DNA-Sequenz von *N. winogradskyi* ATCC25381 (L35506), *N. sp.* TH21 (AF080257) und *N. sp.* R6 (L35511) aus der Computerdatenbank „GenBank“ im Vergleich mit dem sequenzierten Klon NO 10.2, welcher das PCR-Amplifikat der Nitrit-Oxidierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes enthält; grau unterlegt: Oligodesoxynucleotide; rot unterlegt: abweichende Basen; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

Wie dieser Vergleich zeigte, konnten die Nitrit-Oxidierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes der Gattung *Nitrobacter* zugerechnet werden. Die DNA-Sequenz des 16S rRNA-

Moleküls des Klons NO 10.2 stimmte weitestgehend mit den DNA-Sequenzen der ausgewählten *Nitrobacter*-Stämme überein. Zur Absicherung wurde ein weiterer Abgleich mit allen in der Gendatenbank „GenBank“ vorhandenen Gensequenzen vorgenommen. Das Ergebnis des Abgleiches ist in Tabelle 3.5 wiedergegeben.

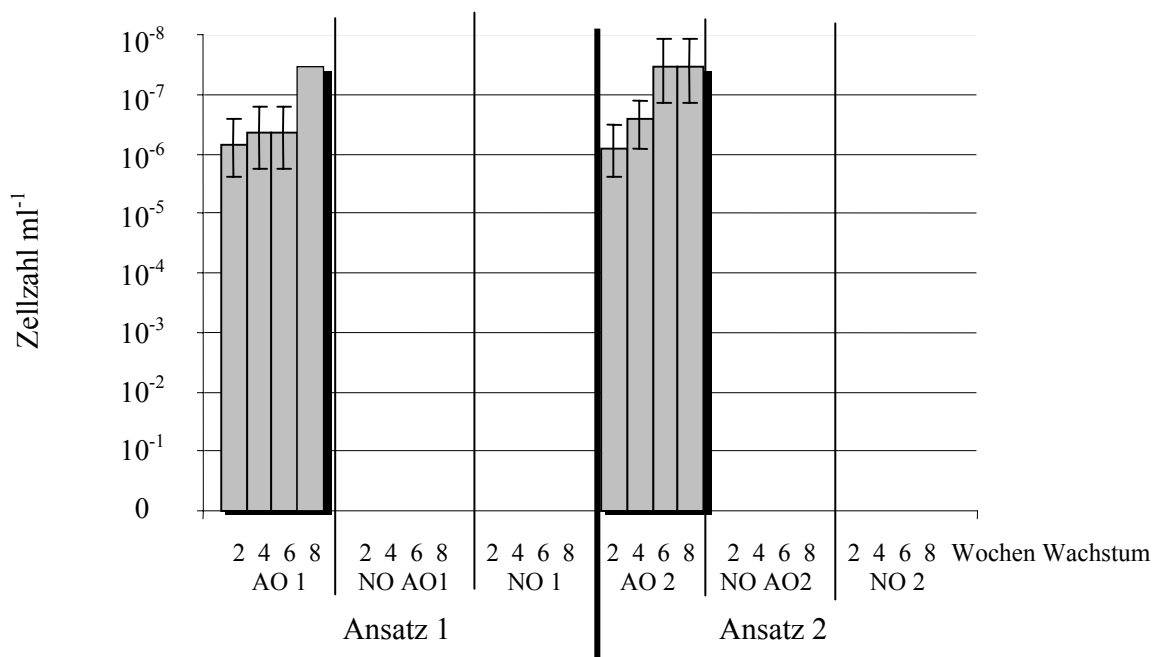
**Tab. 3.5: Datenbankabgleich der DNA-Sequenz der Nitrit-Oxidierer Höglwald;** die ersten 13 Nennungen sind in der Tabelle wiedergegeben, geordnet nach der höchsten Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung; Accesion-Nummer: Ordnungsnummer der entsprechenden Gensequenz in der Gendatenbank; das sequenzierte PCR-Amplifikat besitzt eine Gesamtlänge von 397 Basen; grau unterlegt: Bakterien, die nicht der Gattung *Nitrobacter* angehören; Stand 2003

Rangfolge	Accession-Nummer	Bezeichnung Gensequenz	Identität in %	Übereinstimmende Basen
1	AF069958	<i>Nitrobacter alkalicus</i> strain AN4 16S ribosom	99	346 / 348
2	AF069956	<i>Nitrobacter alkalicus</i> strain AN1 16S ribosom	99	346 / 348
3	AF080257	<i>Nitrobacter</i> sp. TH21 16S ribosomal RNA	99	346 / 348
4	L35511	<i>Nitrobacter</i> sp. (strain R6) 16S ribosomal	99	346 / 348
5	L35506	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> (ATCC 25381) 16S	99	346 / 348
6	L35502	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> (strain Nb14) 16S	99	346 / 348
7	L11663	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> 16S ribosomal	99	346 / 348
8	AF069957	<i>Nitrobacter alkalicus</i> strain AN2 16S ribosom	99	345 / 348
9	L35507	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> (ATCC 14123) 16S	99	345 / 348
10	AY135357	Nitrite-oxidizing bacterium MPN2 16S ribo	99	345 / 346
11	AY055795	<i>Nitrobacter</i> sp. PJN1 16S ribosomal RNA	99	345 / 348
12	AY055797	<i>Nitrobacter</i> sp. NRB5220 16S ribosomal RNA	99	345 / 348
13	AF484619	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 114d 16S ribosomal RNA	98	344 / 348

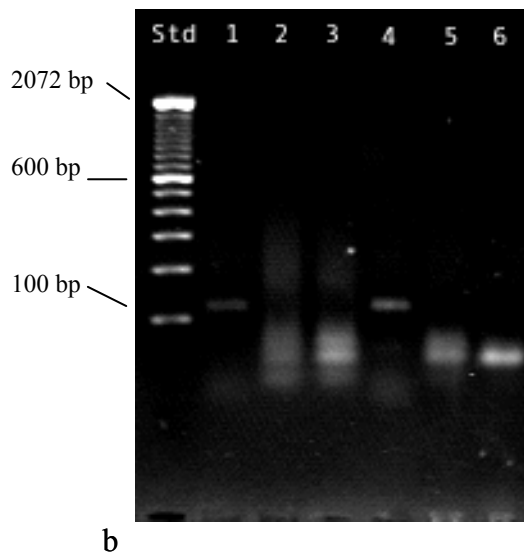
Das Ergebnis des Abgleiches mit der Gendatenbank fiel eindeutig aus. Bei den Nitrit-Oxidierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes handelte es sich um einen Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*, denn auf den ersten Plätzen mit der höchsten Übereinstimmungswahrscheinlichkeit waren nur DNA-Sequenzen von Bakterien der Gattung *Nitrobacter* aufgeführt. Erst an 13. Stelle mit einer etwas geringeren Übereinstimmungswahrscheinlichkeit folgte das mit *Nitrobacter* phylogenetisch sehr nah verwandte Bakterium *Bradyrhizobium* sp.. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß es sich bei den angereicherten autotrophen Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes bei den Ammoniak-Oxidierern um einen Vertreter der Gattung *Nitrosospira*, mit hoher Wahrscheinlichkeit um *Nitrosospira multiformis*, handelte, während der Vertreter der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* zuzuordnen war. Als Gesamtergebnis konnte man aus der Validierung der PCR-Testreihen durch die Sequenzierung festhalten, daß die PCR-Amplifikate aller Oligodesoxynukleotid-Paare in ihrer Basenabfolge mit den aus der Gendatenbank „GenBank“ recherchierten Gensequenzen übereinstimmten.

### 3.2.1.4 MPN-Ansätze und Kontrolle mit Hilfe der PCR-Technik

Nach der Auswahl und der erfolgreichen Validierung der Oligodesoxynukleotide konnte dazu übergegangen werden, die PCR-Technik auf die Anwendbarkeit als Kontrolle der MPN-Ansätze zu testen. Zu diesem Zweck wurden zunächst MPN-Ansätze mit *N. europaea* für die Ammoniak-Oxidierer, mit *N. winogradskyi* für die Nitrit-Oxidierer und mit den Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes angesetzt. Um gleichzeitig die Aussagekraft der MPN-Ansätze zu überprüfen, wurden die Ansätze mit einer vorher bestimmten Konzentration an Nitrifizierern angeimpft, um bei der späteren quantitativen Auswertung der Ansätze einen Vergleich zwischen der eingesetzten und wiedergefundenen Bakterienkonzentration treffen zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit und der letzten Auswertung wurde das Medium mit den Bakterien der positiv gewerteten Reagenzröhrchen abzentrifugiert und über die PCR-Technik der direkte Nachweis der Nitrifiziererzellen geführt. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen aus der chemischen MPN-Auswertung über die Stoffwechselendprodukte der Nitrifizierer in Relation gesetzt, um nachprüfen zu können, ob sich in den durch die chemischen Nachweise als positiv gewerteten Kulturröhrchen auch tatsächlich Nitrifiziererzellen befanden, oder ob der chemische Nachweis Artefakte lieferte. Die erste MPN-Testreihe wurde mit *N. europaea* als Ammoniak-Oxidierer gestartet. Der MPN-Doppelansatz wurde aus einer Reinkultur mit  $2 - 4 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  angeimpft. Abbildung 3.23 a und b zeigen die MPN-Ergebnisse der positiv gewerteten Röhrchen und die über Tabellen daraus ermittelten Bakterienanzahl  $\text{ml}^{-1}$  Kulturmedium sowie im unteren Bereich das dazugehörige Ergebnis der PCR-Kontrolle.



a

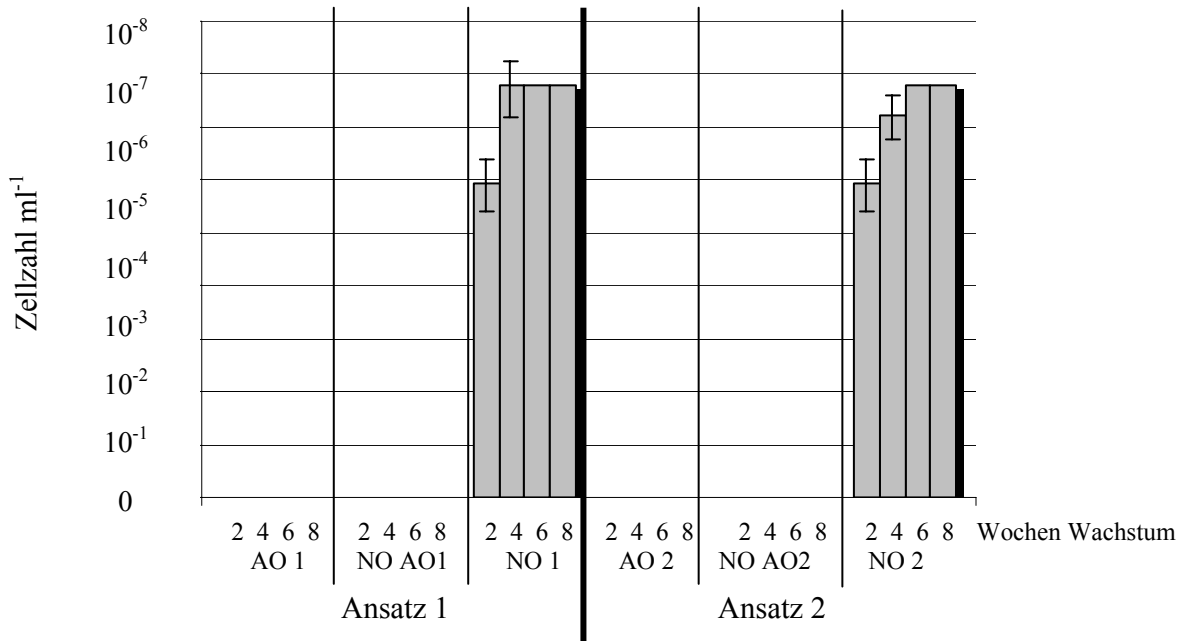


**Abb. 3.23 a: Validierung MPN-Ansatz mit *N. europaea***; die Ausgangskonzentration von  $2 - 4 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden in beiden Ansätzen mit  $2,88 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  und darüber hinaus wieder erreicht; Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen für *N. europaea*; NO AO: Kulturröhrchen für *N. europaea* auf die Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

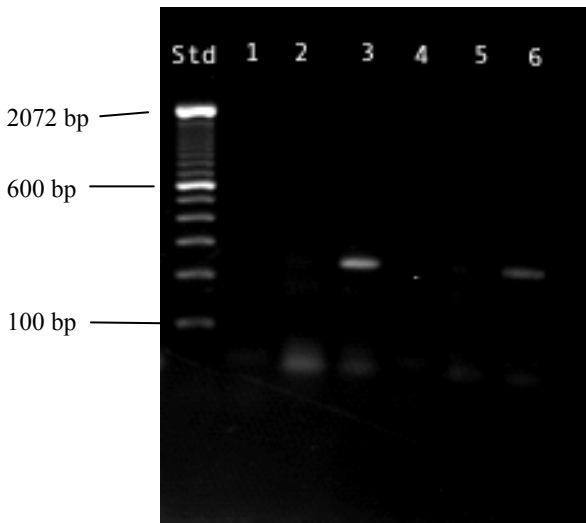
**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes**; im Agarose-Gel sind in Spur 1 und 4 - *N. europaea* aus den einzelnen MPN-Ansätzen - deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte Abschnittes des 16S rRNA-Gens von *N. europaea* zu erkennen; Nitrit-Oxidierer konnten nicht nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Der MPN-Doppelansatz mit *N. europaea* erreichte nach 8 Wochen Inkubation mit  $> 2,88 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 1 (AO 1), als auch mit  $2,88 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 2 (AO 2) die Ausgangskonzentration, welche die Ursprungskultur von *N. europaea* hatte. Nitrit-Oxidierer konnten weder in den Kulturröhrchen mit *N. europaea* vergesellschaftet (NO AO1 und NO AO2) noch alleine (NO 1 und NO 2) nachgewiesen werden. Das Ergebnis der MPN-Ansätze konnte mit der aus den MPN-Ansätzen isolierten DNA über die PCR-Kontrolle eindeutig bestätigt werden. Das PCR-Ergebnis zeigt in Spur 1 und 4 das 116 bp lange Amplifikat des 16S rRNA-Gens von *N. europaea*. Nitrit-Oxidierer konnten trotz dafür spezifischer Oligodesoxynukleotide in der PCR-Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Im zweiten MPN-Doppelansatz wurden die Nachweismethoden für die Nitrit-Oxidierer anhand einer Reinkultur mit *N. winogradskyi* überprüft. Der MPN-Doppelansatz wurde aus einer Kultur mit  $0,7 - 1,3 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  angeimpft. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 3.24 a und b zu entnehmen. Zunächst werden die Ergebnisse aus der MPN-Auswertung dargestellt, denen die Resultate aus der PCR-Anwendung folgen. Die Zellzahlen des MPN-Doppelansatzes, der mit *N. winogradskyi* beimpft worden war, übertrafen mit mehr als  $6,08 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ab der 6. Wachstumswoche im MPN-Ansatz 1 und 2 (NO 1 und NO 2) die Ausgangskonzentration von  $0,7 - 1,3 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  der Bakterienreinkultur deutlich. Ammoniak-Oxidierer konnten nicht nachgewiesen werden (AO 1 und AO 2). Die Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer, welche das für diese Bakteriengruppe spezifi-

sche Nährmedium ohne Nitrit enthielt und ebenfalls mit *N. winogradskyi* beimpft worden waren, zeigten keine Entwicklung von *N. winogradskyi* (NO AO 1 und NO AO 2).



a



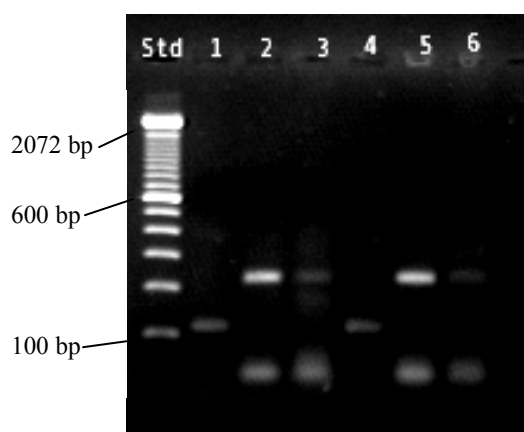
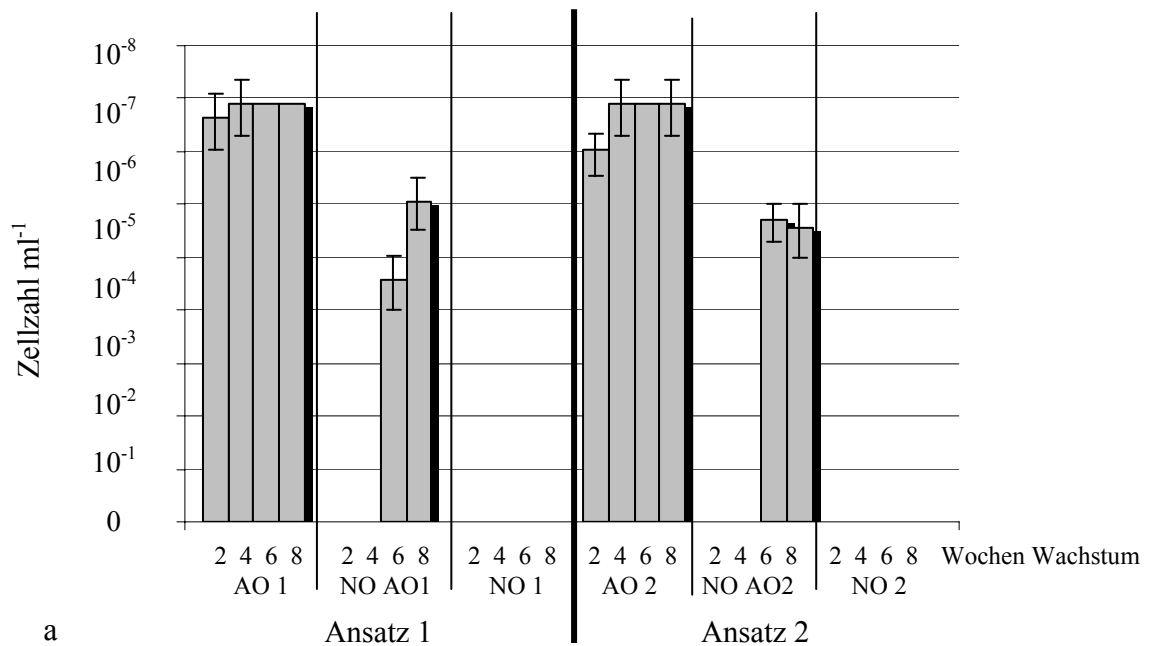
b

**Abb. 3.24 a: Validierung MPN-Ansatz mit *N. winogradskyi*;** die Ausgangskonzentration von  $0,7 - 1,3 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden in beiden Ansätzen mit  $6,08 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  deutlich übertroffen; Ammoniak-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf die Anwesenheit von *N. winogradskyi* getestet; NO: Kulturröhrchen für *N. winogradskyi*; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes;** im Agarose-Gel sind in Spur 3 und 6 - *N. winogradskyi* aus den einzelnen MPN-Ansätzen - deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte Abschnittes des 16S rRNA-Gens von *N. winogradskyi* zu erkennen; Ammoniak-Oxidierer konnten nicht nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO 1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Das Ergebnis der MPN-Ansätze wurde durch die PCR-Kontrolle bestätigt. Das Agarose-Gel der PCR-Kontrolle zeigt in Spur 3 und 6 das 236 bp lange Amplifikat des 16S rRNA-Gens der Nitrit-Oxidierern aus der Gattung *Nitrobacter*. Ein Nachweis der Ammoniak-Oxidierer konnte

trotz der spezifischen Oligodesoxynukleotide über die PCR-Kontrolle nicht in den Ansätzen erbracht werden. Zuletzt wurde eine Kontrolle der MPN-Technik in Verbindung mit der PCR-Kontrolle anhand der Nitrifizierermischkultur aus der organischen Auflage des Höglwaldes durchgeführt. Diese MPN-Doppelansätze wurden aus einer Kultur mit  $1,6 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  angeimpft, wobei nicht zwischen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierern unterschieden wurde. Aus Abbildung 3.25 a und b kann man zunächst die Ergebnisse der MPN-Auswertung aus der Graphik entnehmen, während sich darunter die Ergebnisse aus der PCR-Kontrolle anschließen.



b

**Abb. 3.25 a: Validierung MPN-Ansatz Nitrifizierer Höglwald;** die Ausgangskonzentration von  $1,6 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden in beiden Ansätzen mit  $7,68 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  bei den Ammoniak-Oxidierern fast erreicht, Nitrit-Oxidierer wurden mit  $1,10 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes;** im Agarose-Gel sind in Spur 1 und 4 - Ammoniak-Oxidierer aus den einzelnen MPN-Ansätzen - deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte Abschnittes des 16S rRNA-Gens der Ammoniak-Oxidierer zu erkennen; Nitrit-Oxidierer konnten in Spur 2 und 5 sowie in den Spuren 3 und 6 durch ein schwaches Signal nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Die Ammoniak-Oxidierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes konnten in den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer in den MPN-Ansätzen 1 und 2 nachgewiesen werden. Dort erreichten sie sowohl in Ansatz 1 (AO 1) als auch 2 (AO 2) Zellzahlen von mehr als  $7,68 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Die Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2), die mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftet waren, konnten erst in der 6. Woche der Kultivierung nachgewiesen werden und erreichten Zellzahlen um  $1,10 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 1 (NO AO1) bzw. um  $5,28 \times 10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 2 (NO AO2). Im Medium für die Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) konnten hingegen in beiden Ansätzen keine Nitrit-Oxidierer nachgewiesen werden. Im Bild des Agarose-Gels kann man in Spur 1 und 4 das 116 bp lange PCR-Amplifikat des 16S rRNA-Gens der Ammoniak-Oxidierer erkennen. In Spur 2 und 5 ist das 236 bp lange PCR-Amplifikat der Nitrit-Oxidierer aus der Gattung *Nitrobacter* zu sehen, die zusammen mit den Ammoniak-Oxidierern inkubiert wurden. In Spur 3 und 6 sind als schwache DNA-Banden die PCR-Amplifikate der Nitrit-Oxidierer zu erkennen, die ohne Ammoniak-Oxidierer inkubiert wurden. Im Gegensatz zur MPN-Auswertung, bei der nach der Inkubation der Nitrit-Oxidierer allein in den Ansätzen 1 und 2 (NO 1 und NO 2) kein Nitrat und damit keine Nitrit-Oxidierer nachzuweisen waren, konnten über die PCR-Kontrolle die Nitrit-Oxidierer direkt nachgewiesen werden.

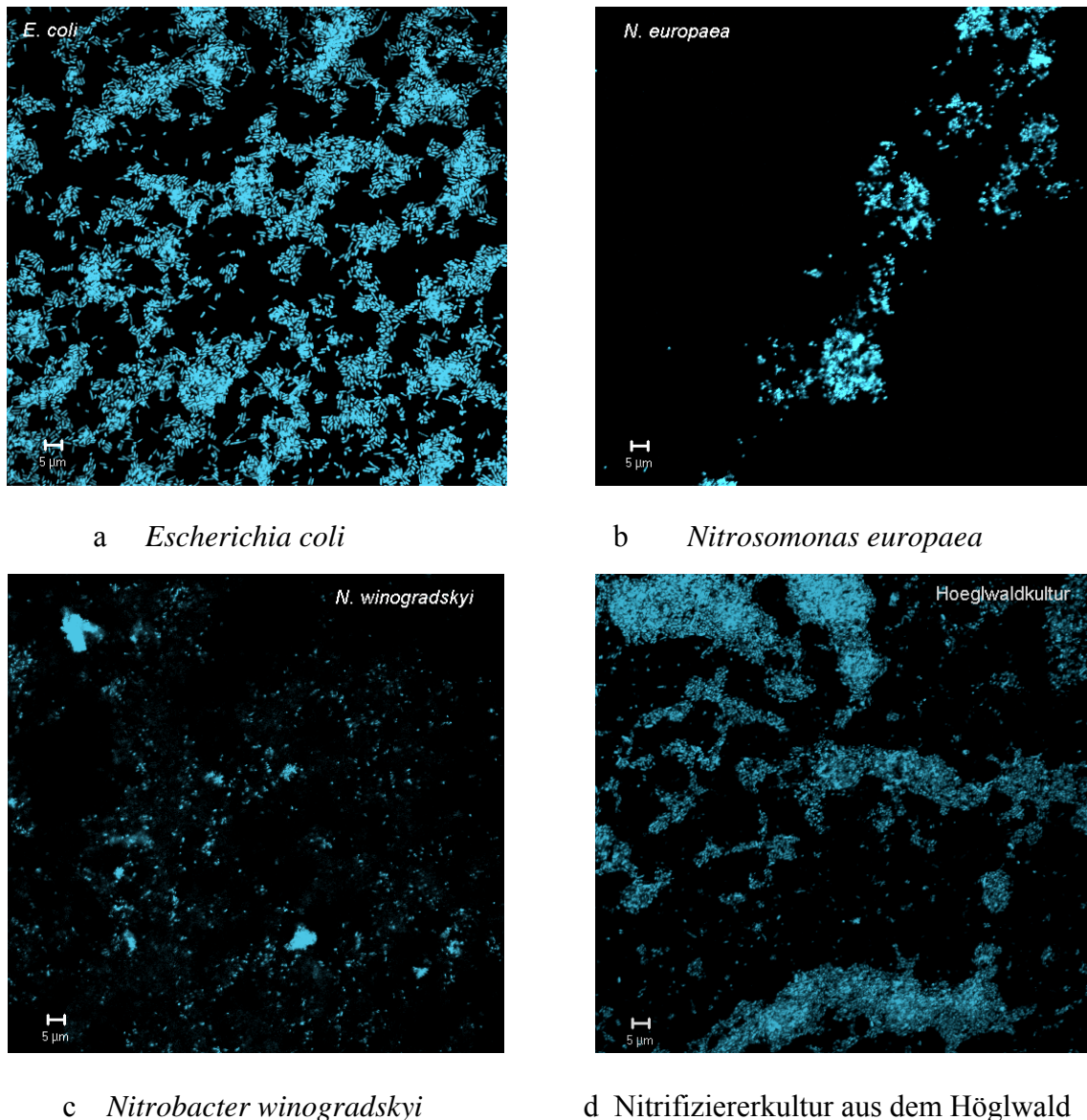
Als Endergebnis der MPN-Validierung mit der Kontrolle über die PCR-Technik konnte festgehalten werden, daß die Inkubation der MPN-Ansätze keine Schwierigkeiten bereitete und die eingesetzten Bakterienkonzentrationen die Ausgangskonzentration erreichten. In der sich anschließenden PCR-Kontrolle konnten die Bakterienzellen direkt nachgewiesen werden, die in die MPN-Ansätze eingesetzt wurden. Die Nachweise verliefen spezifisch für jede Bakteriengruppe. Die Nitrifizierermischkultur aus der organischen Auflage des Höglwaldes konnte problemlos untersucht werden.

#### **3.2.1.5. Validierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

Die Kontrolle der für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Sonden (s. Tab. 2.6) wurde zunächst an den Bakterienreinkulturen durchgeführt. Nach dem Test der DAPI-Gegenfärbung wurden die Bakterienkulturen einer entsprechenden *in situ*-Hybridisierung unterzogen. Die Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338, die spezifisch für alle *Eubacteria* ist, wurde mit und ohne RNase-Vorbehandlung getestet, um sicherzugehen, das die Oligodesoxynukleotid-Sonden tatsächlich an die in den Bakterien vorhandenen 16S rRNA-Moleküle der Ribosomen binden. Im Anschluß daran erfolgte die Überprüfung der Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonden für die autotrophen Nitrifizierer anhand der Bakterienreinkulturen an selbst gemischten Bakteriensuspensionen und über die Nitrifizierermischkultur aus der organischen Auflage des Höglwaldes. Zuletzt erfolgte die Durchführung einer Mehrfachhybridisierung mit diesen spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden. Zu Beginn wurde die Gegenfärbung mit



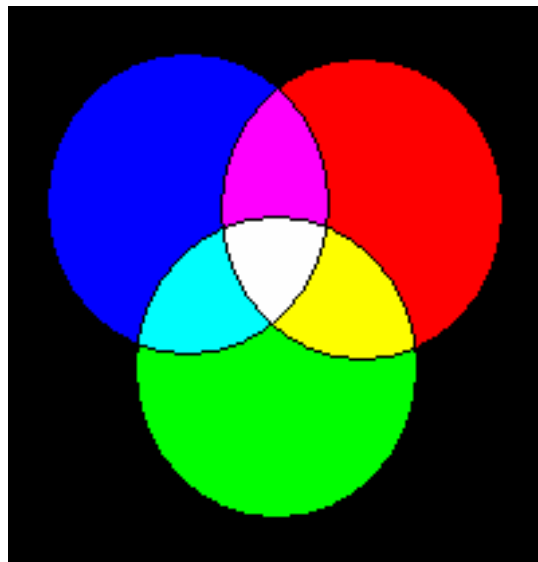
DAPI getestet, um sichergehen zu können, daß die Bakterien mit einer einfachen und schnellen Färbemethode nachzuweisen waren. Neben der Detektion von Bakterien im Nadelblattgewebe diente die DAPI-Gegenfärbung gleichzeitig im Vergleich zu den mit den spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden und der daran gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen (s. Tab. 2.7) markierten Nitrifiziererzellen dazu, Bakterien und andere Mikroorganismen im Unterschied zu den autotrophen Nitrifizierern zu markieren und zu detektieren. Abbildung 3.26 zeigt die mit DAPI erfolgreich angefärbten Zellen der verschiedenen Bakterienarten.



**Abb. 3.26: Mit DAPI angefärbte Bakterienkulturen;** alle Bakterien konnten mit DAPI angefärbt werden; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlänge des Lasers: 364 nm; Maßstab: 5 µm

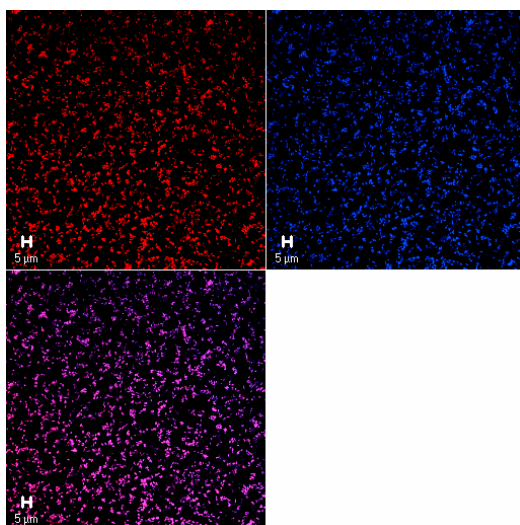
Alle Bakterien konnten mit DAPI entsprechend angefärbt werden. Als zweite Versuchsreihe erfolgte die Hybridisierung der Bakterienkulturen mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 für alle *Eubacteria*. Zugleich wurden die Bakterien mit DAPI gegengefärbt, um die Effizienz der

Hybridisierung zu testen. Bei einer erfolgreichen Hybridisierung sollten die Signale der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 mit den Signalen der DAPI-Gegenfärbung in den Abbildungen übereinstimmen. Daneben sollte sich aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Fluoreszenzlichtes eine additive Mischfarbe aus den Farben der Oligodesoxynukleotid-Sonde und der DAPI-Färbung ergeben. Die additive Farbmischung erfolgt nach dem in Abbildung 3.27 vorgegebenen Schema (SCHLEIFER & WAGNER, 1998).

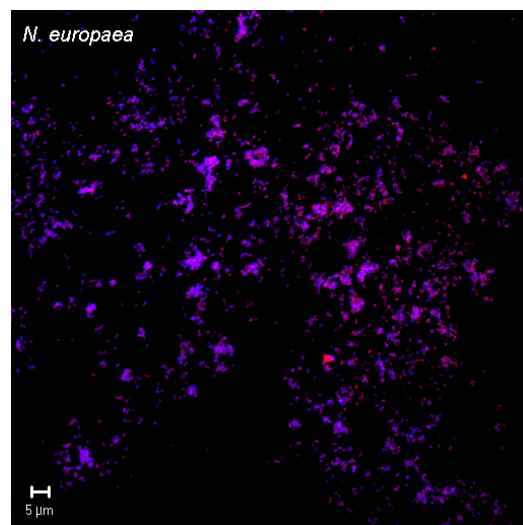


**Abb. 3.27: Farbkombinationen der additiven Farbgebung**

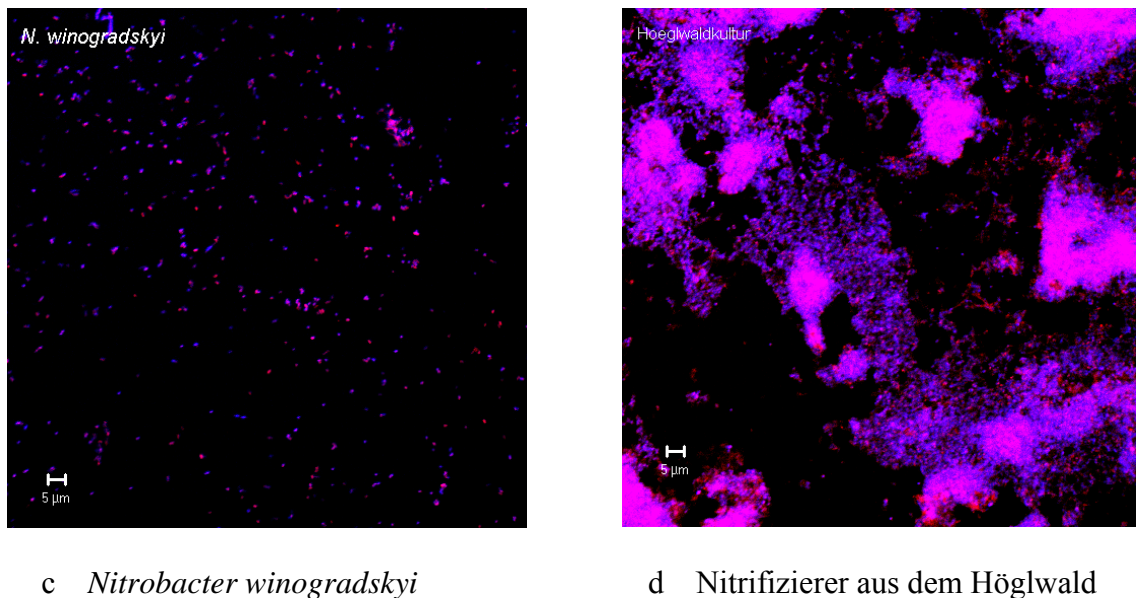
Bei der Farbauswahl Blau für das DAPI-Signal und Rot für das Signal der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 sollte sich nach Abbildung 3.27 als Farbkombination die Mischfarbe Magenta als Farbsignal ergeben. In Abbildung 3.28 a bis d sind die Hybridisierungen der Bakterien mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 und der Gegenfärbung mit DAPI zu sehen.



a *Escherichia coli*



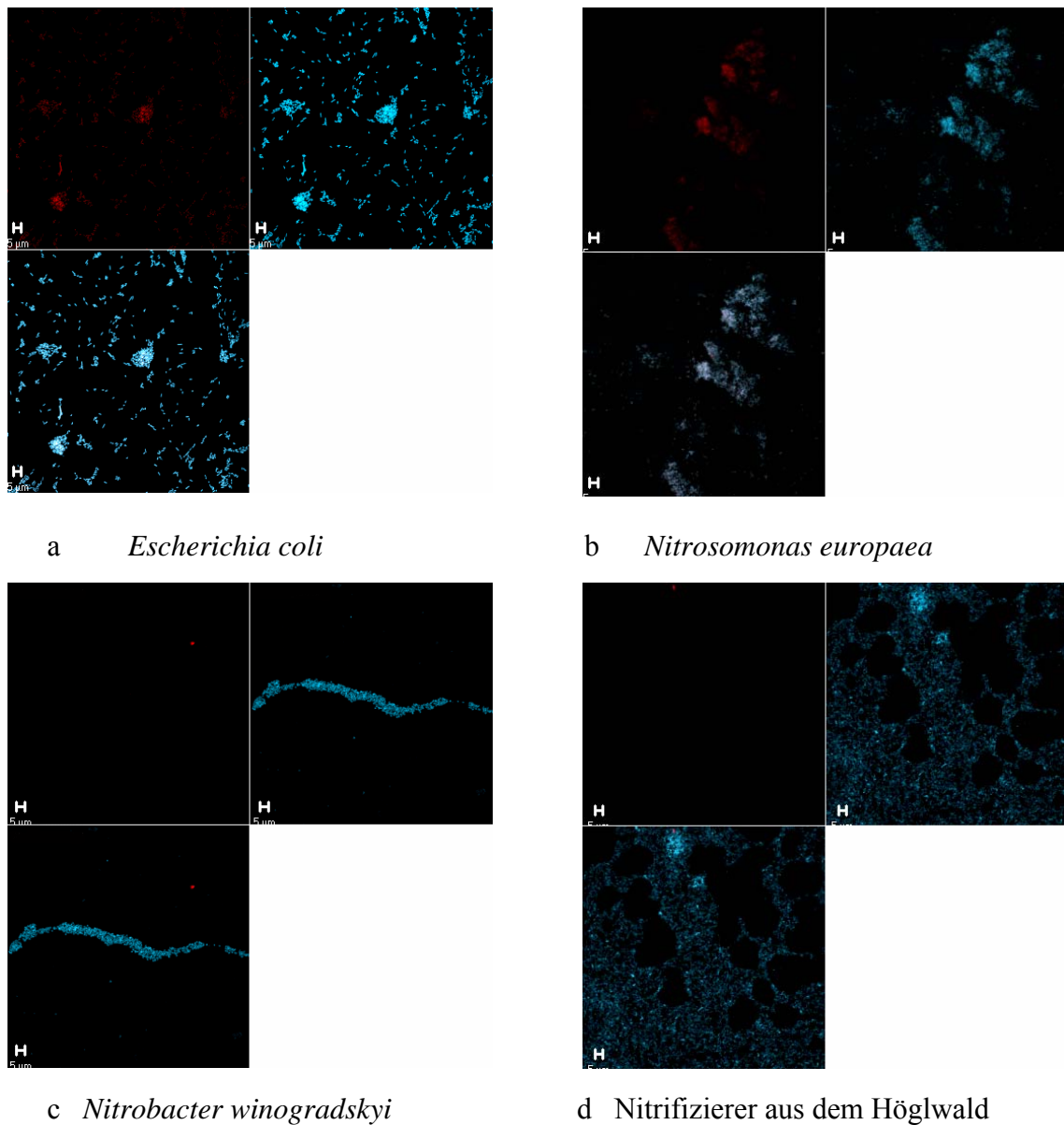
b *Nitrosomonas europaea*

c *Nitrobacter winogradskyi*

d Nitrifizierer aus dem Höglwald

**Abb.: 3.28: Hybridisierung mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 (rot);** Gegenfärbung mit DAPI (blau); alle Bakterien konnten sowohl mit der Sonde EUB338 als auch mit DAPI angefärbt werden; durch die additive Farbmischung erscheinen die Bakterien rosa; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 543 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

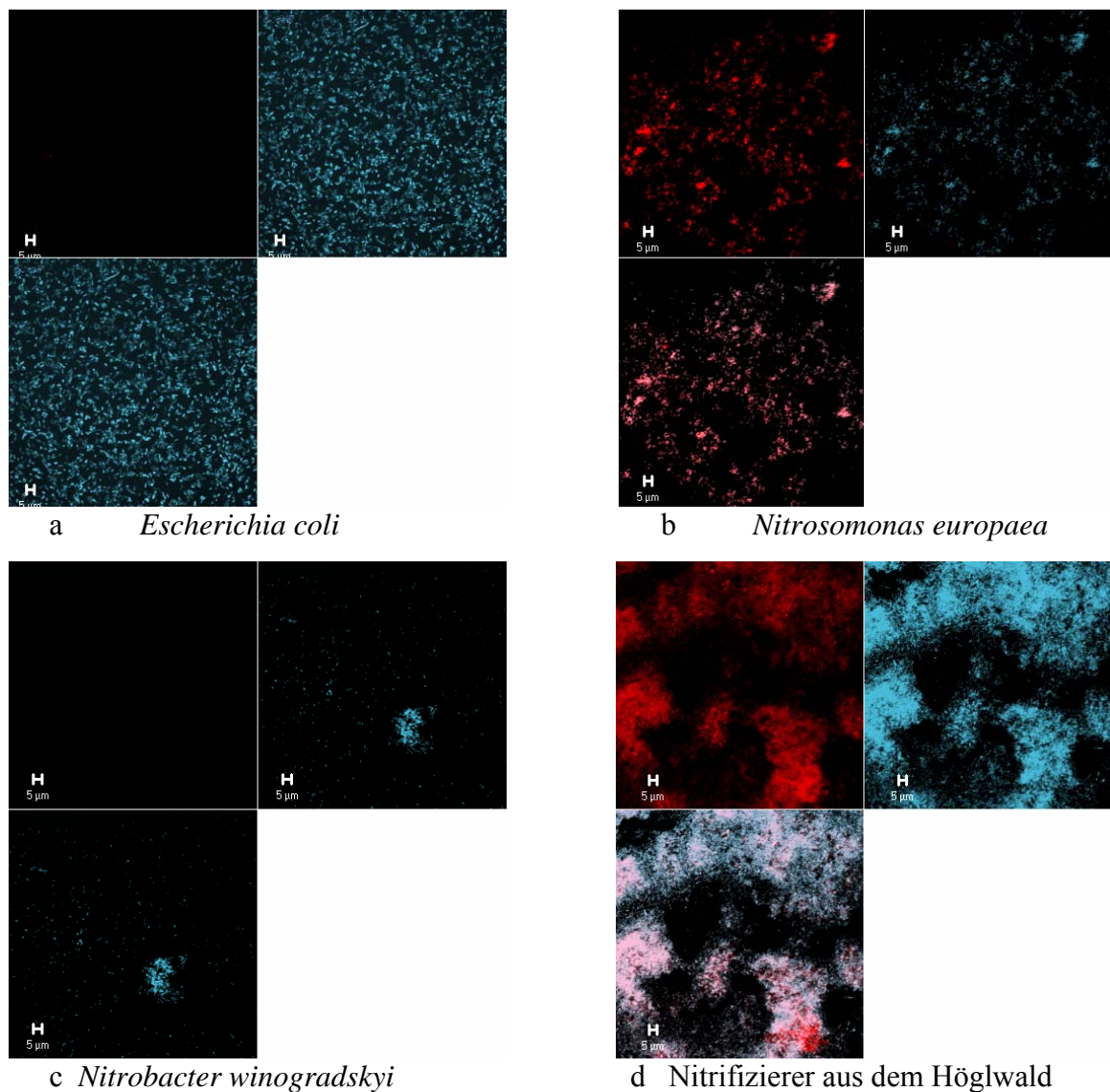
Nach der Kanalauftrennung zur Sichtbarmachung der einzelnen Lasersignale im Bild von *E. coli* (s. Abb. 3.28 a) konnte man klar erkennen, daß die Bakterien zum einen das blaue Signal der Gegenfärbung mit DAPI aufwiesen, zum anderen das rote Lichtsignal der mit Rhodaminrot markierten Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338. Die Kombination des blauen und roten Signals ergab die Mischfarbe Magenta. Daß die Hybridisierung auch bei den anderen Bakterien erfolgreich abgelaufen war, war an der sichtbaren Mischfarbe Magenta (s. Abb. 3.28 b – d) zu erkennen. Um nachweisen zu können, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden auch tatsächlich an das 16S rRNA-Molekül der Ribosomen in den Bakterienzellen gebunden hatten, wurde in der dritten Testreihe vor der Hybridisierung ein enzymatischer Abbau des 16S rRNA-Moleküls durch den Einsatz einer Ribonuklease (RNase) durchgeführt. Da das 16S rRNA-Molekül in den Bakterienzellen zerstört war, sollte sich die Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 nicht mehr in den Bakterienzellen detektieren lassen, d.h. es sollten keine roten Signale mehr zu finden sein. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.29 zu sehen. Der Abbau des 16S rRNA-Moleküls in den Bakterien hatte zu dem erwarteten Ergebnis geführt. Bei den Bakterien waren die roten Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde EUB338 nicht mehr oder nur noch schwach zu erkennen. Die blauen Signale der DAPI-Gegenfärbung waren als einziges Signal deutlich in allen Bakterien zu erkennen. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus der Abbildung 3.28 mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.29 konnte man den Unterschied zwischen der erfolgreichen Hybridisierung aus Abbild 3.28 und dem Abbau der 16S rRNA-Moleküle und die nicht mehr erfolgten Hybridisierung in Abbildung 3.29 erkennen.



**Abb. 3.29: Hybridisierung der Bakterien mit EUB338 nach einer RNase-Vorbehandlung;** alle Bakterien konnten mit DAPI angefärbt werden; eine Anfärbung durch die Sonde EUB338 mit Rhodaminrot ist hingegen nicht oder nur sehr schwach zu erkennen; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 543 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

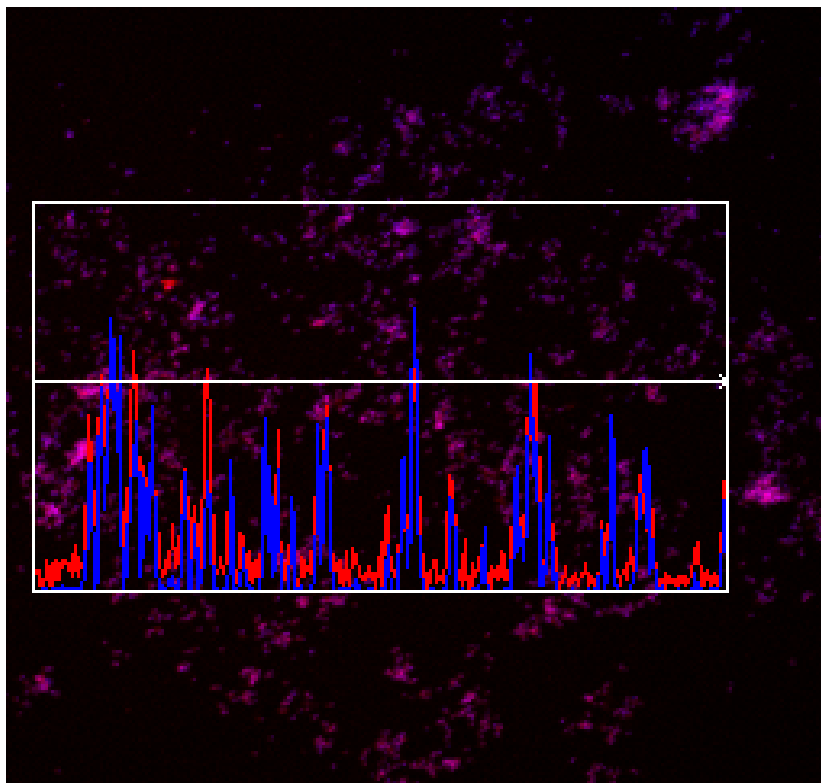
Nachdem die Validierungen ergeben hatten, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden an die 16S rRNA-Moleküle banden, wurden die für die autotrophen Nitrifizierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden auf ihre Spezifität getestet. Zunächst wurde die für die Ammoniak-Oxidierer spezifische Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 mit dem Fluoreszenzfarbstoff ROX überprüft. Wie man aus Abbildung 3.30 entnehmen kann, hatte die Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 bei der *E. coli*-Kultur nicht an das 16S rRNA-Molekül in den Ribosomen gebunden. Das Bild von *E. coli* (s. Abb. 3.30 a) zeigt nur die blauen Signale der DAPI-Gegenfärbung. Auch bei dem Nitrit-Oxidierer *N. winogradskyi* (s. Abb. 3.30 c) hatte die Sonde Nso190 nicht an das 16S rRNA-Molekül gebunden.



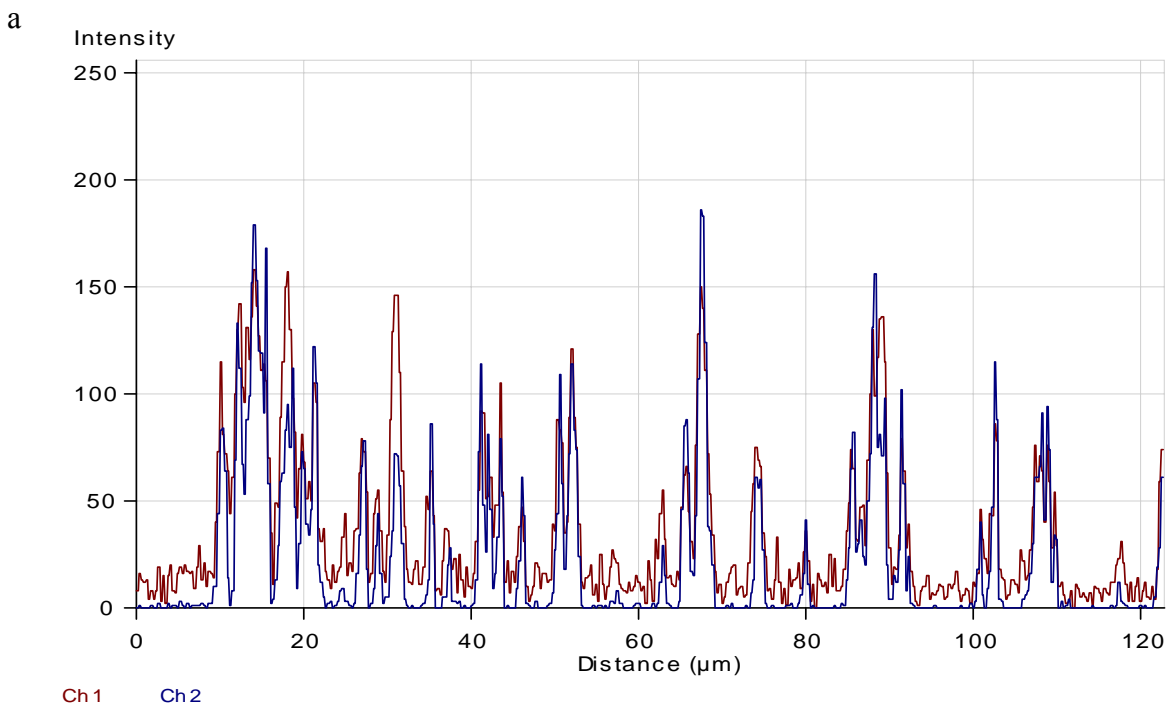


**Abb. 3.30: Hybridisierung Ammoniak-Oxidierer mit Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190;** alle Bakterien konnten mit DAPI (blau) angefärbt werden; mit der für Ammoniak-Oxidierer spezifischen Sonde Nso190 konnten hingegen nur *N. europaea* und die Ammoniak-Oxidierer der Höglwaldkultur rot markiert werden; durch die additive Farbmischung erscheinen die Ammoniak-Oxidierer rosa; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen: 543 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

Bei *N. europaea* (s. Abb. 3.30 b) hatte hingegen die Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 ein deutliches rotes Signal neben dem blauen Signal der DAPI-Gegenfärbung im Bild hinterlassen. Damit konnte gezeigt werden, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 eindeutig spezifisch für die Ammoniak-Oxidierer war. Zusätzlich konnten die Ammoniak-Oxidierer in der Nitrifizierermischkultur aus der organischen Auflage des Höglwaldes (s. Abb. 3.30 d) mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 detektiert werden. Daß es sich dabei um Ammoniak-Oxidierer handelte, konnte nicht nur über die PCR-Technik nachgewiesen werden, sondern zusätzlich auch über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Um die Effizienz der Hybridisierung und die Qualität zu kontrollieren, wurde das Profil und die Intensitäten der Fluoreszenzsignale aufgenommen. Die Profil-Darstellung und die dazugehörigen Intensitätskurven sind in Abbildung 3.31 zu sehen.



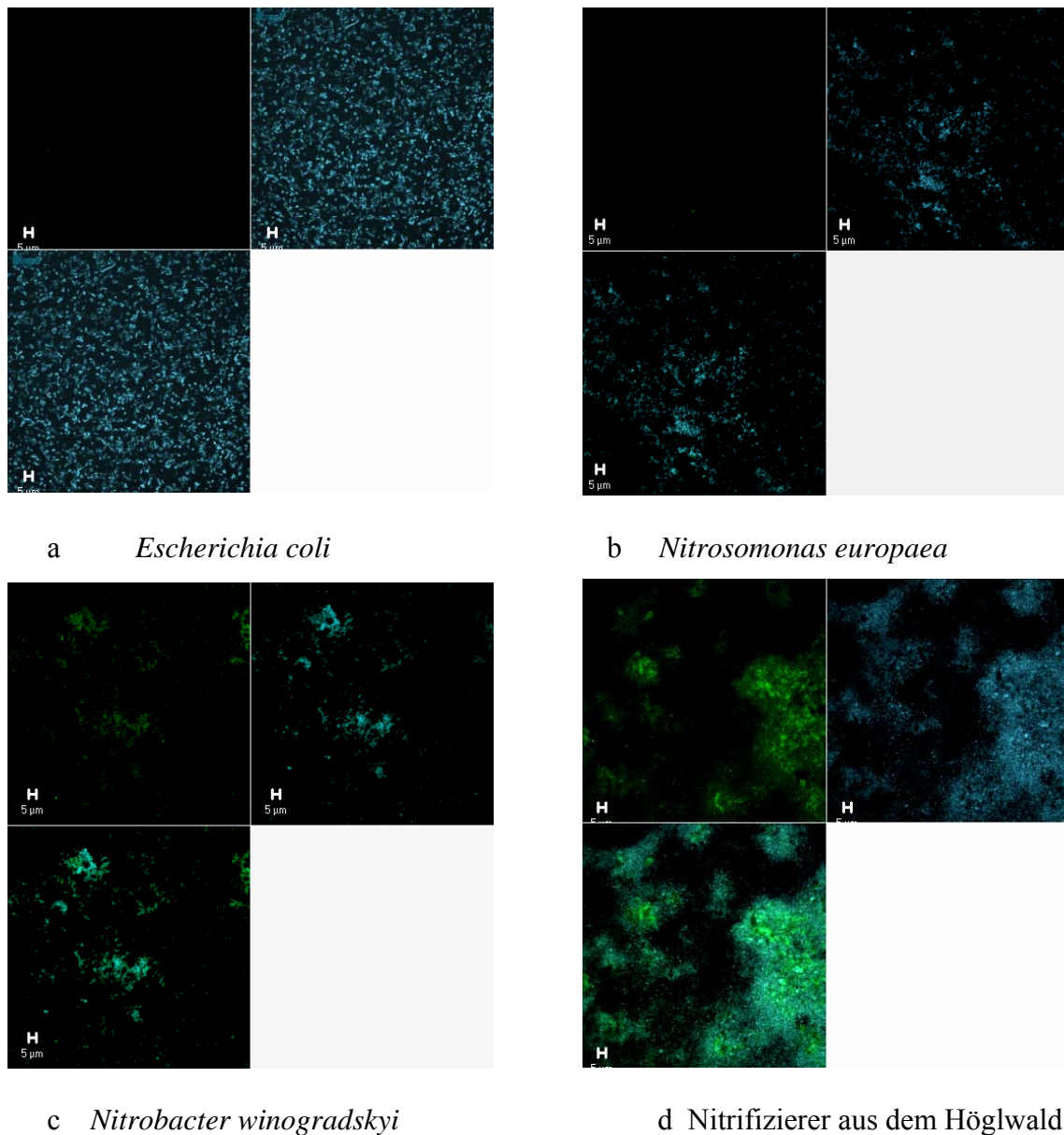
Profile



b

**Abb. 3.31: Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale bei *N. europaea***; a: Lage des Schnittes für den Nachweis im Präparat; b: zur genaueren Auswertung ist darunter die Graphik der Intensitätskurven aufgezeichnet; die deckungsgleiche Überlagerung der blauen DAPI und der roten Sonden-Signale zeigt deutlich, daß die Hybridisierung in den Bakterienzellen erfolgte; die Intensitätshöhen geben an, welcher der Fluoreszenzfarbstoffe in der Bakterienzelle am stärksten gebunden hat

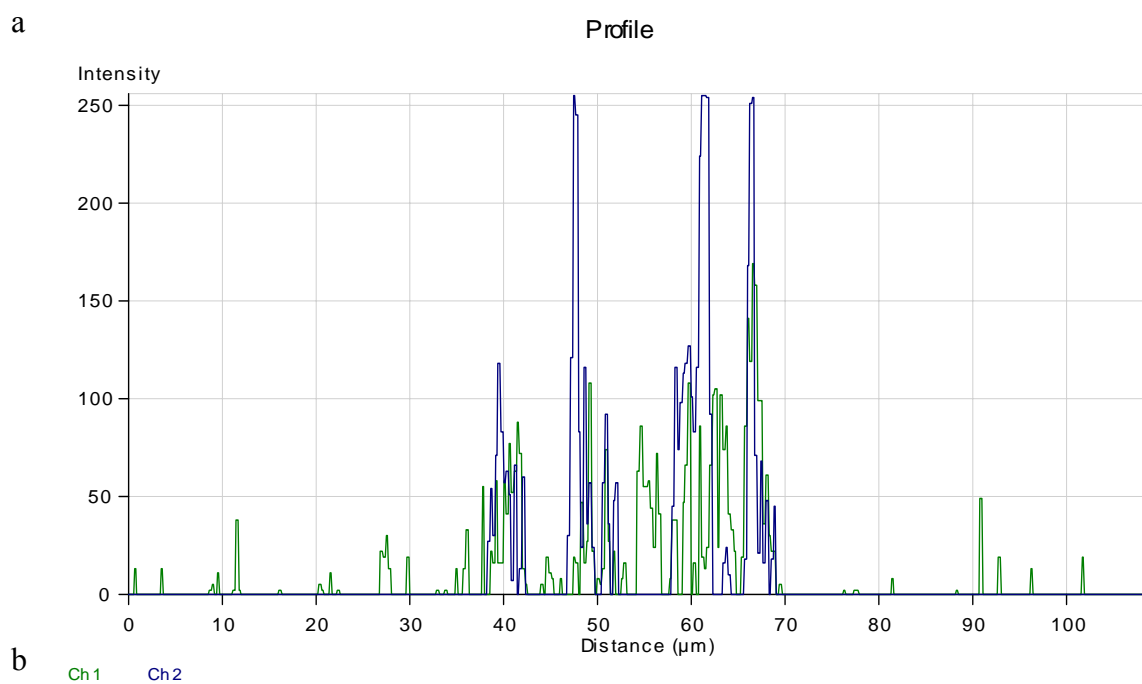
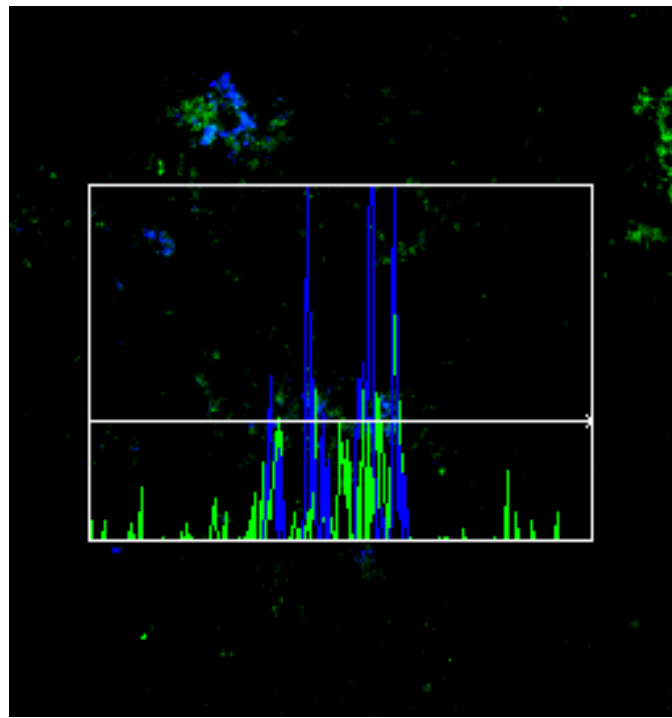
Für eine gelungene Hybridisierung sollte der Verlauf der Intensitätskurven der Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 und der DAPI-Gegenfärbung deckungsgleich sein. Damit war bewiesen, daß die Signale sich am selben Ort im Bild und damit auch im Präparat, hier in der Bakterienzelle, befanden. Die Höhe der Intensitäten gab Aufschluß darüber, welcher Fluoreszenzfarbstoff in der Bakterienzelle am stärksten gebunden hatte. Eine hohe Intensität der mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff ROX markierten Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 bedeutete, daß in der Bakterienzelle zahlreiche Ribosomen vorhanden waren, an welche die Oligodesoxynukleotid-Sonden gebunden wurden. Überwog das blaue Signal der DAPI-Gegenfärbung, bedeutete dies, daß wenig Ribosomen in der Bakterienzelle vorhanden waren. War nur das blaue Intensitätssignal der Gegenfärbung zu sehen, hatte DAPI an die DNA eines Mikroorganismus gebunden, nicht jedoch die spezifische Sonde Nso190. Damit wurden Mikroorganismen nachgewiesen, die nicht zu den Ammoniak-Oxidierern gerechnet werden konnten. Die deckungsgleiche Überlagerung in Abbildung 3.31 der blauen und roten Fluoreszenzsignale im Präparat zeigte, daß die Hybridisierung erfolgreich verlaufen war. Nach dem Spezifitätstest der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer wurde nun die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC auf ihre Spezifität überprüft. Dabei wurde dieselbe Testreihe durchgeführt, wie mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190. Zunächst erfolgte die Hybridisierung der verschiedenen Bakterienkulturen mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3. Im Anschluß wurde ebenfalls eine Auswertung der Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale vorgenommen. In Abbildung 3.32 ist das Ergebnis der Hybridisierung zu sehen. Erwartungsgemäß hatte in dieser Versuchsreihe die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 nicht an die Ribosomen der *E. coli*-Zellen und der *N. europaea*-Zellen (s. Abb. 3.32 a und b) gebunden. Die Bilder dieser Bakterien zeigen nur das blaue DAPI-Signal der Gegenfärbung, nicht jedoch das grüne Signal der Oligodesoxynukleotid-Sonde. Dieses Signal ist deutlich bei der Hybridisierung mit den *N. winogradskyi*-Zellen (s. Abb. 3.32 c) zu sehen. Auch in diesem Fall wurde damit die Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonde bestätigt. Die Hybridisierung der Nitrit-Oxidierer aus der anorganischen Auflage des Höglwaldes (s. Abb. 3.32 d) zeigt ebenfalls deutlich grüne Fluoreszenzsignale, was darauf schließen läßt, daß es sich bei diesen Nitrifizierern um Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* handeln muß. Durch die additive Farbmischung ergibt sich aus der Übereinanderlagerung der Fluoreszenzsignale die Mischfarbe blaugrün.



**Abb. 3.32: Hybridisierung Nitrit-Oxidierer mit Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3;** alle Bakterien konnten mit DAPI (blau) angefärbt werden; mit der für Nitrit-Oxidierer spezifischen Sonde NIT 3 konnten hingegen nur die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* markiert werden; durch die additive Farbmischung erscheinen diese Zellen blaugrün; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen: 488 nm, 364 nm; Maßstab: 5  $\mu$ m

Nach der Hybridisierung wurde auch in diesem Fall die Effizienz und Qualität über die Aufnahme eines Profils und der Intensitäten der Fluoreszenzsignale kontrolliert. Das Ergebnis dieser Kontrolle ist der Abbildung 3.33 zu entnehmen. Für eine gelungene Hybridisierung gelten die bei der Kontrolle der Hybridisierung der Ammoniak-Oxidierer aufgeführten Punkte entsprechend. Die erfolgreich verlaufene Hybridisierung entsprach durch die deckungsgleiche Überlagerung der blauen Intensitätskurve der DAPI-Gegenfärbung mit der grünen Intensitätskurve der spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 dem erwarteten Ergebnis.

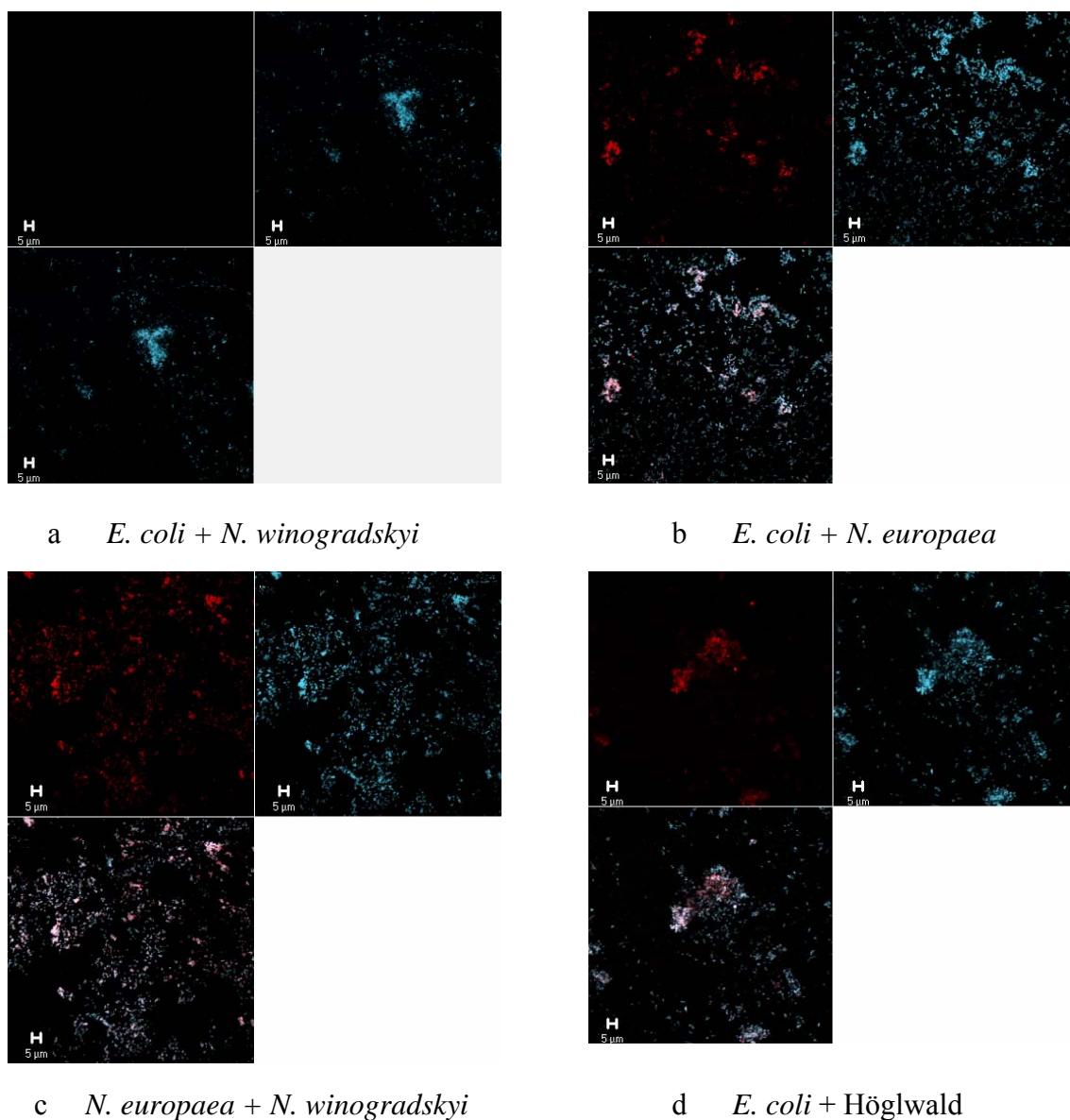




**Abb. 3.33: Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale bei *N. winogradskyi*;** a: Lage des Schnittes für den Nachweis im Präparat; b: zur genaueren Auswertung ist darunter die Graphik der Intensitätskurven aufgezeichnet; die deckungsgleich Überlagerung der blauen DAPI und der grünen Sonden-Signale zeigt deutlich, daß die Hybridisierung erfolgreich abgelaufen ist; die Intensitätshöhen geben an, welcher der Fluoreszenzfarbstoffe in der Bakterienzelle am stärksten gebunden hat

Die Tatsache, daß die grünen Fluoreszenzsignale in der Intensitätshöhe unter den Signalen der blauen DAPI-Signale lagen, ließ darauf schließen, daß die Zellen von *Nitrobacter* wenig Ribosomen besaßen, an die die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 binden konnte. Neben der Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* wurde auch

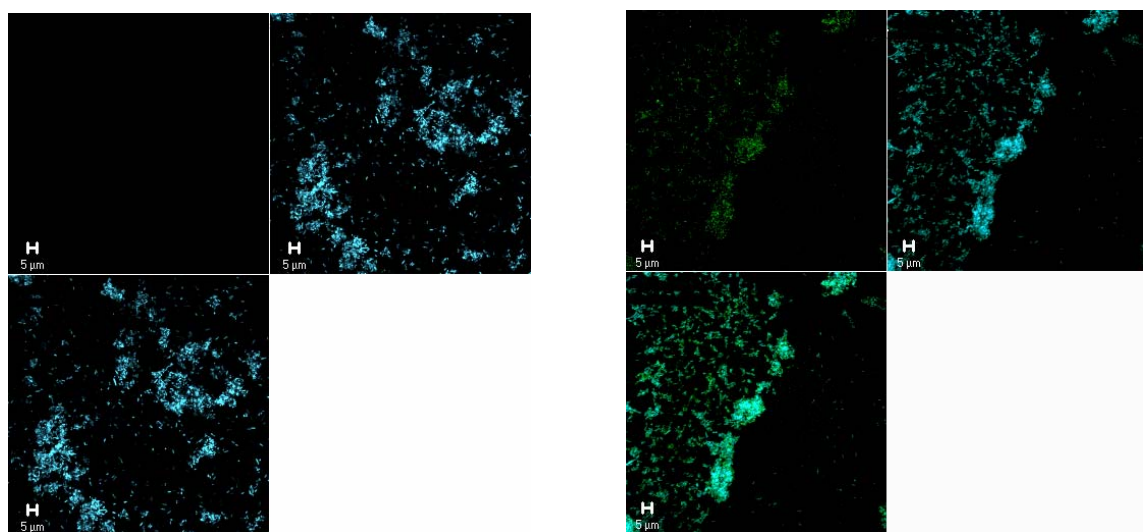
das qualitativ gute Ergebnis der Hybridisierung nachgewiesen. Als weiterer Spezifitätstest wurde die Hybridisierung von Bakteriengemischen, die künstlich aus Reinkulturen hergestellt wurden, durchgeführt. Zunächst wurde wiederum die Wirkungsweise der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer geprüft. Zu diesem Zweck wurden *N. europaea*-Zellen mit *E. coli*- und mit *N. winogradskyi*-Zellen, sowie *E. coli*-Zellen mit *N. winogradskyi*-Zellen und den Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes gemischt. Diese Bakteriengemische wurden einer entsprechenden Hybridisierung unterzogen, wobei nur die Bakteriengemische rote Fluoreszenzsignale aufweisen durften, die Ammoniak-Oxidierer enthielten, nämlich die Gemische *N. europaea* mit *E. coli*, *N. europaea* mit *N. winogradskyi* und *E. coli* mit den Nitrifizierern aus dem Höglwald. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.34 dargestellt.



**Abb. 3.34: Hybridisierung mit Bakteriengemischen für Ammoniak-Oxidierer;** alle Bakterien konnten mit DAPI (blau) angefärbt werden; mit der für Ammoniak-Oxidierer spezifischen Sonde Nso190 konnten hingegen nur die Bakteriengemische *E. coli* mit *N. europaea*, *N. europaea* mit *N. winogradskyi* und *E. coli* mit den Nitrifizierern aus

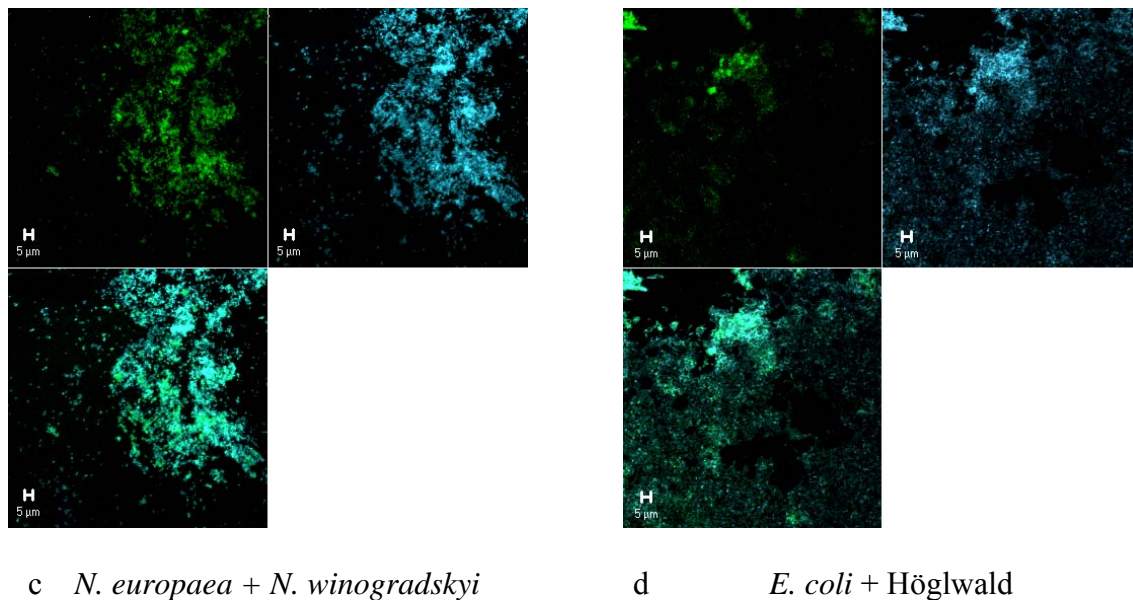
dem Höglwald markiert werden (rot); durch die additive Farbmischung erscheinen die Bakterien rosa; Objektiv: C-Apochromat 63 x, Anregungswellenlängen: 543 nm, 364 nm; Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

Wie aus Abbildung 3.34 zu entnehmen ist, sind in den Bakteriengemischen *E. coli* mit *N. europaea* (s. Abb. 3.34 b), *N. europaea* mit *N. winogradskyi* (s. Abb. 3.34 c) und *E. coli* mit den Nitrifizierern aus dem Höglwald (s. Abb. 3.34 d) die rote Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 zu erkennen. Daneben sind die blauen Fluoreszenzsignale der DAPI-Gegenfärbung zu sehen. Wenn man die durch die Kanalauftrennung für die einzelnen Laser aufgetrennten Bilder näher begutachtet, kann man in den Teilbildern der oberen Reihe (Abb. 3.34 a und b) deutlich erkennen, daß es blaue Fluoreszenzsignale gibt, die nicht deckungsgleich mit den roten Fluoreszenzsignalen der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 im Teilbild daneben sind. Auch bei der Betrachtung des kombinierten Gesamtbildes links unten in den einzelnen Bildern kann man neben den Magenta-farbenen Kombinationssignalen eindeutig blaue Fluoreszenzsignale erkennen. Diese blauen Fluoreszenzsignale kennzeichnen die Bakterien, die nicht zu den Ammoniak-Oxidierern gehören, also *E. coli* oder *N. winogradskyi*. Damit konnten auch in Bakteriengemischen die Ammoniak-Oxidierer mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 spezifisch detektiert werden. Das Bakteriengemisch *E. coli* und *N. winogradskyi* (s. Abb. 3.34 a) zeigt erwartungsgemäß keine roten Fluoreszenzsignale, da es keine Ammoniak-Oxidierer enthält. Im Anschluß folgte derselbe Versuchsansatz zur Überprüfung der Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*. In diesem Ansatz durften nur die Bakteriengemische mit den *Nitrobacter winogradskyi*-Zellen grüne Fluoreszenzsignale aufweisen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 dargestellt.



a *E. coli* + *N. europaea*

b *E. coli* + *N. winogradskyi*

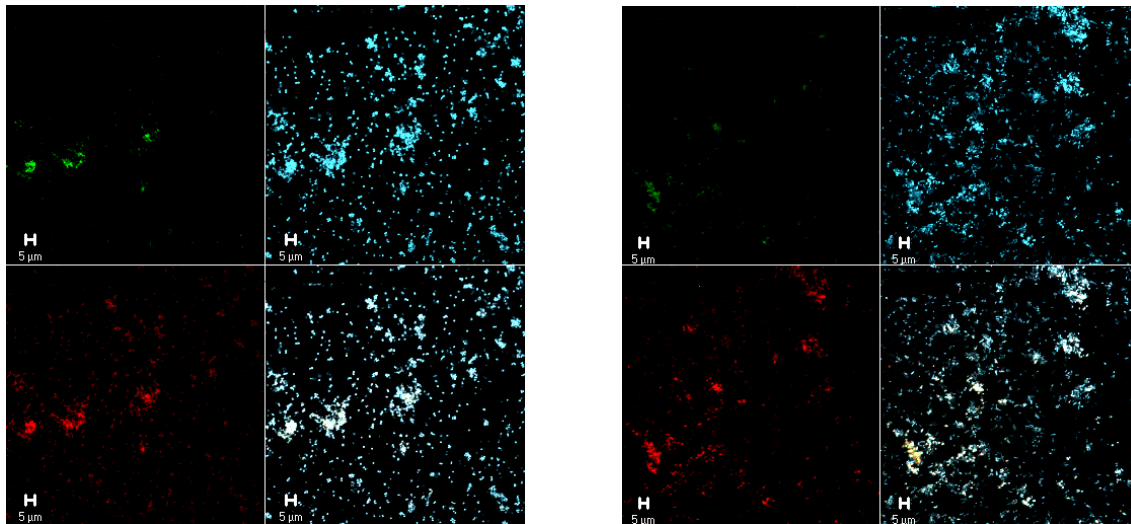
c *N. europaea* + *N. winogradskyi*d *E. coli* + Höglwald

**Abb. 3.35: Hybridisierung mit Bakteriengemischen für Nitrit-Oxidierer;** alle Bakterien konnten mit DAPI (blau) angefärbt werden; mit der für Nitrit-Oxidierer spezifischen Sonde NIT3 konnten die Bakteriengemische *E. coli* mit *N. winogradskyi*, *N. europaea* mit *N. winogradskyi* und *E. coli* mit den Nitrifizierern aus dem Höglwald markiert werden (grün); durch die additive Farbmischung erscheinen die Bakterien blaugrün; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen: 488 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

Erwartungsgemäß sind in den Bakteriengemischen *E. coli* mit *N. winogradskyi*, *N. europaea* mit *N. winogradskyi* und *E. coli* mit den Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes (s. Abb. 3.35 b – c) die grünen Fluoreszenzsignale der spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 zu finden. Auch bei dieser Testreihe wurden alle Bakterienzellen mit DAPI angefärbt, während nur die *Nitrobacter*-Zellen das grüne Fluoreszenzsignal zeigen. Dies ist in einem Vergleich der durch die Kanalauftrennung für die einzelnen Laser aufgeteilten Bilder deutlich zu erkennen. Auch in den Gesamtbildern links unten kann man Zellen erkennen, die nur die Blau-Fluoreszenz des DAPI aufweisen. Die Zellen, die zusätzlich mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 markiert sind, erscheinen in einem Blaugrün. Die Bakterienkombination *E. coli* mit *N. europaea* (s. Abb. 3.35 a) zeigt keine grünen Fluoreszenzsignale. Als Fazit konnte man daher festhalten, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 spezifisch an das 16S rRNA-Molekül in den Ribosomen der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* banden und diese durch den Fluoreszenzfarbstoff eindeutig aufgespürt werden konnten. Als abschließende Versuchsreihe wurden Bakteriengemische mit beiden spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden, sowohl für die Ammoniak-Oxidierer als auch für die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*, hybridisiert und mit DAPI gegengefärbt. Dieser Ansatz diente zur Kontrolle, ob ein Mehrfachnachweis (s. 2.9.5) mit den Oligodesoxynukleotiden durchführbar war. Als Bakteriengemische wurden die Kombinationen *E. coli* mit *N. europaea* und *N. winogradskyi*, *R. rhodochrous* mit *N. europaea* und *N. winogradskyi* und die autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes verwendet. Als Ergebnis sollten alle Mikroorganismen mit DAPI angefärbt sein. Zusätzlich sollten die

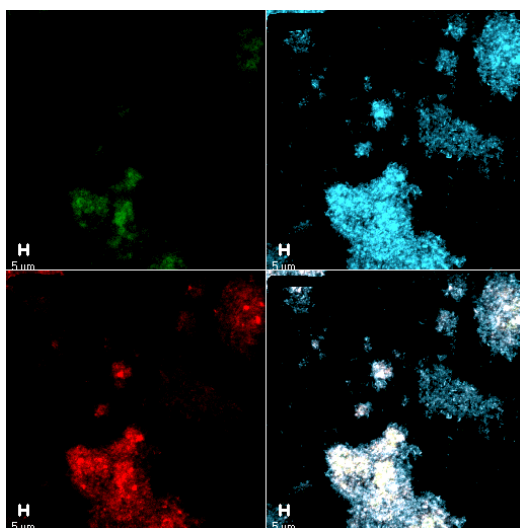


Ammoniak-Oxidierer ein rotes Fluoreszenzsignal und die *Nitrobacter*-Zellen ein grünes Fluoreszenzsignal aussenden. Der Mehrfachnachweis, bei dem die Hybridisierungen der einzelnen Oligodesoxynukleotid-Sonden nacheinander ausgeführt werden mußten, ist der Abbildung 3.36 zu entnehmen.



a *R. rhodochrous* mit *N. europaea* und  
*N. winogradskyi*

b *E.coli* mit *N. europaea* und  
*N. winogradskyi*



c Nitrifizierer aus dem Höglwald

**Abb. 3.36: Mehrfachhybridisierung von Bakteriengemischen;** alle Bakterien wurden mit DAPI angefärbt (blau), die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 markierten Nitrit-Oxidierer; die Ammoniak-Oxidierer sind durch die Rotfluoreszenz der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 gekennzeichnet; aufgrund der additiven Farbgebung erscheinen dichte Zellverbände weiß; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen: 543 nm, 488 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

Um eine genaue Aussage treffen zu können, ob die Hybridisierungen erfolgreich abgelaufen waren, wurden die jeweiligen Bilder in ihre einzelnen Kanäle aufgetrennt. Oben links sind die grünen Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 zu sehen, während oben rechts die Signale der blauen DAPI-Gegenfärbung zu erkennen sind, die alle Mikroorganismen im Präparat anfärben. Unten links sind die roten Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer abgebildet, während die Kombination aller Signale als Bild unten rechts dargestellt ist. Bei diesem Gesamtbild tritt die additive Farbkombination in

den Vordergrund, so daß bei größeren Zellverbänden aus den verschiedenen Bakterienzellen durch eine Überlagerung der Signale ein weißes Gesamtsignal zu sehen ist. Wie aus der Abbildung 3.36 zu entnehmen ist, waren nach den Hybridisierungen in allen Fällen die erwarteten Signale zu finden. Sehr deutlich konnte festgestellt werden, daß sich die einzelnen Signale in ihrem Auftreten im Objekt und in der Häufigkeit von einander unterscheiden. Die meisten Signale traten bei der unspezifischen DAPI-Gegenfärbung auf, die alle Mikroorganismen angefärbt hatte. Die grün markierten Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* waren in der Anzahl und der Intensität der Fluoreszenzsignale deutlich schwächer vertreten als die im Teilbild darunter dargestellten Ammoniak-Oxidierer in ihrer roten Fluoreszenz. Wenn man sowohl die roten als auch die grünen Fluoreszenzsignale zusammennahm und mit der blauen Gegenfärbung verglich, konnte man feststellen, daß die *E. coli*- bzw. *R. rhodochrous*-Zellen in den beiden oberen Bildern (s. Abb. 3.36 a und b) nur blau markiert waren. Durch diese Kombination konnte man bei den Nitrifizierern aus der organischen Auflage aus dem Höglwald klar erkennen, daß sowohl Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierer vorhanden waren. Die Ammoniak-Oxidierer waren den Hybridisierungssignalen nach deutlich den Nitrit-Oxidierern überlegen. Zusätzliche blaue Fluoreszenzsignale zeigten aber auch, daß in der Nitrifizierermischkultur auch andere, nicht näher bestimmte Mikroorganismen, zu finden waren. Diese Versuchsreihe zeigte die Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonden.

Die Versuchsreihen zur Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung haben klar gezeigt, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden sehr spezifisch an die jeweiligen ihnen zugeordneten Bakteriengruppen banden. Als Bindungsstelle wurden eindeutig die 16S rRNA-Moleküle der Ribosomen in den Bakterienzellen ermittelt. Durch die Gegenfärbung mit DAPI konnte außerdem bewiesen werden, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden in den Präparaten genau an der Stelle binden, an der die durch DAPI angefärbten DNA-Moleküle zu finden waren. Da in einer Bakterienzelle sowohl DNA als auch Ribosomen auf sehr engen Raum vorkommen, zeigte die Kombination beider Signale im selben Bereich des Präparates, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden auch tatsächlich Bakterienzellen markieren konnten. Desweiteren waren auch spezifische Mehrfachnachweise mit den Oligodesoxynukleotid-Sonden auf ein und demselben Präparat möglich. Zuletzt konnte nachgewiesen werden, daß die autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage des Höglwaldes neben der PCR-Technik auch mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungsmethode detektiert werden konnten.

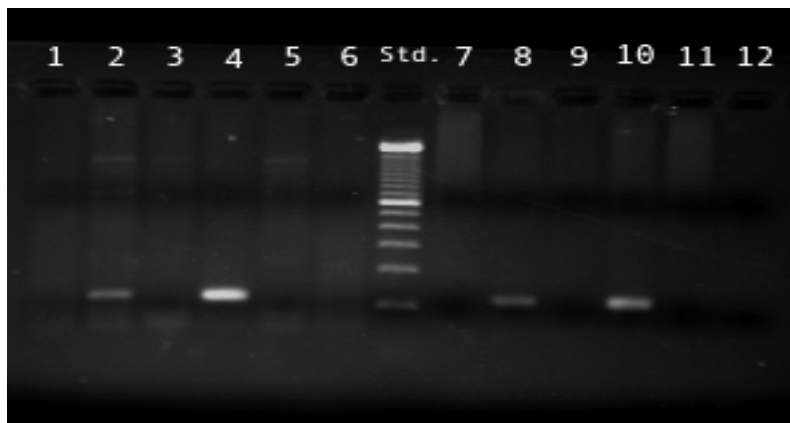
### 3.2.2 Testreihen mit künstlich mit Bakterien inokulierten Fichtennadelproben

Nachdem die Versuchsreihen zur Überprüfung der Oligodesoxynukleotide und der Techniken anhand der Bakterienkulturen erfolgreich verliefen, wurde dazu übergegangen, die Nachweistechniken mit Fichtennadelproben durchzuführen, die künstlich mit den entsprechenden Bakterienstämmen versetzt wurden. Fichtennadeln enthalten neben Proteinen, Zuckern und Lipiden aus den Zellen (STRASBURGER, 1991) unter anderem auch zahlreiche weitere chemische Verbindungen wie Cellulose, Hemicellulose, Lignin, ätherische Öle und Harze, Gerbstoffe (HELDT, 1996) sowie phenolische Substanzen und Terpene (HELLER, 1990; SLIMESTAD, 1997). Diese Inhaltsstoffe, die beim Gewebeaufschluß, wie er z.B. zur Vorbereitung der PCR-Anwendung nötig ist, oder bei der Anfertigung von Nadellängsschnitten für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung freigesetzt werden, konnten den Ablauf der Nachweistechniken empfindlich beeinträchtigen. Um sicherzugehen, daß diese Inhaltsstoffe die Nachweistechniken nicht negativ beeinflussten, wurden die PCR-Technik, die MPN-Technik mit anschließender Kontrolle durch die PCR-Technik und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit den bakteriell versetzten Fichtennadelproben durchgeführt.

#### 3.2.2.1 PCR-Versuchsreihen der Fichtennadelproben mit Bakterien

Die Amplifikation und der Nachweis von bestimmten Abschnitten einer Gensequenz über die PCR-Technik ist ein gegen Kontaminationen sehr anfälliger Prozeß. Um Verunreinigungen während der PCR-Anwendung zu vermeiden, mußte daher auf peinlichste Sauberkeit und Sterilität geachtet werden (NEWTON & GRAHAM, 1994). Diese Sauberkeit war jedoch bei den Fichtennadelproben aus den Untersuchungsstandorten nicht gegeben. Zum einen bestand die Möglichkeit, daß die aus den Fichtennadeln isolierte pflanzliche DNA Basenabschnitte besaß, die trotz der negativen Überprüfung über die Gendatenbank in der PCR-Anwendung durch die Oligodesoxynukleotide, die nur für die 16S rRNA-Gene der Bakterien spezifisch waren, vervielfältigt werden konnten. Zum anderen konnten die chemischen Inhaltsstoffe der Fichtennadeln die PCR-Reaktion stören bzw. die *Taq*-DNA-Polymerase hemmen. Um diese störenden Ursachen herauszufinden und zu beseitigen, wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen von sterilen, in Freiburg unter Laborbedingungen herangezogenen Fichtenkeimlingen Nadelproben genommen wurden, diese aufgeschlossen und zu dem aufgeschlossenen Gewebe die entsprechenden Bakterienzellen der verschiedenen Bakterienkulturen hinzugefügt wurden. Aus diesem Ansatz wurde die Gesamt-DNA, bestehend aus der pflanzlichen Fichtennadel-DNA und Bakterien-DNA, isoliert. Nach der Aufreinigung der DNA wurden die DNA-Probenmische als Ausgangsmaterial in die PCR-Ansätze eingesetzt.

In der ersten Versuchsreihe wurden zu den Fichtennadeln Bakterienzellen der Reinkultur *N. europaea* hinzugegeben. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Bedingungen für die Versuchsreihe der PCR-Anwendung mit der Bakterien-DNA (s. 3.2.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.37 dargestellt. Es wurden 2 PCR-Ansätze, der erste ohne (Spur 1 – 6), der zweite (Spur 7 – 12) mit einer 10%igen Magermilch-Lösung durchgeführt. Die Negativkontrollen, die in den Spuren 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11 und 12 zu finden waren, zeigten, wie erwartet, keine Banden der DNA-Amplifikate. In den Spuren 2 und 8, welche das DNA-Gemisch der Fichtennadeln mit *N. europaea* enthielten, waren zwei Banden zu erkennen, die im Vergleich mit dem Größenstandard direkt über der Bande mit 100 bp lagen. Dies stimmte mit der Länge des durch die Oligodesoxynukleotide eingefassten Basenabschnitt von 116 Basen überein (s. 2.8.2.1). Die PCR-Amplifikate aus der Fichtennadel-DNA, die mit der DNA der autotrophen Ammoniak-Oxidierer vom Standort Höglwald versetzt war, waren als zwei deutliche Banden in Spur 4 und 10 zu erkennen. Auch bei diesen PCR-Amplifikaten stimmte die Länge des Amplifikates mit der des Größenstandards und der Länge des PCR-Amplifikates von *N. europaea* überein.

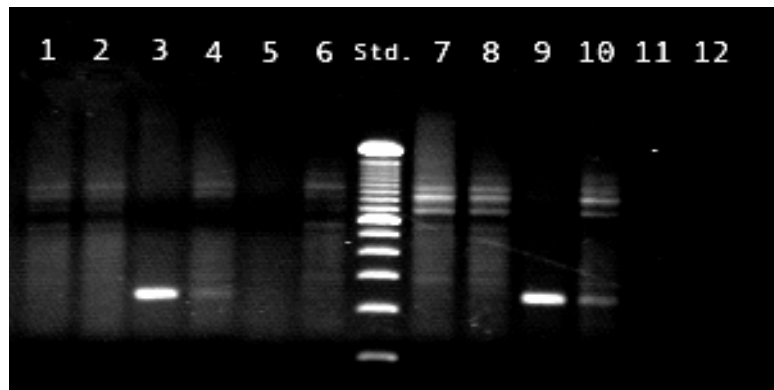


**Abb. 3.37: PCR-Versuchsreihe Ammoniak-Oxidierer-DNA mit Fichtennadel-DNA;** die Spuren enthielten alle Fichtennadel-DNA, die wie folgt mit der bakteriellen DNA versetzt war: Spur 1 – 12: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Höglwaldkultur, 5. *R. rhodochrous*, 6. Fichten-DNA mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Höglwaldkultur, 11. *R. rhodochrous*, 12. Fichten-DNA mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler Ansatz; Probe 7 - 12 Ansatz mit einer 10%igen Magermilch-Lösung

Ein Unterschied zwischen dem PCR-Ansatz mit und ohne Magermilch-Lösung war nicht zu erkennen. Im Anschluß erfolgte die PCR-Versuchsreihe zum Nachweis der Funktionalität der Oligodesoxynukleotide für *Nitrobacter*. Bei dieser Versuchsreihe wurden beide Oligodesoxynukleotid-Paare, Nw f und Nw r sowie FGPS872 und FGPS1269', getestet. Zunächst wurde das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar auf die Spezifität hin getestet. Als Positivkontrolle diente die isolierte DNA von *N. winogradskyi* und die DNA der Nitrit-Oxidierer vom Standort



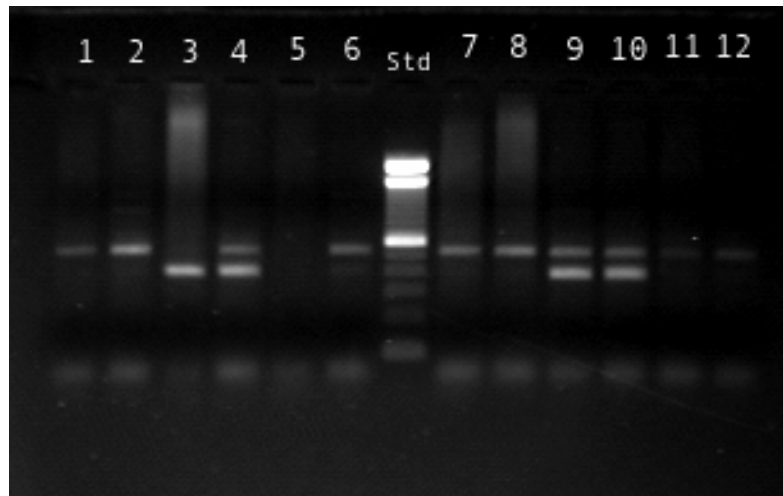
Höglwald, während die DNA der übrigen Bakterien die Negativkontrollen bildete. Die Abbildung 3.38 zeigt das Ergebnis dieser PCR-Versuchsreihe mit dem DNA-Gemisch.



**Abb. 3.38: PCR-Versuchsreihe Nitrit-Oxidierer-DNA mit Fichtennadel-DNA und *Nw f / Nw r***; die Spuren enthielten alle Fichtennadel-DNA, die wie folgt mit der bakteriellen DNA versetzt war: Spur 1 – 12: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Höglwaldkultur, 5. *R. rhodochrous*, 6. Fichten-DNA mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Höglwaldkultur, 11. *R. rhodochrous*, 12. Fichten-DNA mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler Ansatz; Probe 7 - 12 Ansatz mit einer 10%igen Magermilch-Lösung

Die Spuren mit der Fichtennadel-DNA und der als Positivkontrolle eingesetzten DNA von *N. winogradskyi* und der DNA der Nitrit-Oxidierer vom Standort Höglwald, also die Spuren 3, 4, 9 und 10, zeigten Banden der PCR-Amplifikate im Agarose-Gel. Die PCR-Amplifikate besaßen eine Länge von 236 Basen. Im Vergleich mit dem Größenstandard lagen die DNA-Banden knapp über der 200 bp-Marke. Damit wiesen die PCR-Amplifikate die richtige Größe auf. Die Negativkontrollen in den Spuren 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11 und 12 zeigten in diesem Größenbereich keine Banden. Die DNA-Banden der PCR-Amplifikate aus dem Höglwald fielen im Vergleich zu den Signalen mit der eingesetzten DNA von *N. winogradskyi* deutlich schwächer aus, waren jedoch klar zu erkennen. Daneben konnte man noch zahlreiche weitere Banden erkennen, die alle in einem Größenbereich von 600 – 900 bp lagen. Diese Artefakte traten besonders stark in dem Ansatz auf, der eigentlich zur Vermeidung dieser Artefakte mit der 10%igen Magermilch-Lösung versetzt worden war. Diese Artefakte waren auf eine Verunreinigung zurückzuführen, die von der DNA der Fichtennadeln stammte. Im letzten Test der PCR-Versuchsreihen wurden die aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotide FGPS872 und FGPS1269' für die Nitrit-Oxidierer untersucht. Das erwartete PCR-Amplifikat aus dieser Versuchsreihe sollte eine Länge von 397 Basen aufweisen. Die eingesetzten DNA-Gemische entsprachen den bereits oben aufgeführten Proben. Das Ergebnis war aus Abbildung 3.39 zu entnehmen. In den Spuren 3, 4, 9 und 10 waren die Positivkontrollen mit der DNA von *N. winogradskyi* und der DNA der Nitrit-Oxidierer vom Standort Höglwald zu sehen. In allen vier Spuren waren sehr starke DNA-Banden zu

erkennen, die im Vergleich zum Größenstandard auf etwa derselben Höhe lagen, wie die 400 Basen-Markierung des Größenstandards.



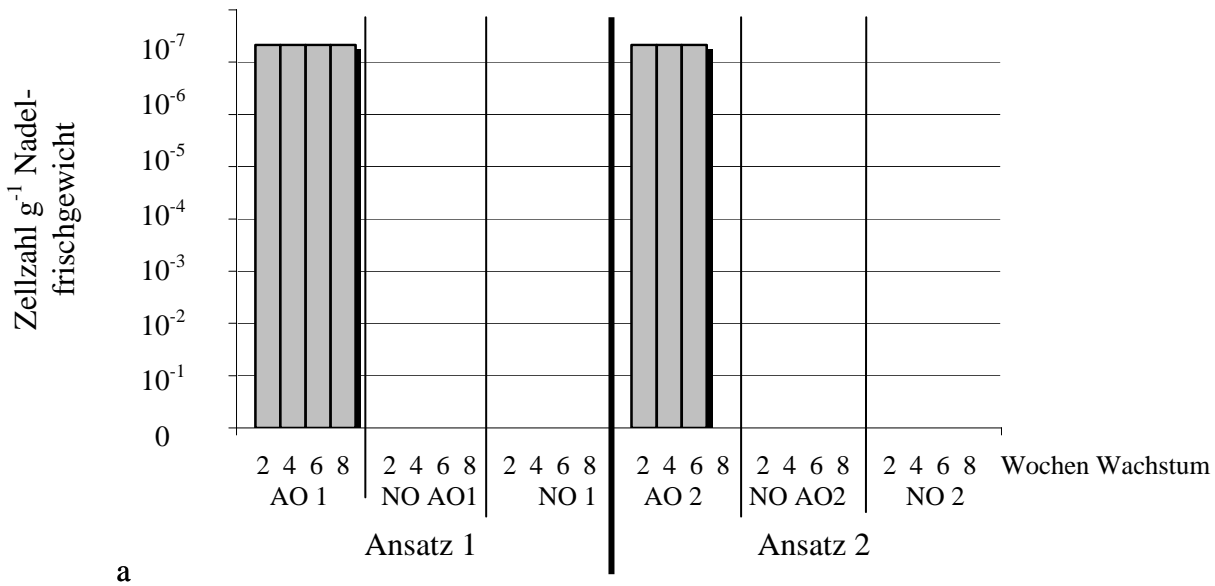
**Abb. 3.39: PCR-Versuchsreihe Nitrit-Oxidierer mit Fichtennadel-DNA und FGPS872 / FGPS1269'**; die Spuren enthielten alle Fichtennadel-DNA, die wie folgt mit der bakteriellen DNA versetzt waren: Spur 1 – 12: 1. *E. coli* TG1, 2. *N. europaea*, 3. *N. winogradskyi*, 4. Höglwaldkultur, 5. *R. rhodochrous*, 6. Fichten-DNA mit Wasser, 7. *E. coli* TG1, 8. *N. europaea*, 9. *N. winogradskyi*, 10. Höglwaldkultur, 11. *R. rhodochrous*, 12. Fichten-DNA mit Wasser; Std.: Größenstandard 100 bp DNA-Leiter; Probe 1 - 6 normaler Ansatz; Probe 7 - 12: Ansatz mit einer 10%igen Magermilch-Lösung

Damit wiesen die PCR-Amplifikate die richtige Länge auf. In den übrigen Spuren, die als Negativkontrollen entweder DNA von Bakterien enthielten, die keine Nitrit-Oxidierer waren, bzw. Wasser neben der Fichten-DNA enthielten, waren auf dieser Höhe keine DNA-Banden zu finden. Allerdings waren in den übrigen Spuren, nämlich Spur 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 noch weitere deutliche und z.T. sehr starke Banden zu sehen, die sehr dicht über den erwarteten Banden der Positivkontrollen lagen. Diese Banden wiesen eine Länge von ungefähr 500 Basen auf. Da die Banden auch in den Proben auftraten, die außer der Fichten-DNA nur noch Wasser enthielten, deutete dies darauf hin, daß es sich um einen Basenbereich in der Fichten-DNA handeln konnte, der ebenfalls durch das Oligodesoxynukleotid-Paar vervielfältigt würden. Aus diesem Grund konnte man nicht mehr von einer Spezifität des Oligodesoxynukleotid-Paares für Nitrit-Oxidierer im Zusammenhang einer PCR-Anwendung mit pflanzlicher DNA sprechen. Als Gesamtergebnis konnte festgehalten werden, daß die PCR-Anwendungen in allen Versuchsreihen das erwartete positive Ergebnis erbracht hatte. Das Oligodesoxynukleotid-Paar der Ammoniak-Oxidierer und das neu ermittelte Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r für die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* ergaben bei der PCR-Anwendung spezifische PCR-Amplifikate. Die Oligodesoxynukleotide bildeten mit der DNA aus den Fichtennadeln keine das Ergebnis störende Artefakte und waren daher uneingeschränkt auch in einer PCR-Anwendung mit Fichten-

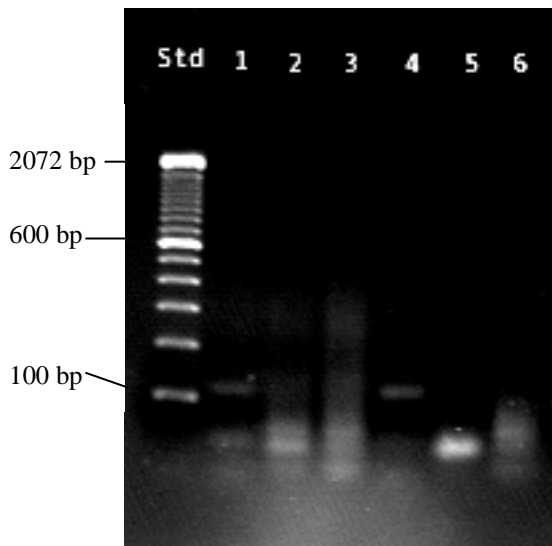
nadel-DNA einsetzbar. Das Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' aus der Literatur bildete hingegen bei der PCR-Anwendung mit Fichtennadel-DNA Artefakte aus, die etwa dieselbe Größe aufwiesen, wie die eigentlich erwarteten PCR-Amplifikate. Da dies zu Verwechslungen führen konnte, wurden diese Oligodesoxynukleotide nur eingeschränkt in weiteren PCR-Anwendungen eingesetzt. Der Einsatz einer 10%igen Magermilch-Lösung, welche die Artefakt-Bildung während der PCR-Reaktion mit pflanzlicher DNA ausschließen sollte, hatte sich als nicht geeignet erwiesen. Aus diesem Grund wurde auch diese Variante der PCR-Anwendung nicht weiter verfolgt.

### 3.2.2.2 MPN-Ansätze und Kontrolle über die PCR-Technik

In weiteren Versuchsreihen wurde die Überprüfung der MPN-Technik mit anschließender PCR-Kontrolle aus den Kulturröhrchen gestartet. Bei diesen Versuchsreihen war es von entscheidender Bedeutung, herauszufinden, ob die durch den Nadelblattaufschluß freigesetzten chemischen Inhaltsstoffe der Fichtennadeln das Wachstum der autotrophen Nitrifizierer in den Kulturröhrchen der MPN-Ansätze beeinflussen würden. Zugleich sollte damit überprüft werden, ob die chemischen Nachweise der Stoffwechselprodukte Nitrit bei den Ammoniak-Oxidierern und Nitrat bei den Nitrit-Oxidierern durch diese Inhaltsstoffe gestört würden. Zuletzt war es auch hier wichtig, aufgespürte Nitrifizierer nicht nur indirekt durch ihre Stoffwechselprodukte nachzuweisen, sondern durch die PCR-Technik die Bakterien direkt nachzuweisen, um Fehlreaktionen der chemischen Nachweisverfahren ausschließen zu können. Die Versuchsreihen wurden entsprechend den Bedingungen der Versuchsreihen unter Punkt 3.2.1.4 durchgeführt. Zunächst wurden 5g Fichtennadel aufgeschlossen und mit Bakterien einer Reinkultur von *N. europaea* mit einer Konzentration  $2,7 - 3,2 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  versetzt. Die Ergebnisse der MPN-Auswertung sind aus Abbildung 3.40 a zu entnehmen, während das Agarose-Gel-Bild in Abbildung 3.40 b die Ergebnisse des direkten Zell-Nachweises über die PCR-Technik zeigen. Wie man aus der Auswertung des MPN-Ansatzes erkennen kann, war im MPN-Doppelansatz in beiden Teilansätzen nur *N. europaea* über das chemische Nachweisverfahren zu finden (AO 1 und AO 2), während Nitrit-Oxidierer (NO AO1, NO AO2, NO 1 und NO2) erwartungsgemäß nicht detektiert werden konnten. In den MPN-Teilansätzen 1 und 2 (AO 1 und AO 2) wurden nach 2 Wochen Inkubation *N. europaea*-Zellen in einer Konzentration von mehr als  $2,4 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ermittelt. Dies entsprach der Ausgangskonzentration der zu Beginn eingesetzten Bakterien. Im 2. Ansatz war in der 8. Woche aufgrund des starken Wachstums kein eindeutiges Ergebnis mehr zu ermitteln. Die PCR-Kontrolle ergab, daß nur *N. europaea* in den Spuren 1 und 4 nachzuweisen waren, während eine Überprüfung auf autotrophe Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* negativ verlief (Spuren 2, 3, 5 und 6).



a

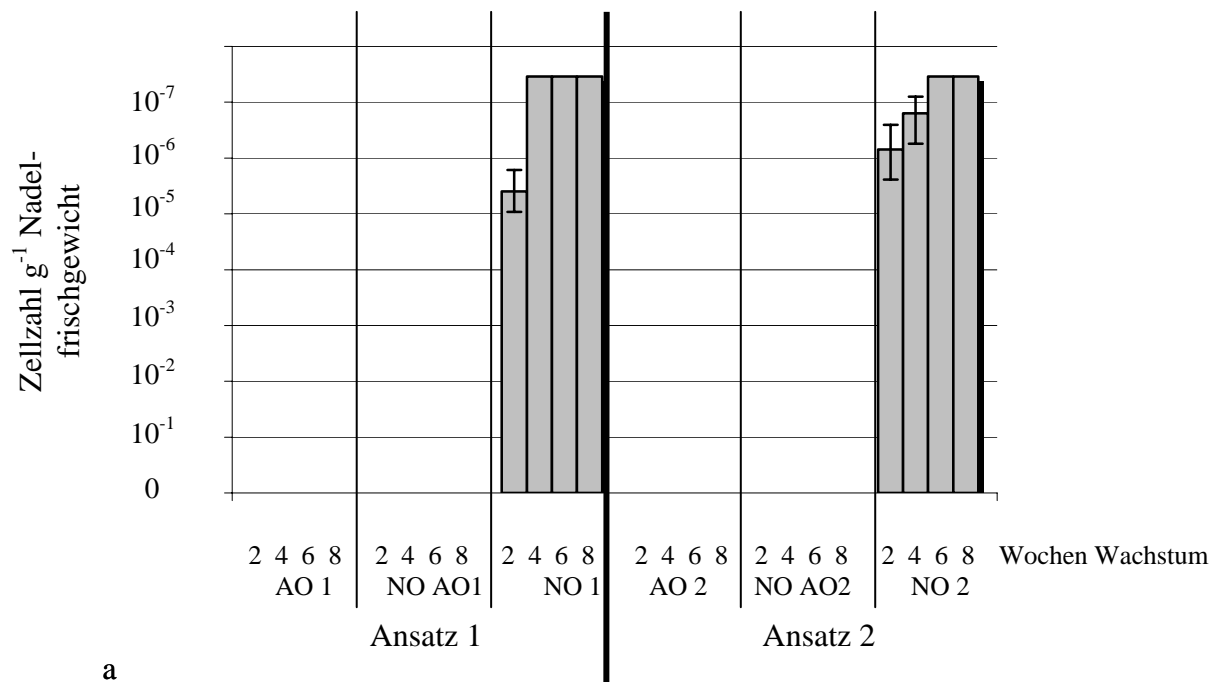


b

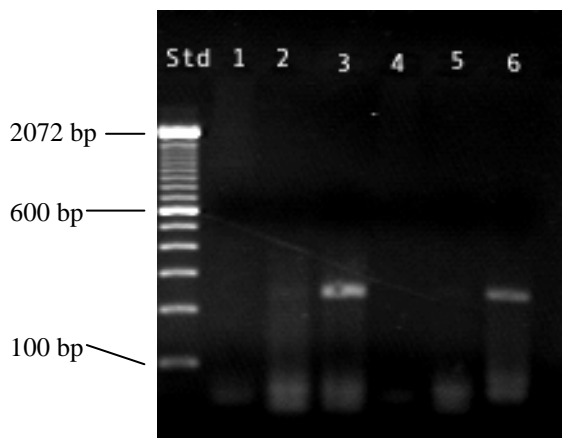
**Abb. 3.40 a: Validierung MPN-Ansatz Fichte mit *N. europaea***; die Ausgangskonzentration von  $2,7 - 3,2 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden in beiden Ansätzen mit mehr als  $2,4 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  und darüber hinaus wieder erreicht; Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen mit *N. europaea*; NO AO: Kulturröhrchen mit *N. europaea* auf gleichzeitiges Vorhandensein von Nitrit-Oxidierer hin getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes**; im Agarose-Gel sind in Spur 1 und 4, die *N. europaea*-DNA und Fichtennadel-DNA der jeweiligen MPN-Ansätze enthalten, deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte Abschnittes des 16S rRNA-Gens von *N. europaea* zu erkennen; Nitrit-Oxidierer konnten nicht nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Entsprechend dem Nachweis für *N. europaea* wurde auch der Nachweis für *N. winogradskyi* durchgeführt. 6 g Fichtennadeln wurden mit einer Reinkultur von *N. winogradskyi* mit einer Ausgangskonzentration von  $0,7 - 1,3 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  angeimpft. Aus der Abbildung 3.41 a und b gehen die Ergebnisse zu diesem Versuch hervor. In den MPN-Teilansätzen 1 und 2 konnte *N. winogradskyi* (NO 1 und NO 2) mit jeweils mehr als  $2,88 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  nach 4 (NO 1) bzw. nach 6 Wochen Wachstum (NO 2) über den chemischen Nachweis des Stoffwechselendproduktes Nitrat ermittelt werden.



a



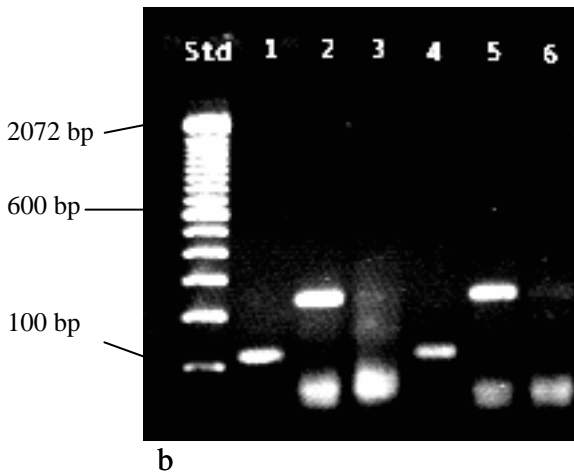
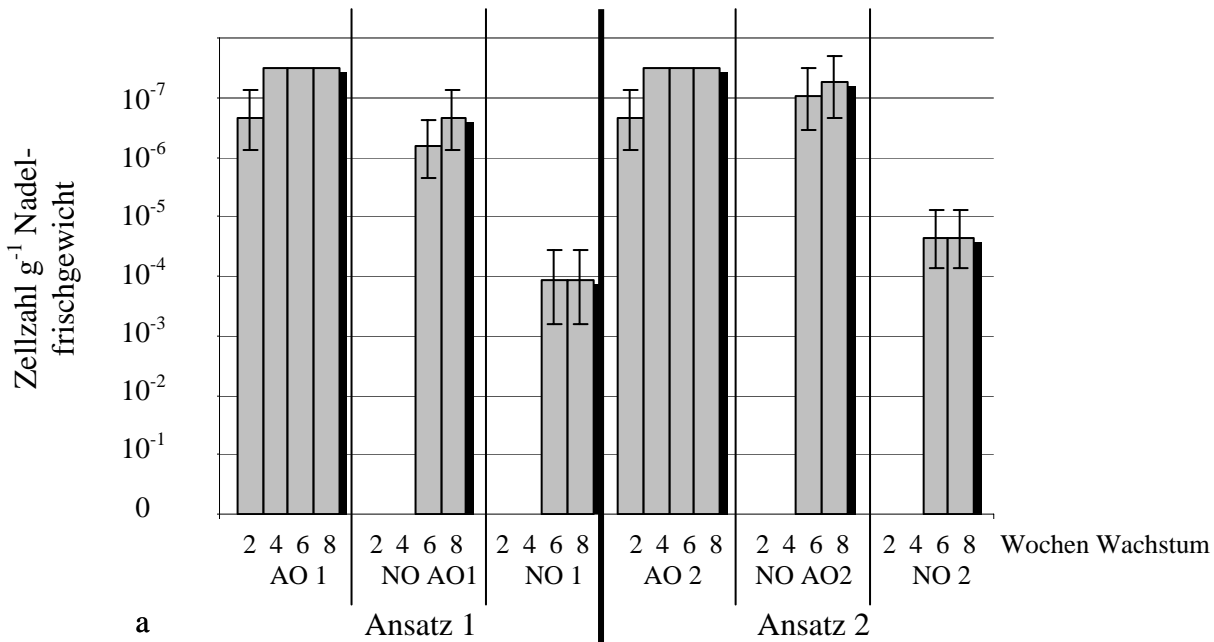
b

**Abb. 3.41 a: Validierung MPN-Ansatz Fichte *N. winogradskyi*;** die Ausgangskonzentration von  $0,7 - 1,3 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden in beiden Ansätzen mit mehr als  $2,88 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  und darüber hinaus wieder erreicht; Ammoniak-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf gleichzeitiges Vorhandensein von *N. winogradskyi* getestet; NO: Kulturröhrchen für *N. winogradskyi*; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes;** im Agarose-Gel sind in Spur 3 und 6, die *N. winogradskyi*-DNA und Fichtennadel-DNA aus den einzelnen MPN-Ansätzen enthalten, deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte DNA-Abschnittes des 16S rRNA-Gens von *N. winogradskyi* zu erkennen; Ammoniak-Oxidierer konnten nicht nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Die Ausgangskonzentration der Bakterienzellen wurde damit übertroffen. Ammoniak-Oxidierer konnten erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (AO 1 und AO 2) und auch *Nitrobacter* konnte in den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer nicht nachgewiesen werden (NO AO1 und NO AO2). Mit Hilfe der PCR-Technik konnten die Zellen von *Nitrobacter* in den Kulturröhrchen für die Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) direkt nachgewiesen werden, wie anhand der Banden in den Spuren 3 und 6 zu erkennen ist. In den Kulturröhrchen, in denen Ammoniak-

Oxidierer kultiviert wurden, konnten über die PCR-Technik keine Ammoniak-Oxidierer spezifisch nachgewiesen werden (Spur 1 und 4) und auch Nitrit-Oxidierer konnten in diesen Röhrcchen mit den entsprechend spezifischen Oligodesoxynukleotiden nicht nachgewiesen werden, wie aus den Spuren 2 und 5 zu erkennen war Als letzter Test dieser Versuchsreihe wurden 5,38 g Fichtennadeln mit den Nitrifizierer vom Standort Höglwald angeimpft, deren Ausgangskultur eine Konzentration von  $1,6 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  aufwies. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.42 a und b dargestellt.



**Abb. 3.42 a: Validierung MPN-Ansatz Fichte Höglwaldkultur;** die Ursprungskonzentration lag bei  $1,6 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ; in beiden Teilansätzen wurden  $3,09 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  bei den Ammoniak-Oxidierern, bei den mit den Ammoniak-Oxidierern zusammen inkubierten Nitrit-Oxidierern im Ansatz NO AO1  $4,63 \times 10^6$  und in Ansatz NO AO2  $1,77 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ , bei den Nitrit-Oxidierern im Ansatz NO 1  $8,69 \times 10^3$  und im Ansatz NO 2  $4,44 \times 10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  erreicht; AO: Kulturröhrcchen für Ammoniak-Oxidierer; NO

AO: Kulturröhrcchen für Ammoniak-Oxidierer auf Vorhandensein von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrcchen für Nitrit-Oxidierer; Fehlerbalken: 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes;** im Agarose-Gel sind in Spur 1 und 4, welche die Ammoniak-Oxidierer aus den einzelnen MPN-Ansätzen enthalten, deutlich zwei DNA-Banden des über die PCR-Reaktion amplifizierte 16S rRNA-Gens der Ammoniak-Oxidierer zu erkennen; Nitrit-Oxidierer konnten in Spur 2 und 5 sowie in den Spuren 3 und 6 durch entsprechende DNA-Banden nachgewiesen werden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

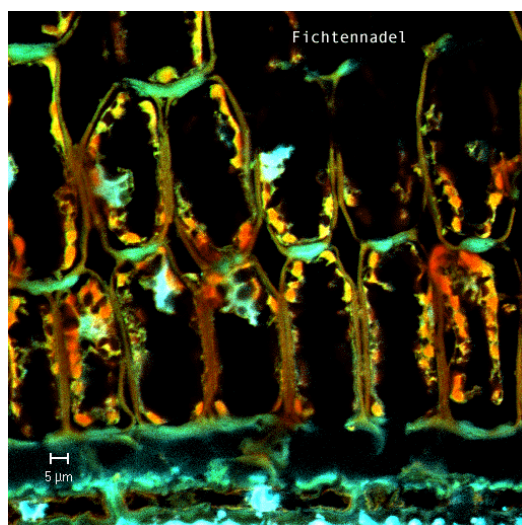
Die Ammoniak-Oxidierer erreichten in den Teilansätzen 1 und 2 (AO 1 und AO 2) bereits nach 2 Wochen Wachstum mehr als  $3,09 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Erst nach ausreichender Nitrit-Produktion der Ammoniak-Oxidierer waren die Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2), die zusammen mit den Ammoniak-Oxidierern in denselben Kulturröhrchen inkubiert wurden, mit einer Verzögerung im Medium nachweisbar. Die Zellzahlen lagen mit  $4,63 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 1 (NO AO1) und  $1,77 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  im Ansatz 2 (NO AO2) leicht unter den Zahlen der Ammoniak-Oxidierer. Die Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) ließen sich separat nachweisen. Hier war eine leichte zeitliche Verzögerung im Wachstum zu beobachten und die Zellzahlen lagen mit  $8,69 \times 10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 1 (NO 1) und  $4,44 \times 10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in Ansatz 2 (NO 2) deutlich unter den Zahlen der Nitrit-Oxidierer, die zusammen mit den Ammoniak-Oxidierern kultiviert wurden, zurück. Dieses Ergebnis konnte auch durch die PCR-Kontrolle bestätigt werden. In den Spuren 1 und 4 waren die DNA-Banden für die Ammoniak-Oxidierer klar knapp über der 100 Basenpaar-Markierung des Größenstandards zu erkennen, während in den Spuren 2 und 5 die hellen DNA-Banden der Nitrit-Oxidierer zu sehen waren, die zusammen mit den Ammoniak-Oxidierern kultiviert wurden. In den Spuren 3 und 4 waren, wenn auch sehr schwach, die Banden der Nitrit-Oxidierer zu erkennen, die ohne Ammoniak-Oxidierer kultiviert wurden. Die DNA-Banden der Nitrit-Oxidierer zeigten mit der Lage direkt über der 200 Basenpaar-Marke des Größenstandards die richtige Größe.

Die Versuchsreihen zur Überprüfung der MPN-Technik mit der anschließenden Kontrolle der positiv gewerteten Kulturröhrchen des MPN-Ansatzes über die PCR-Technik auf Anwesenheit von Nitrifizierer-Zellen hatten in allen Testläufen ergeben, daß die autotrophen Nitrifizierer durch den Nadelaufschluß und die Freisetzung der pflanzlichen Inhaltsstoffe aus den Fichtennadeln, wie z.B. Säuren, Harze, Gerbstoffe, phenolische Inhaltsstoffe etc., nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt wurden. Die chemischen Nachweise der Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat liefen nicht nur erwartungsgemäß ab, sondern mit ihrer Hilfe konnten auch annähernd die Bakterienkonzentrationen ermittelt werden, welche die Ausgangskulturen aufwiesen, aus denen die MPN-Ansätze inokuliert wurden. Die Kontrolle der nach Abschluß der letzten Auswertung positiv gewerteten Kulturröhrchen über die PCR-Technik hatte ergeben, daß die PCR-Reaktionen nicht durch die pflanzlichen Inhaltsstoffe bzw. die in den Proben zusätzlich enthaltene Fichtennadel-DNA gestört wurden. Störende Artefakte in Form von zusätzlichen DNA-Banden im Agarose-Gel konnten in keinem Fall entdeckt werden, was gleichzeitig als eine eindeutige Bestätigung der hohen Spezifität der ausgewählten Oligodesoxynukleotide gedeutet wurde, da nur die erwarteten DNA-Amplifikate in den Abbildungen der Agarose-Gele zu erkennen waren.

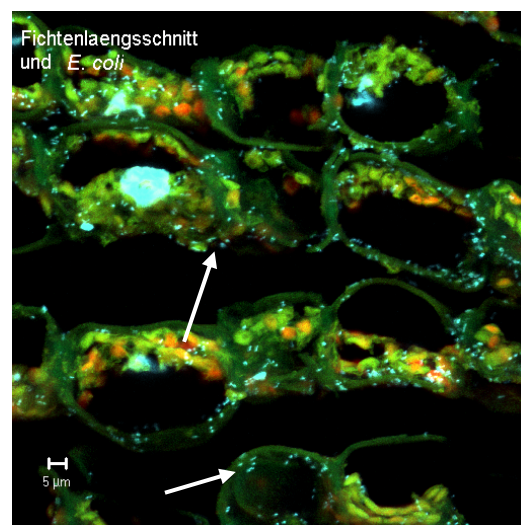
### 3.2.2.3 Überprüfung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Fichtennadeln

Die Überprüfung der Oligodesoxynukleotid-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung unter Punkt 3.2.1.5 hatte eindeutig ergeben, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden für die Hybridisierungen an Bakterien uneingeschränkt einsetzbar sind. Im folgenden Versuchsblock sollte getestet werden, ob die Oligodesoxynukleotide auch bei einer Hybridisierung von Bakterien im Nadelblattgewebe spezifisch und fehlerfrei anwendbar waren. Zudem sollte überprüft werden, inwieweit die Nadelblatt-Präparation und *in situ*-Hybridisierung optimiert werden mußten, um entsprechend aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Bei der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop sollte ermittelt werden, welchen Einfluß die Autofluoreszenz des Nadelblattgewebes auf die Bilderstellung, die Auswertung der Fluoreszenzsignale der Bakterien und eine angestrebte Quantifizierung der Bakterien nehmen würde.

Zunächst wurden Längsschnitte von Fichtennadeln über die Gefrierschnittmethode angefertigt. Diese Längsschnitte wurden für 3 – 4 Tage in Reaktionsgefäßen mit den entsprechenden Bakterien im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert und dabei regelmäßig sanft gemischt, damit sich die Bakterienzellen auf dem Gewebe festsetzen konnten. Im Anschluß daran wurden die Längsschnitte auf die Objektträger aufgezogen und die *in situ*-Hybridisierungen vorgenommen. Im ersten Schritt wurde die Gegenfärbung mit DAPI näher untersucht. Da DAPI AT-basenreiche DNA anfärbt, mußte damit gerechnet werden, daß DAPI neben der DNA in den Bakterienzellen auch die DNA in den Zellkernen und in den Chloroplasten und Mitochondrien der Fichtennadeln angefärbt wurde. Um entsprechende DAPI-Fluoreszenzsignale erkennen, deuten und auswerten zu können, wurden Nadellängsschnitte mit und ohne Bakterien verglichen. Die Ergebnisse des Vergleiches sind in Abbildung 3.43 dargestellt.

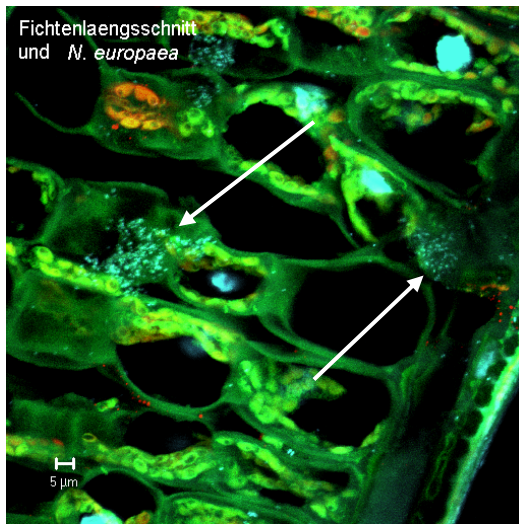
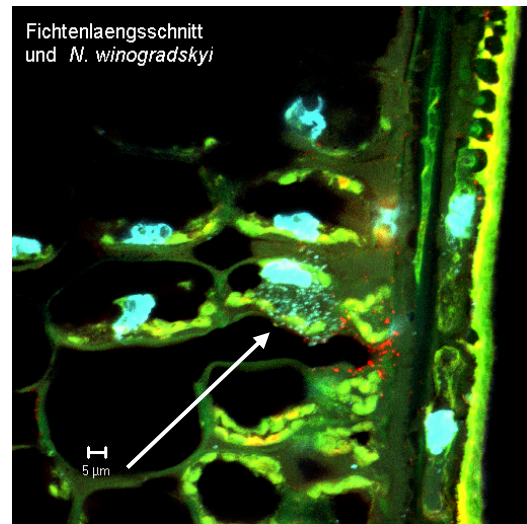
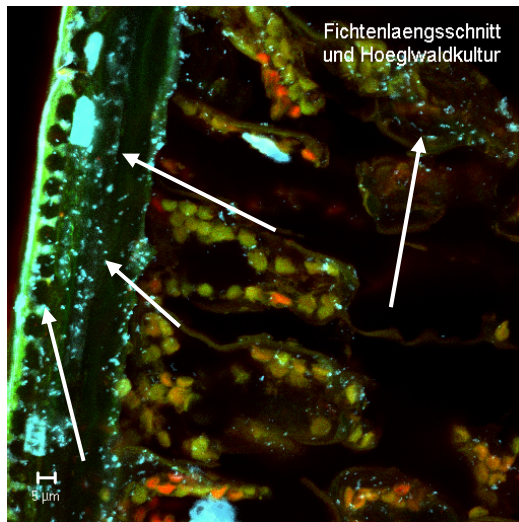


a Fichtennadel



b Fichtennadel mit *E. coli*



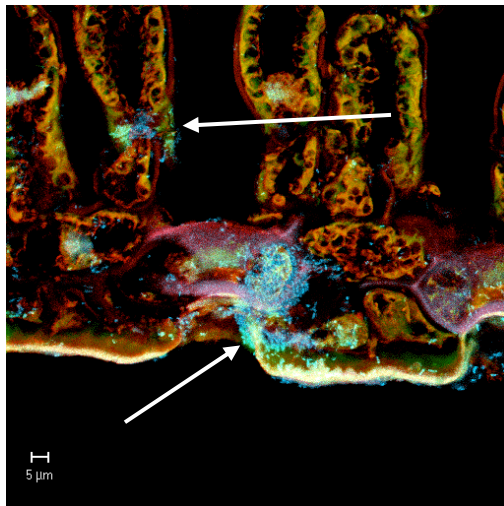
c Fichtennadel mit *N. europaea*d Fichtennadel mit *N. winogradskyi*

e Fichtennadel mit Nitrifizierer vom Höglwald

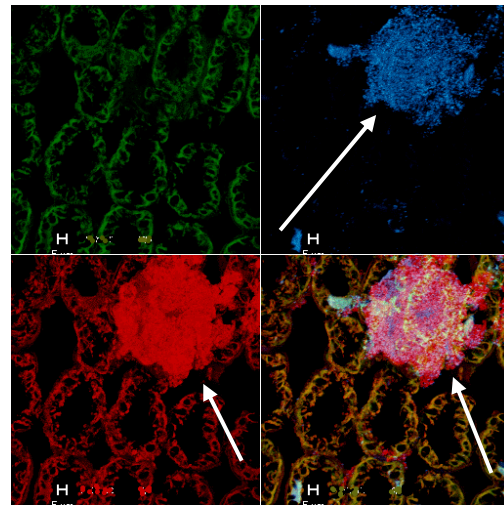
**Abb. 3.43: DAPI-Färbung Fichte und Bakterien;** Fichtennadel-Längsschnitte mit künstlich applizierten Bakterien; neben den Zellkernen, die als große blaue Farbsignale in den Zellen zu erkennen sind (z.B. **b** und **d**), wurden auch alle Bakterien mit DAPI angefärbt (kleine blaue Signale, s. Pfeile); die DNA der Chloroplasten bzw. Mitochondrien konnte nicht detektiert werden; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 364 nm, 543 nm, 633 nm; Maßstab: 5 µm

Im ersten Bild oben links (s. Abb. 3.43 a) ist ein Längsschnitt zu sehen, der nicht mit Bakterien versetzt worden war. Man konnte die Zellkerne in den Zellen erkennen, die als große blaue Fluoreszenzsignale aufleuchteten. DNA von Chloroplasten bzw. Mitochondrien konnten nicht detektiert werden. Weiteren Zellstrukturen, die man erkennen konnte, entstanden durch die Autofluoreszenz des Nadelgewebes. In den übrigen Bildern (s. Abb. 3.43 b – e) waren zusätzlich zu den großen blauen Zellkernen viele kleine blaue DAPI-Fluoreszenzsignale (weiße Pfeile) im Vergleich zu dem Längsschnitt ohne Bakterien zu erkennen. Dabei handelte es sich um die in den Bakterien enthaltene DNA, die durch DAPI entsprechend angefärbt wurde, und in den Bildern als kleine blaue Signale aufleuchteten. Die Anfärbung der Bakterienzellen mit DAPI hatte gezeigt, daß diese als kleine blaue Fluoreszenzsignale eindeutig zu erkennen waren. Damit konnte man Bakterien im Nadelblattgewebe zweifelsfrei nachweisen.

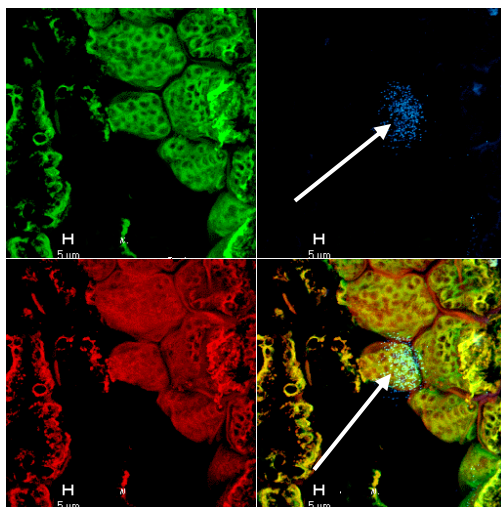
Nach der erfolgreichen Anfärbung der Bakterien im Nadelblatt-Gewebe mit DAPI folgte die *in situ*-Hybridisierung mit der für die Ammoniak-Oxidierer spezifischen Sonde Nso190 im Nadelblatt-Gewebe. Aus der Abbildung 3.44 sind die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung zu entnehmen.



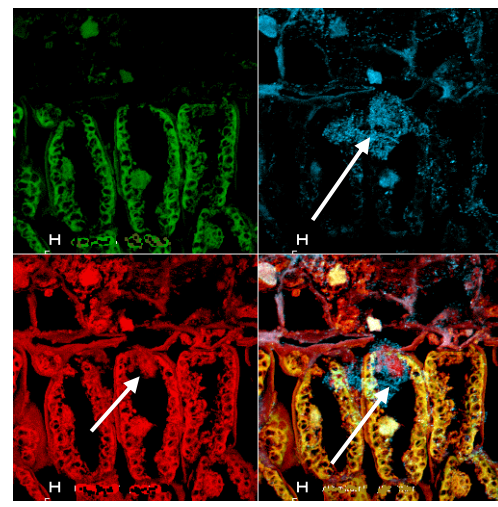
a Fichtennadel mit *E. coli*



b Fichtennadel mit *N. europaea*



c Fichtennadel mit *N. winogradskyi*



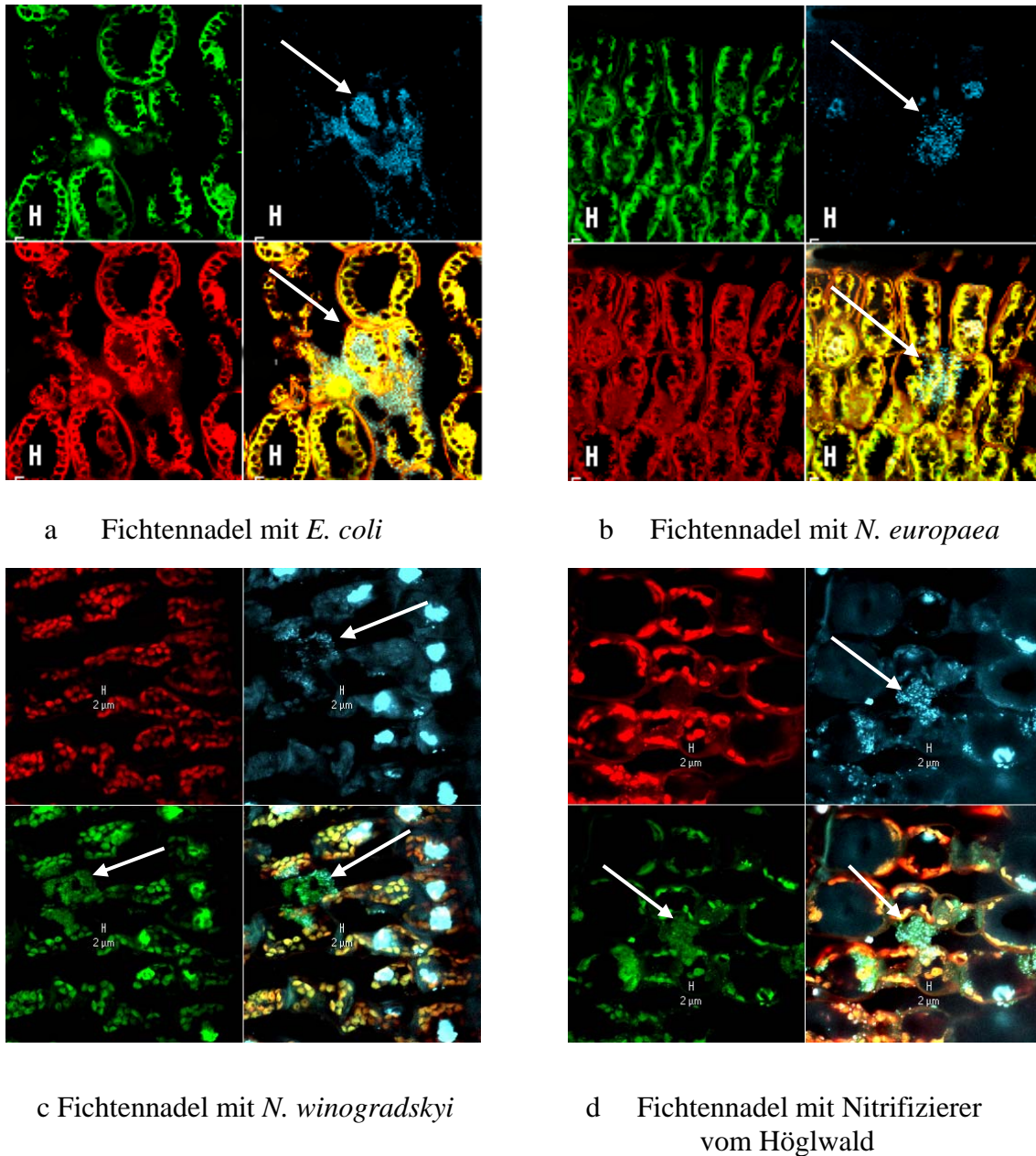
d Fichtennadel mit Nitrifizierer vom Höglwald

**Abb. 3.44:** *in situ*-Hybridisierung Fichte und Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190; Fichtennadel-Längsschnitte mit künstlich applizierten Bakterien; DAPI-Gegenfärbung; alle Bakterien konnten mit DAPI angefärbt werden (blau); mit der für Ammoniak-Oxidierer spezifischen Sonde Nso190 mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff ROX konnten hingegen nur die Ammoniak-Oxidierer markiert werden; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 543 nm, 488 nm, 364 nm; Maßstab: 5 µm

Als Negativkontrolle dienten die *in situ*-Hybridisierungen mit den Nadellängsschnitten, die mit den Bakterienstämmen *E. coli* und *N. winogradskyi* versetzt wurden (s. Abb. 3.44 a und c). Im Bild 3.44 a, welches das Nadelpräparat mit *E. coli* zeigt, waren die durch DAPI blau gefärbten Zellen (Pfeile) klar zu erkennen. Die Mischfarbe Magenta, die sich bei der Kombination der Fluoreszenzsignale aus der Blau-Fluoreszenz des DAPI und der Rot-Fluoreszenz des an die für die Ammoniak-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 gebundenen Farbstoffes ROX ergibt, war nicht zu erkennen. Auch in Abbildung 3.44 c, dem Präparat, das mit *N. winogradskyi*-Zellen versetzt worden war, sah man nur die blauen Fluoreszenzsignale der DAPI-Färbung. Dies wurde besonders bei der Auftrennung der einzelnen Kanäle für die verschiedenen Laser ersichtlich. Während das blaue DAPI-Signal im Blau-Kanal zu erkennen war, fehlten die Signale im Rot-Kanal an der entsprechenden Stelle im Nadelpräparat. Im Gesamtbild waren daher nur die blauen DAPI-Fluoreszenzsignale zu sehen. Als Positivkontrolle wurden die Längsschnitte der Fichtennadeln mit *N. europaea*-Zellen inkubiert (s. Abb. 3.44 b). Im Bild waren die Zellen als großer Magenta-farbiger Fleck auf dem Nadelgewebe im Gesamtbild zu erkennen. Im Blau-Kanal waren die Zellen an ihrer blauen Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten DNA gut zu erkennen, ebenso wie an ihrer Rot-Fluoreszenz der mit dem Farbstoff ROX markierten Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 im Rotkanal. Damit war eindeutig bewiesen, daß durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit der spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 nicht nur die Ammoniak-Oxidierer allein als Bakterienzellen spezifisch markiert werden konnten, sondern daß dieser hochspezifische Nachweis auch im Nadelblattgewebe der Fichte anstandslos und perfekt zu führen war. In einem weiteren Präparat wurden die Zellen der autotrophen Nitrifizierer vom Standort Höglwald auf einen Längsschnitt aufgebracht und ebenfalls hybridisiert (s. Abb. 3.44 d). In der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop konnte man auch in diesem Fall zweifelsfrei erkennen, daß alle Zellen der Mikroorganismen mit DAPI angefärbt wurden. Das blaue Fluoreszenzsignal war dem Blau-Kanal zu entnehmen. Da in der Höglwaldmischkultur der Nitrifizierer auch Ammoniak-Oxidierer enthalten waren, sollten an derselben Stelle wie im Blau-Kanal auch im Rot-Kanal rote Fluoreszenzsignale zu sehen sein. Der weiße Pfeil im Rot-Kanal zeigt diese roten Fluoreszenzsignale. Durch eine Integration der Einzelbilder zum Gesamtbild konnte man anhand der deckungsgleichen Lage der Signale erkennen, daß es sich um eine Zellansammlung handelte, die z.T. blau und z.T. rot gefärbt war. Die blauen Signale stammten von Zellen weiterer Mikroorganismen, die zusätzlich in der Mischkultur der Nitrifizierer vorkamen, also vor allem Nitrit-Oxidierer. Die roten Signale kennzeichneten die Ammoniak-Oxidierer, die aufgrund ihrer hohen Anzahl der Ribosomen viele Oligodesoxynukleotid-Sondenmoleküle binden konnten. Damit ergaben sich auch bei einer Bakterienmischkultur deutlich spezifische Signale für die Detektion der Ammoniak-Oxidierer. Nach der erfolgreichen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer wurden dieselben Versuche auch mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde



NIT3 für die Nitrit-Oxidierer durchgeführt. Abbildung 3.45 zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe.



**Abb. 3.45:** *in situ*-Hybridisierung Fichte mit Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3; Fichtennadel-Längsschnitt mit künstlich applizierten Bakterien; DAPI-Gegenfärbung; alle Bakterien konnten mit DAPI angefärbt werden (blau); mit der für Nitrit-Oxidierer spezifischen Sonde NIT3 mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FITC konnten hingegen nur die Nitrit-Oxidierer markiert werden; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 543 nm, 488 nm, 364 nm; Maßstab: 5 / 2 µm

Entsprechend der Versuchsreihe bei den Ammoniak-Oxidierern bildete auch bei dem Test der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 das Fichtennadelpräparat mit den *E. coli*-Zellen die Negativkontrolle (s. Abb. 3.45 a). Im Bild oben links waren nur die durch den Fluoreszenz-Farbstoff

DAPI blau gefärbten *E. coli*-Zellen zu erkennen. Im Bild rechts (s. Abb. 3.45 b) war das Fichtennadelpräparat dargestellt, das mit den Zellen von *N. europaea* versetzt wurde. Man konnte erkennen, daß die Zellen von *N. europaea* nur das blaue DAPI-Signal aufwiesen (Pfeil). Eine Grün-Fluoreszenz war nicht zu erkennen. Damit hatte die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 nicht an die Zellen von *N. europaea* gebunden. Anders verhielt es sich bei der Positivkontrolle (s. Abb. 3.45 c). Hier wurde der Nadelschnitt mit *N. winogradskyi* versetzt. Wie man aus der Abbildung entnehmen kann, waren die blauen Fluoreszenzsignale der DAPI-Anfärbung durchaus zu erkennen. Zugleich konnte man an der gleichen Stelle im Grün-Kanal ebenfalls Fluoreszenzsignale erkennen. Betrachtete man nun das Gesamtbild, so war in der Übereinanderlagerung ganz klar die Kombination der grünen und blauen Fluoreszenzsignale zu sehen (Pfeil). Damit wurde nachgewiesen, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 spezifisch an die Zellen von *N. winogradskyi*, und zwar nur an diese Zellen, gebunden hatte. Daneben wurde ein Fichtennadel-Längsschnitt mit der Mischkultur der autotrophen Nitrifizierer vom Standort Höglwald inkubiert (s. Abb. 3.45 d). Auch dieses Präparat wurde mit der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 hybridisiert, um die Nitrit-Oxidierer dieser Mischkultur im Nadelgewebe nachweisen zu können. Aus dem Bild unten rechts ist das Ergebnis zu entnehmen. Neben den blauen Fluoreszenzsignalen im Blau-Kanal für die DAPI-Färbung erkennt man im Grün-Kanal zusätzlich die grüne Fluoreszenz des Farbstoffes FITC. Im Gesamtbild erkennt man die Kombination aus den blauen und grünen Fluoreszenzsignalen. Damit konnten auch in der Mischkultur die Nitrit-Oxidierer ganz klar detektiert werden. Als Endergebnis blieb festzuhalten, daß auch die Anwendung der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 zum Nachweis der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung höchstspezifisch im Nadelblattgewebe abgelaufen war und für die Anwendung zur näheren Untersuchung, eingesetzt werden konnte.

Aus den Ergebnissen der Validierung der Nachweistechniken über die künstlich mit Bakterien inokulierten Fichtennadelproben war klar erkennbar, daß alle Nachweismethoden für den Nachweis der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblattgewebe fehlerlos anwendbar waren und reproduzierbare und einwandfreie Ergebnisse lieferten. Eventuelle Substanzen aus den Fichtennadeln, wie die Fichten-DNA oder die Inhaltsstoffe der Fichtennadeln wie z.B. Gerbstoffe oder phenolische Substanzen störten weder die MPN-Anwendung noch die Durchführung der PCR-Kontrollen, noch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Die Auswertung der Fichtennadel-Längsschnitte mit dem konfokalen Laserrastermikroskop lieferte einwandfreie Bilddarstellungen die trotz des starken Hintergrunds durch die Autofluoreszenz des Pflanzengewebes eine Auswertung und bildliche Darstellung der Präparate erlauben.

### 3.3 Nachweis der autotrophen Nitrifizierer in Fichtennadeln

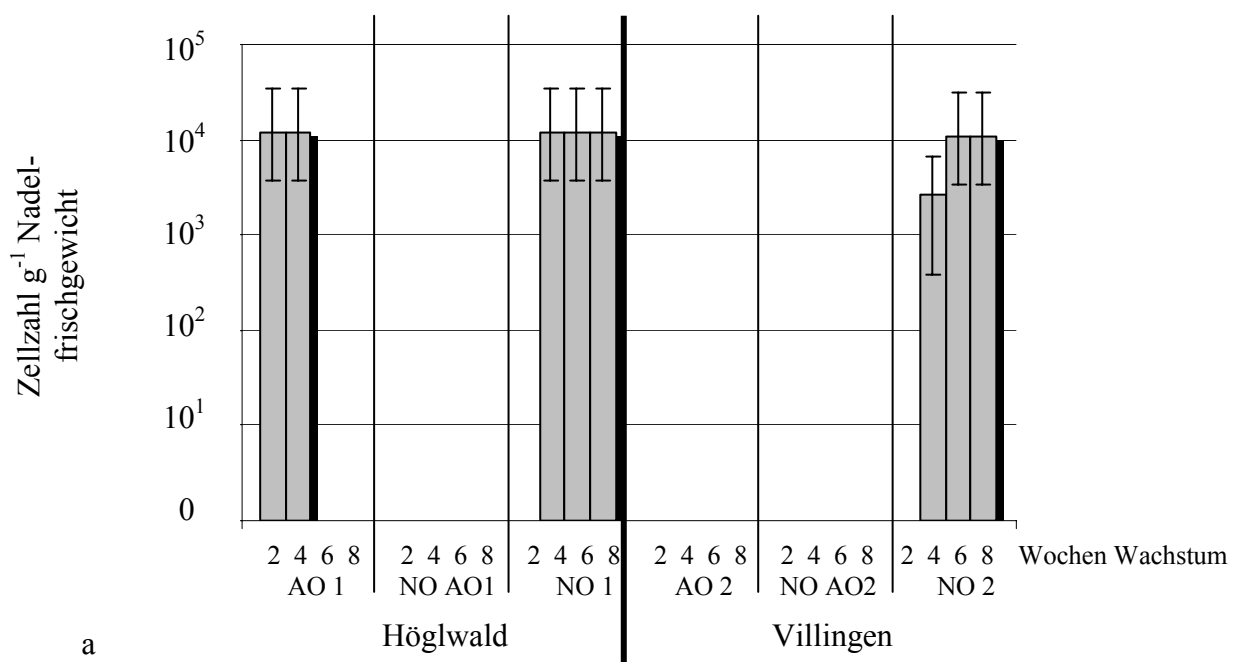
Mit den optimierten und etablierten Nachweistechiken bestand nun die Möglichkeit, das Nadelmaterial der Fichtennadelproben aus den Untersuchungsstandorten näher zu betrachten. Im ersten Versuchsblock wurden die Fichtennadeln der Standorte Höglwald und Villingen mit Hilfe der MPN-Technik in Kombination mit der PCR-Kontrolle, über die PCR-Technik unmittelbar aus den Fichtennadelmaterial selbst und mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung anhand von Fichtennadelpräparaten auf die Anwesenheit, den Besiedlungsort in oder auf der Fichtennadel und auf die Zellzahl der autotrophen Nitrifizierer untersucht. Der zweite Versuchsblock umfaßte die Versuche zur Aufklärung des Besiedlungsvorganges des Nadelblatt-Apoplasten durch die Inokulation der in Freiburg unter kontrollierten Laborbedingungen herangezogenen Fichtenkeimlingen mit autotrophen Nitrifizierern.

#### 3.3.1 Untersuchung der Proben der Standorte Höglwald und Villingen

Neben dem Nachweis und der genauen Lokalisation der autotrophen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer im Nadelblatt-Apoplasten war ein weiteres Ziel, die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer zu erfassen. Daneben sollte ein Vergleich der mit atmogenem Stickstoff unterschiedlich belasteten Standorte Aufschluß über einen Zusammenhang mit der Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten geben. Ein weiteres Ziel lag in der Ermittlung von saisonalen Unterschieden in der Besiedlung der Fichtennadelproben mit autotrophen Nitrifizierern. Zunächst erfolgte ein erster indirekter Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über die MPN-Technik. Zur Kontrolle der positiv gewerteten Kulturröhrchen der MPN-Ansätze wurde über die PCR-Technik ein direkter Nachweis der Nitrifizierer-Zellen aus den Kulturröhrchen vorgenommen. Um die autotrophen Nitrifizierer auch direkt in den Fichtennadelproben nachzuweisen, folgte die Kontrolle über die PCR-Technik nach der DNA-Isolierung aus den Fichtennadelproben. Um erste Hinweise über die Ammoniak-Oxidierer, die in den Fichtennadeln vorkommen sollten, zu erhalten, wurden die PCR-Proben im Anschluß sequenziert. Über den Sequenzvergleich mit der Gendatenbank wurde eine erste Zuordnung der Ammoniak-Oxidierer zu einer Gattung angestrebt. Für die Nitrit-Oxidierer waren die Bedingungen so spezifisch auf die Gattung *Nitrobacter* zugeschnitten, daß von einer näheren Untersuchung über eine Sequenzierung abgesehen werden konnte. Nach dem Nachweis über die PCR-Technik erfolgten der direkte Nachweis und die exakte Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichten über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und anschließender Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop.

### 3.3.1.1 Indirekter Nachweis über die MPN-Technik

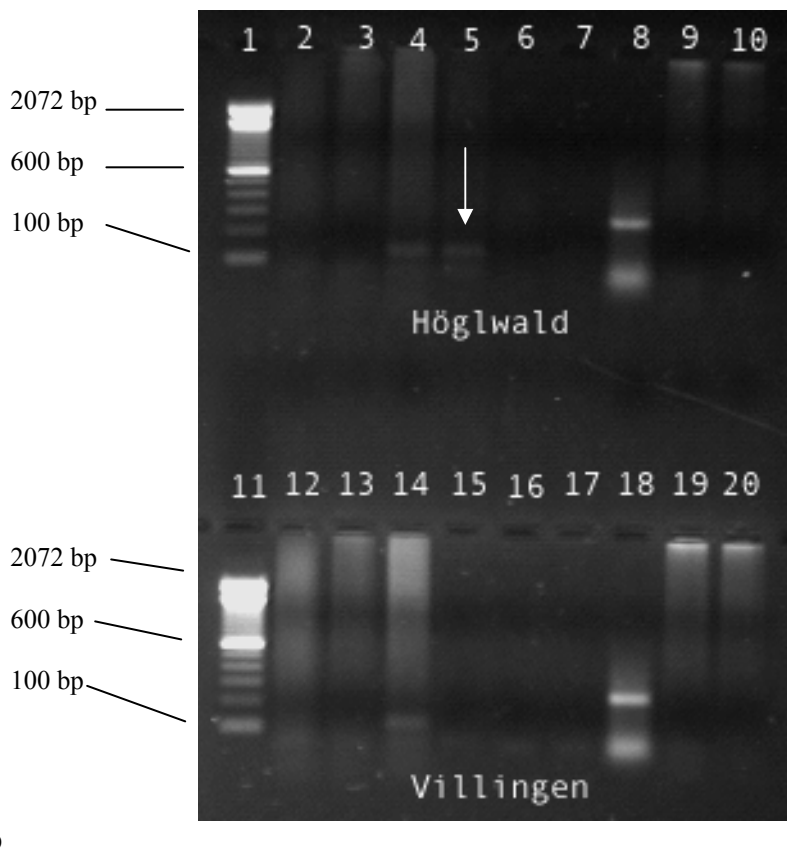
Zum Nachweis der autotrophen Nitrifizierer wurden von den Probenahmen im Herbst und im Frühling eines jeden Probejahres (s. 2.3) jeweils 10 g Nadelmaterial für einen MPN-Ansatz abgewogen und aufgearbeitet. Die Inkubation der MPN-Ansätze erfolgte über insgesamt 8 Wochen, wobei alle 2 Wochen die Kulturröhrchen auf das Vorhandensein der autotrophen Nitrifizierer getestet wurden. Die Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer wurden sowohl auf das Vorkommen von Nitrit als auch auf Nitrat überprüft, da nicht auszuschließen war, daß Nitrit-Oxidierer, welche das durch die Ammoniak-Oxidierer gebildete Nitrit weiter zu Nitrat umsetzten, mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftet waren. Zusätzlich wurden die Nitrit-Oxidierer allein in Kulturröhrchen kultiviert, um diese separat nachweisen zu können. Unmittelbar im Anschluß nach der letzten Auswertung in der 8. Wachstumswoche wurden die Kulturröhrchen abzentrifugiert, die DNA aus den Pellets isoliert und über die PCR-Kontrolle auf die Anwesenheit von Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer getestet. Die Anordnung der repräsentativen Ergebnisse entspricht der Reihenfolge der Probenahme, von Herbst 2000 über den Frühling und Herbst 2001 zum Frühling und Herbst 2002. Zunächst wurden die Fichtennadeln des Herbstes 2000 einer Untersuchung über die MPN-Technik unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.46 a zu sehen.



**Abb. 3.46 a: MPN-Ansatz Herbst 2000 Höglwald / Villingen;** Standort Höglwald (links) zeigt Ammoniak-Oxidierer bis zur 4. Wachstumswoche mit  $1,19 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadel-frischgewicht und Nitrit-Oxidierer mit  $1,19 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht; der Standort Villingen (rechts) zeigt Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $1,1 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht; Ammoniak-Oxidierer wurden nicht gefunden; mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer sind nicht nachweisbar; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer, NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kul-

turröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Im Höglwald-Ansatz wurden in der 2. und 4. Wachstumswoche Ammoniak-Oxidierer (AO 1) in einer Zellzahl von  $1,19 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen. Ab der 6. Wachstumswoche wurden keine Bakterien mehr gefunden. Mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1) konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Nitrit-Oxidierer, solitär kultiviert (NO 1), konnten ab der 4. Wachstumswoche mit einer gleichbleibenden Zellzahl von  $1,19 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert werden. Im Villingen-Ansatz konnten keine Ammoniak-Oxidierer und vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer gefunden werden (AO 2 und NO AO2). Nitrit-Oxidierer hingegen wurden zunächst ab der 4. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von  $2,6 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und im weiteren Verlauf mit einer gleichbleibenden Zellzahl von  $1,1 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen.



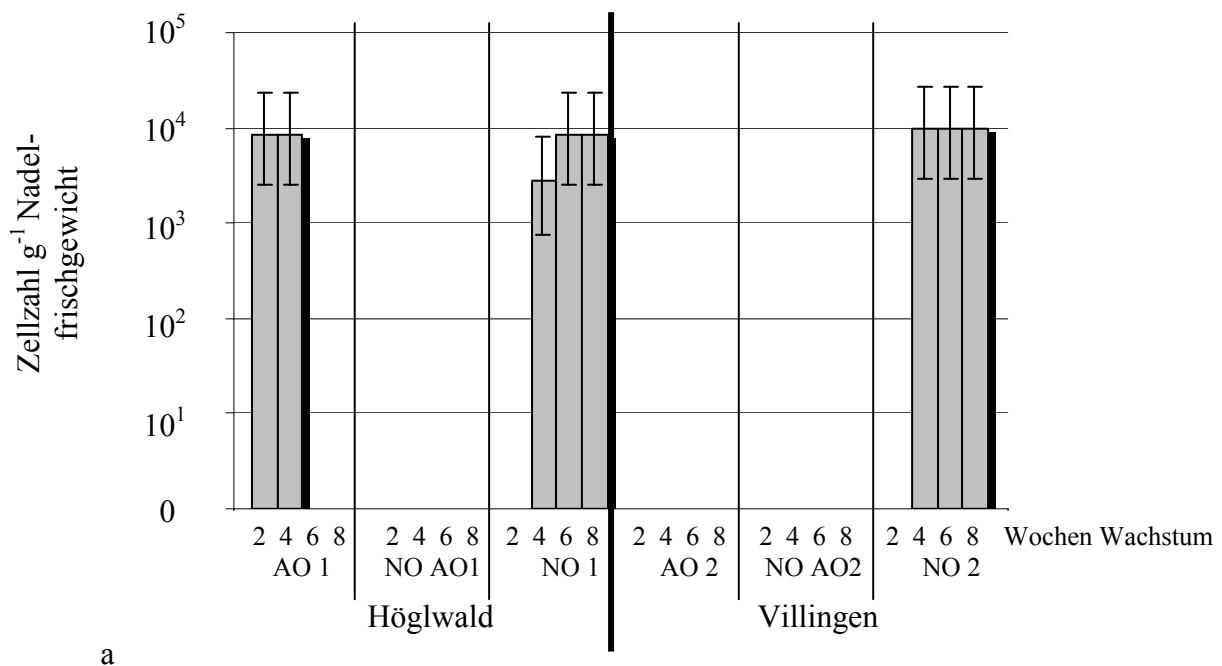
b

**Abb. 3.46 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Herbst 2000;** in Spur 5, Ammoniak-Oxidierer vom Höglwald, ist deutlich eine DNA-Bande (Pfeil) zu erkennen; Nitrit-Oxidierer wurden im Höglwald-Ansatz nicht gefunden; im Villingen-Ansatz waren keine autotrophen Nitrifizierer nachweisbar; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Höglwald Probe AO 1, 6. Höglwald Probe NO AO 1, 7. Höglwald Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard



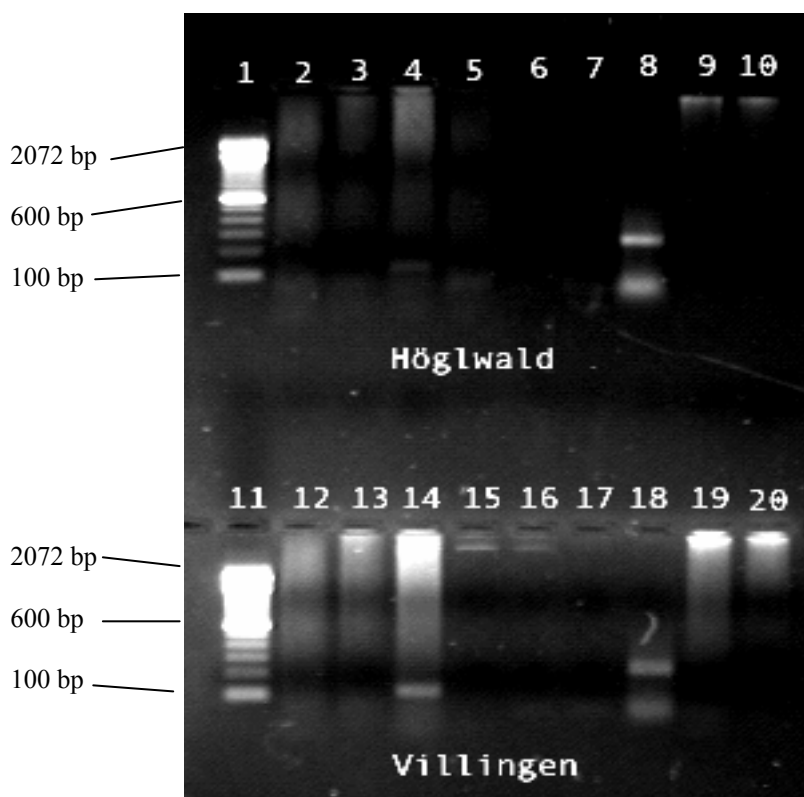
100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Villingen Probe AO 2, 16. Villingen Probe NO AO2, 17. Villingen Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Mit der durchgeführten PCR-Kontrolle (s. Abb. 3.46 b) aus dem MPN-Ansatz Herbst 2000 wurden in der Höglwald-Probe eindeutig Ammoniak-Oxidierer (AO 1) in Spur 5 (Pfeil) nachgewiesen. Nitrit-Oxidierer, mit Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftet (NO AO1), wurden - wie im MPN-Ansatz - nicht nachgewiesen (Spur 6). Auch solitär kultivierte Nitrit-Oxidierer (NO 1) konnten – im Gegensatz zum MPN-Ansatz - nicht in Spur 7 gefunden werden. Im Villingen-Ansatz wurden weder Ammoniak- noch Nitrit-Oxidierer detektiert (Spuren 15 – 17). In den Proben des Herbstes 2000 konnten am Standort Höglwald sowohl Ammoniak-Oxidierer als auch Nitrit-Oxidierer nachgewiesen werden, am Standort Villingen waren hingegen nur Nitrit-Oxidierer zu finden. Die Untersuchungen auf das Vorkommen von autotrophen Nitrifizierern in den Fichtennadelproben des Frühling 2001 sind in Abbildung 3.47 zu sehen.



**Abb. 3.47 a: MPN-Ansatz Frühling 2001 Höglwald / Villingen;** am Standort Höglwald (links) wurden bis zur 4. Wachstumswoche  $8,28 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht für Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer mit ebenfalls  $8,28 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert; der Standort Villingen zeigt hingegen nur Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $9,60 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht; Ammoniak-Oxidierer wurden dort nicht gefunden, ebenso wie mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer an beiden Standorten; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Vorkommen von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Im Ansatz aus dem Höglwald (s. Abb. 3.47 a, links) wurden Ammoniak-Oxidierer (AO 1) in einer Zellzahl von  $8,28 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der 2. und 4. Wachstumswoche nachgewiesen. Ab der 6. Wachstumswoche wurden keine Bakterien mehr gefunden. Mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1) konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Nitrit-Oxidierer (NO 1) konnten ab der 4. Wachstumswoche detektiert werden. Sie erreichten ebenfalls eine Zellzahl von  $8,28 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht. Im Villingen-Ansatz wurden weder Ammoniak-Oxidierer (AO 2) noch mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO2) detektiert. Hingegen waren deutlich Nitrit-Oxidierer (NO 2) ab der 4. Wachstumswoche mit einer konstanten Zellzahl von  $9,60 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachzuweisen.

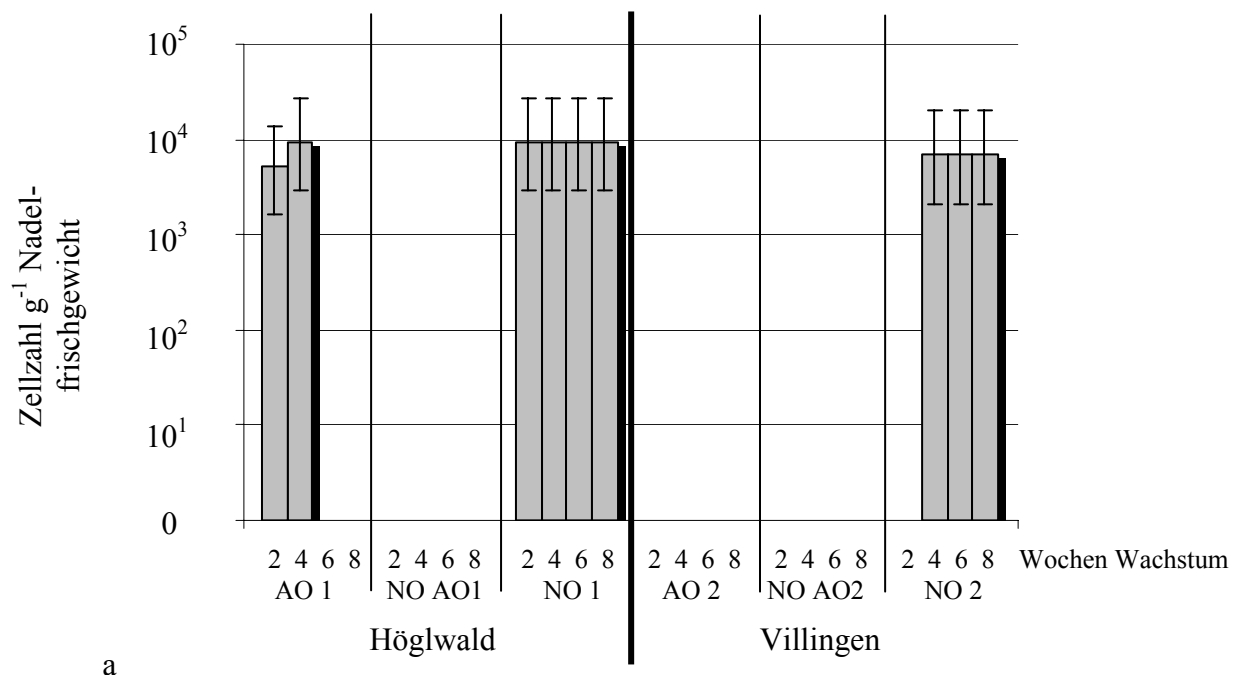


b

**Abb. 3.47 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Frühling 2001;** sowohl im Ansatz mit den Höglwald-Proben (Spuren 5 – 7) als auch im Ansatz mit den Villingen-Proben (Spuren 15 – 16) konnten keine autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen werden; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Höglwald Probe AO 1, 6. Höglwald Probe NO AO 1, 7. Höglwald Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Villingen Probe AO 2, 16. Villingen Probe NO AO2, 17. Villingen Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

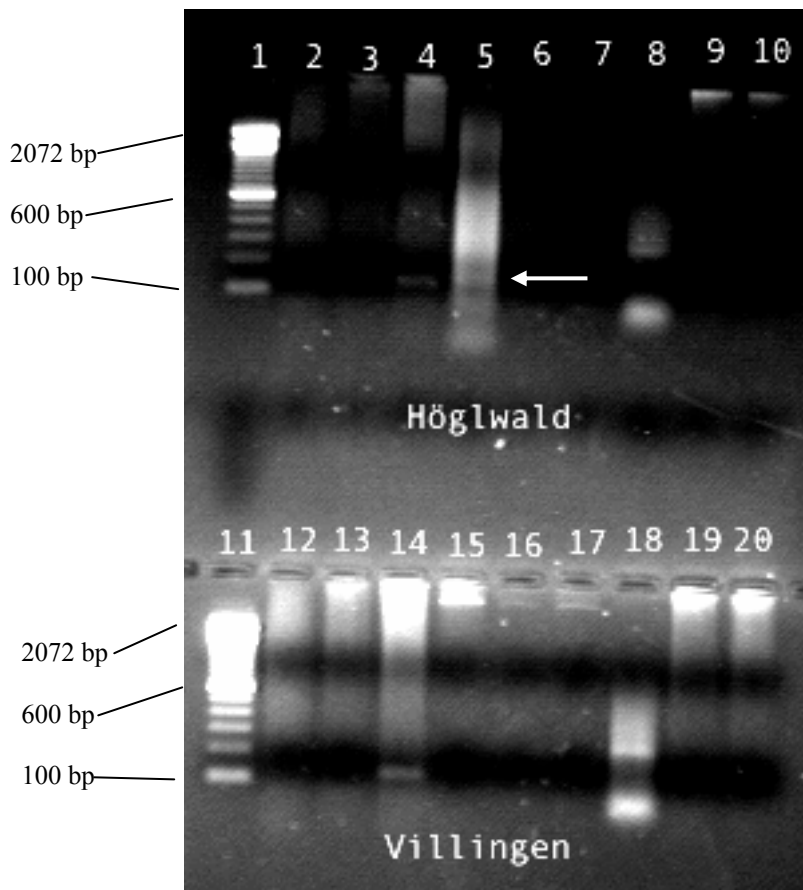
Die Überprüfung des MPN-Ansatzes der Höglwald-Proben Frühling 2001 mit Hilfe der PCR-Technik ergab keine Bestätigung der Ergebnisse aus der Auswertung des MPN-Ansatzes. In den entsprechenden Spuren 5 – 7 konnten - auch im MPN-Ansatz aus Villingen Frühling 2001 (Spur 15 bis 17) - keine für die Ammoniak- bzw. Nitrit-Oxidierer spezifischen 16S rRNA-DNA-Amplifikate gewonnen werden.

Im folgenden MPN-Ansatz sind die Ergebnisse der Probenahme aus dem Herbst 2001 abzulesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.48 a dargestellt. Bereits ab der 2. Wachstumswoche konnten im MPN-Ansatz aus dem Höglwald Ammoniak-Oxidierer (AO 1) mit einer Zellzahl von  $5,35 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden werden. Diese Zellzahl stieg im weiteren Verlauf auf  $9,47 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der 4. Woche an. Danach konnten Ammoniak-Oxidierer nicht mehr nachgewiesen werden. Nitrit-Oxidierer, vergesellschaftet mit den Ammoniak-Oxidierern (NO AO1), wurden nicht detektiert.



**Abb. 3.48 a: MPN-Ansatz Herbst 2001 Höglwald / Villingen;** am Standort Höglwald (links) wurden Ammoniak-Oxidierer bis zur 4. Wachstumswoche mit  $9,47 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und Nitrit-Oxidierer ebenfalls mit  $9,47 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; der Standort Villingen (rechts) zeigt hingegen nur Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $6,98 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht, Ammoniak-Oxidierer wurden dort nicht gefunden; ebensowenig wie mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer an beiden Standorten; AO: Kulturröhren für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhren für Ammoniak-Oxidierer auf Vorkommen von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhren für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Im Höglwald-MPN-Ansatz konnten Nitrit-Oxidierer (NO 1) nachgewiesen werden. Bereits nach der 2. Wachstumswoche waren sie in einer Anzahl von  $9,47 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht anzutreffen. Erwartungsgemäß waren in den MPN-Röhrchen des Ansatzes Villingen keine Ammoniak-Oxidierer (AO 2) aufzuspüren, ebensowenig wie mit ihnen vergesellschafteten Nitrit-Oxidierer (NO AO 2). Die Nitrit-Oxidierer (NO 2) waren in einer Zellzahl von  $6,98 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht anzutreffen.

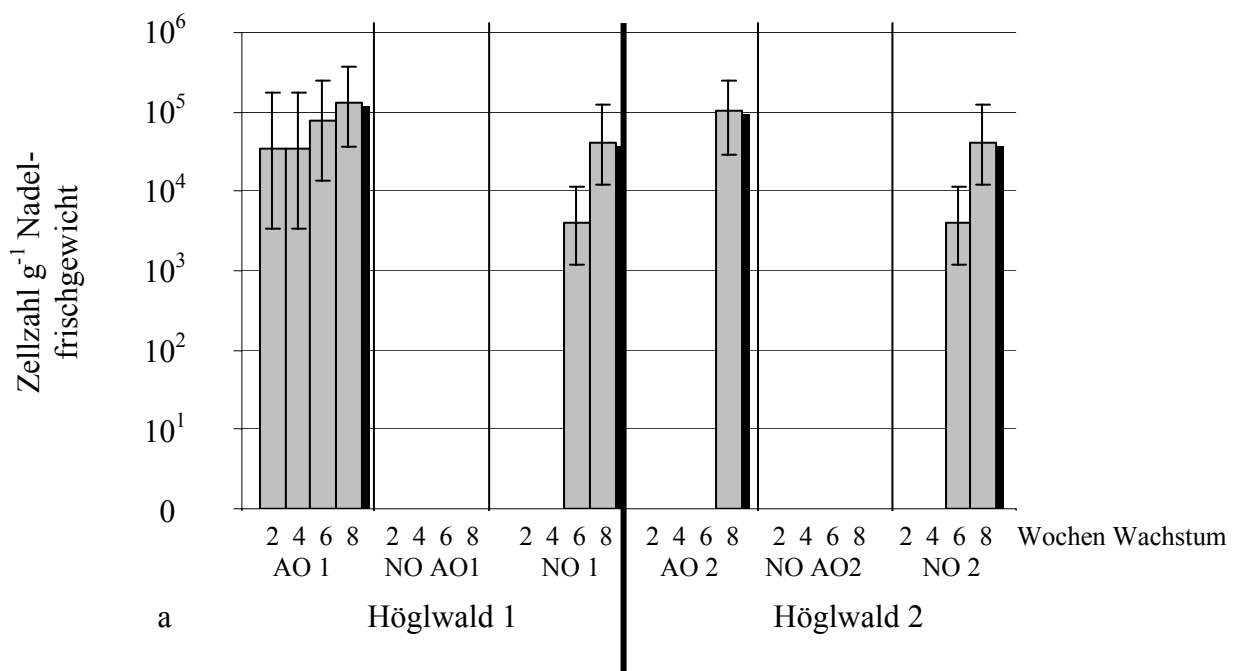


b

**Abb. 3.48 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Herbst 2001;** in Spur 5, welche die Probe der Ammoniak-Oxidierer aus dem MPN-Ansatz Höglwald enthielt, ist eine DNA-Bande (Pfeil) zu erkennen; Nitrit-Oxidierer wurden im Höglwald-Ansatz nicht gefunden; im Villingen-Ansatz waren keine autotrophen Nitrifizierer nachweisbar; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Höglwald Probe AO 1, 6. Höglwald Probe NO AO 1, 7. Höglwald Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Villingen Probe AO 2, 16. Villingen Probe NO AO2, 17. Villingen Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Die PCR-Kontrolle der MPN-Ansätze zeigte, daß im Höglwald-Ansatz die Ammoniak-Oxidierer (AO 1) nachzuweisen waren. In Spur 5 (Pfeil) ist eine schwache Bande trotz der störenden genomischen DNA genau in der Höhe der Positivkontrolle mit *N. europaea* als Ammoniak-Oxidierer (Spur 4) zu erkennen. Nitrit-Oxidierer (Spur 6 und 7) konnten im Gegensatz dazu nicht entdeckt werden. In den Ansätzen aus Villingen (Spur 15 – 17) konnten weder Ammoniak-Oxidierer noch Nitrit-Oxidierer über die PCR-Technik ermittelt werden.

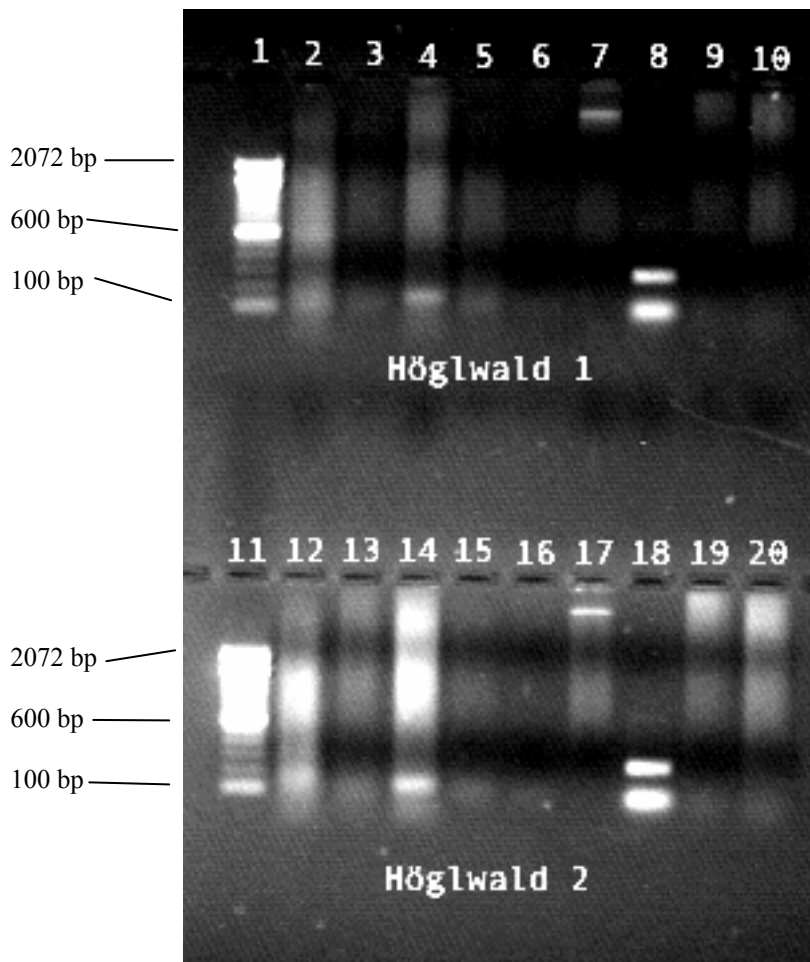
Im Frühling 2002 fand die vierte Probenahme statt, bei der die Nadelproben mit Hilfe eines Baumsteigers aus dem Kronenraum der Fichten in etwa 35 m Höhe entnommen wurden. Es wurden von jedem Probenort Doppelansätze inkubiert. Die Abbildung 3.49 zeigt die Ergebnisse des Doppelansatzes der Proben des Standortes Höglwald.



**Abb. 3.49 a: MPN-Ansatz Frühling 2002 Höglwald;** im ersten Ansatz wurden Ammoniak-Oxidierer (AO 1) mit einer Zahl von  $1,34 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und im zweiten Ansatz (AO 2) mit  $1,05 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert; Nitrit-Oxidierer wurden in beiden Ansätzen (NO 1 und NO 2) mit einer Zellzahl von  $4,13 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen; mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer wurden an beiden Standorten (NO AO1 und NO AO2) nicht gefunden; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Die Auswertung des Doppel-MPN-Ansatzes der Höglwald-Probe ergab, daß sowohl im ersten als auch zweiten Ansatz Ammoniak-Oxidierer enthalten waren. Im ersten Ansatz wurden bereits in der zweiten Wachstumswoche Ammoniak-Oxidierer (AO 1) mit einer Zellzahl von  $3,44 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht ermittelt. Ab der 6. Kultivierungswoche nahm die Zellzahl von

$7,75 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht auf  $1,34 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der 8. Woche zu. Im Vergleich dazu wurden im zweiten Ansatz die Ammoniak-Oxidierer (AO 2) erst in der 8. Wachstumswoche entdeckt. Hierbei erreichten sie bereits die Zahl von  $1,05 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und damit annähernd die Zahl des ersten Ansatzes. Nitrit-Oxidierer konnten in den Röhrcchen zur Kultivierung der Ammoniak-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) in beiden MPN-Ansätzen nicht gefunden werden. In beiden Ansätzen waren Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) ab der 6. Woche der Kultivierung nachzuweisen und konnten sich von anfangs  $3,96 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht auf  $4,13 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der 8. Woche vermehren.

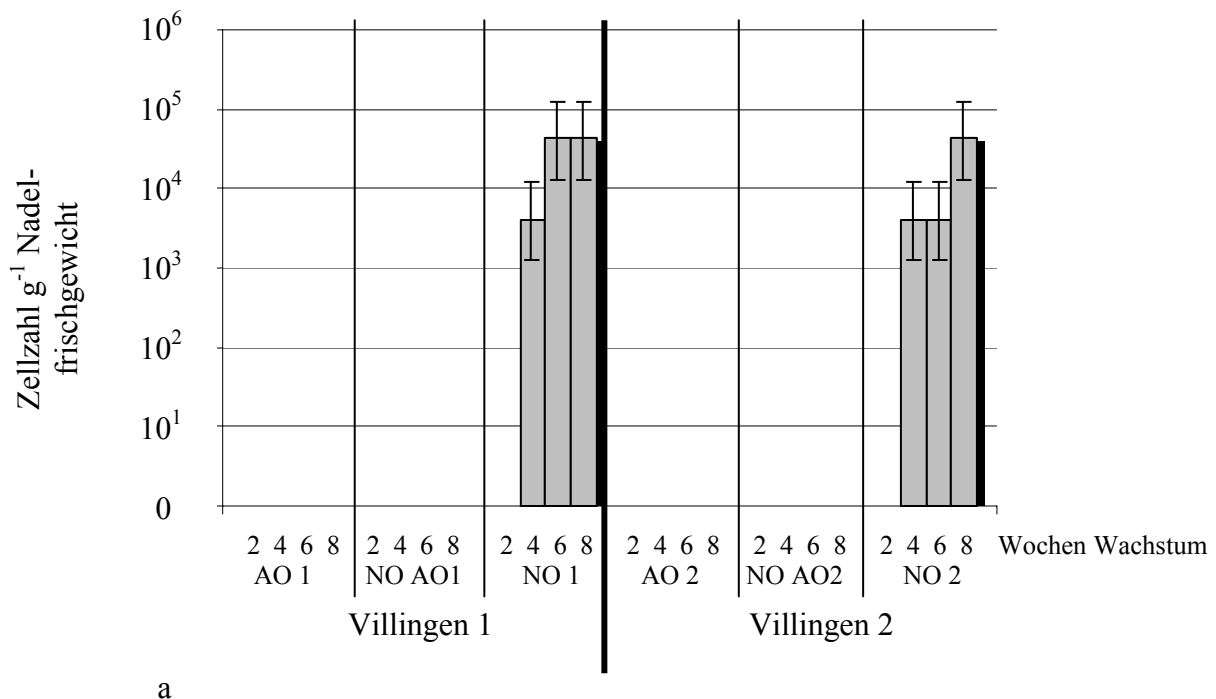


b

**Abb. 3.49 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Frühling 2002 Höglwald;** im Doppelansatz Höglwald wurden keine Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer gefunden; in den entsprechenden Spuren 5 – 7 und 15 – 17 sind keine DNA-Banden zu erkennen; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Höglwald Probe AO 1, 6. Höglwald Probe NO AO 1, 7. Höglwald Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Höglwald Probe AO 2, 16. Höglwald Probe NO AO2, 17. Höglwald Probe NO

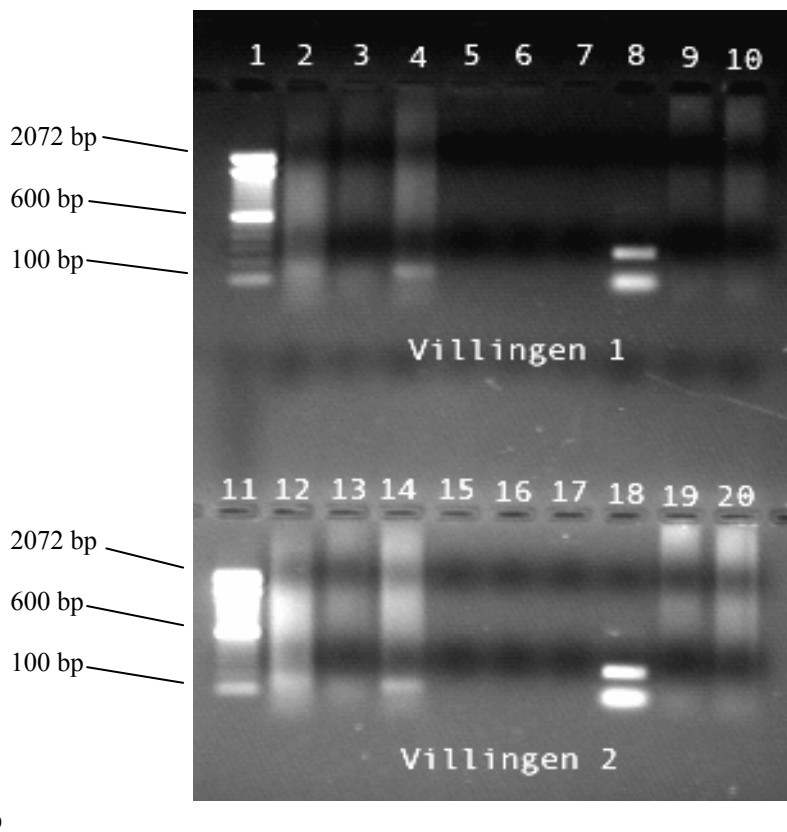
2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Die Ergebnisse des MPN-Doppelansatzes Höglwald Frühling 2002 konnten über die PCR-Kontrolle nicht belegt werden. Weder im Ansatz Höglwald 1 (Spur 5 – 7) noch im Ansatz Höglwald 2 (Spur 15 – 17) sind entsprechende Banden der erwarteten DNA-Amplifikate neben den Positivkontrollen zu erkennen. Die Abbildung 3.50 zeigt die Ergebnisse des Standortes Villingen. Die MPN-Ansätze zeigten keine Anzeichen auf mögliche vorhandene Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2). Auch die mit ihnen vergesellschafteten Nitrit-Oxidierer waren nicht zu entdecken (NO AO1 und NO AO2). Allerdings konnten Nitrit-Oxidierer in den separaten Kulturröhrchen (NO 1 und NO 2) ab der 4. Kultivierungswoche nachgewiesen werden. Die Zellzahlen stiegen von  $4,14 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht im weiteren Wachstumsverlauf auf  $4,32 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an.



**Abb. 3.50 a: MPN-Ansatz Frühling 2002 Villingen;** der Standort Villingen wies nur Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $4,32 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in beiden Ansätzen (NO 1 und NO 2) auf; Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) wurden nicht gefunden; ebensowenig wie in beiden Ansätzen mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2); AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Vorkommen von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Auch bei dem MPN-Doppelansatz Villingen Frühling 2002 konnten über die PCR-Anwendung die Ergebnisse nicht belegt werden (s. Abb. 3.50 b).



b

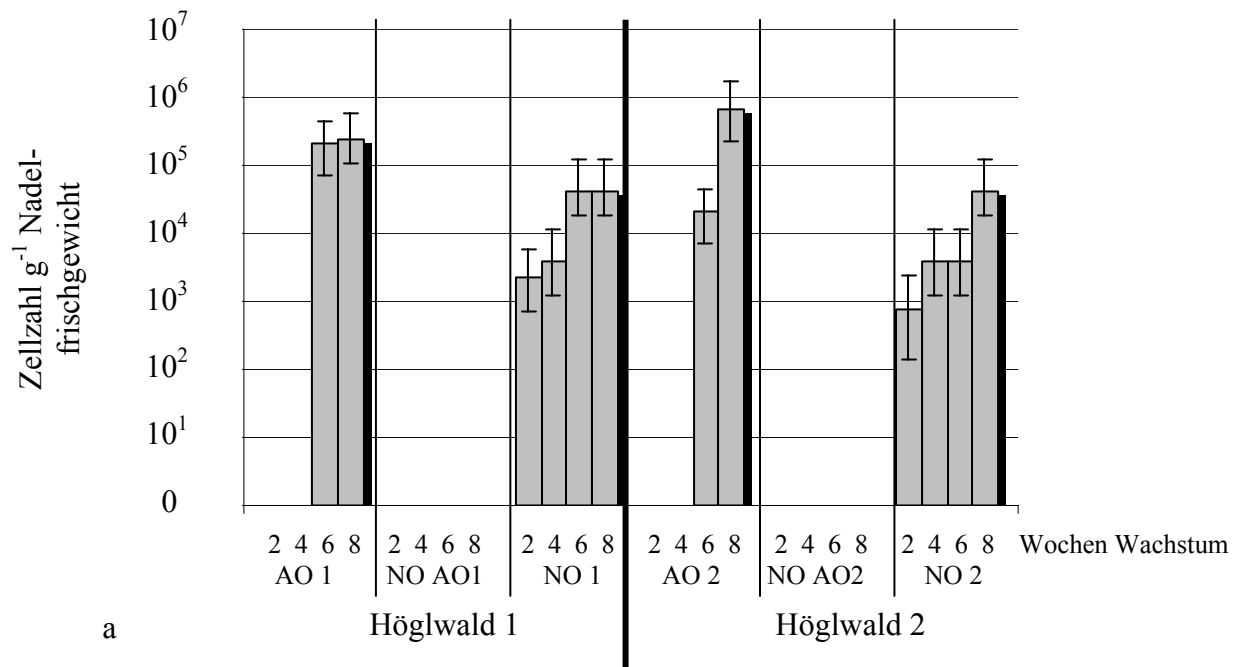
**Abb. 3.50 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Frühling 2002 Villingen;** im Doppelansatz Villingen waren keine autotrophen Nitrifizierer nachweisbar; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Villingen Probe AO 1, 6. Villingen Probe NO AO 1, 7. Villingen Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Villingen Probe AO 2, 16. Villingen Probe NO AO2, 17. Villingen Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Die in den MPN-Ansätzen nachgewiesenen Nitrit-Oxidierer konnten weder im Ansatz Villingen 1 (Spur 7) noch im Ansatz Villingen 2 (Spur 17) anhand entsprechender DNA-Banden der PCR-Amplifikate neben den Positivkontrollen (Spur 8 und 18) nachgewiesen werden.

Die letzte Probenahme fand im Herbst 2002 statt. Auch dieses Mal wurden die Fichtennadelproben mit einem Baumsteiger unmittelbar aus dem oberen Kronenbereich in 35 m Höhe genommen und MPN-Doppelansätze inkubiert. Die Ergebnisse der Probenahme sind in Abbildung 3.51 zu finden. Die Auswertung der MPN-Ansätze aus dem Herbst 2002 ergaben, daß in den Höglwald-Proben Ammoniak-Oxidierer nachgewiesen werden konnten. Im ersten Teilansatz (AO 1) erreichten sie nach 8 Wochen Wachstum eine Zellzahl von  $2,42 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht, während sie im 2. Teilansatz (AO 2) eine geringfügig höhere Anzahl von  $6,59 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht erzielten. In denselben MPN-Röhrchen, in welchen die Ammoniak-Oxidierer kultiviert wurden, konnten weder im Ansatz Höglwald 1 noch in Höglwald 2



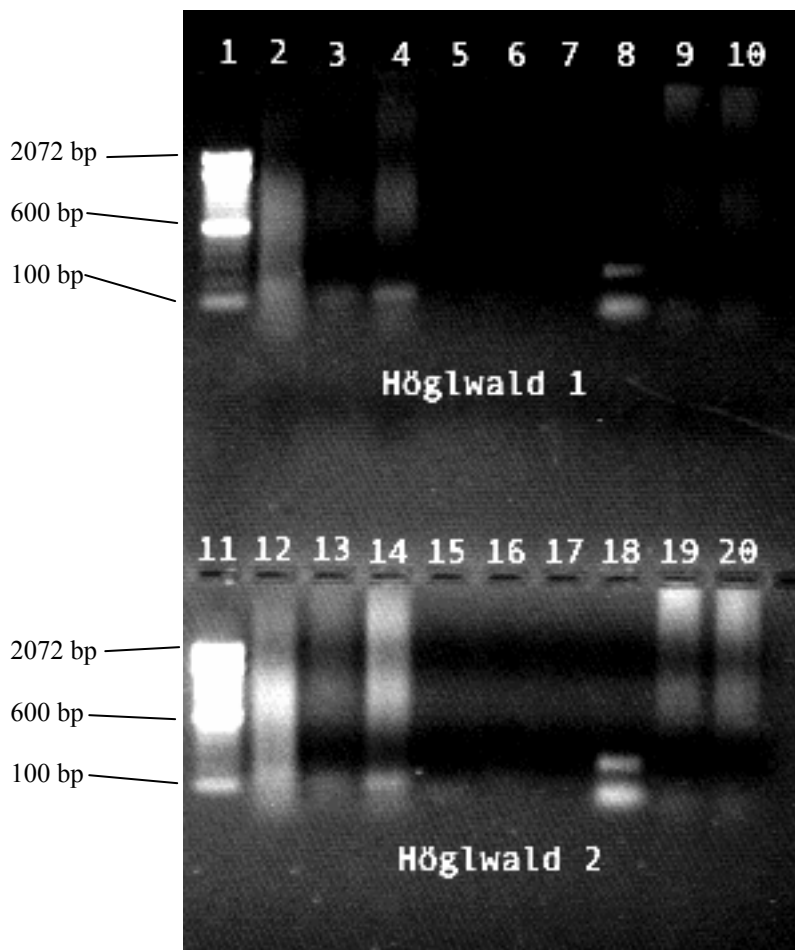
Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) gefunden werden. Die Suche nach Nitrit-Oxidierern in MPN-Röhrchen ergab, daß Nitrit-Oxidierer mit einer Zahl von  $4,16 \times 10^4$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht für Ansatz 1 (NO 1) und ebenso  $4,16 \times 10^4$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht in Ansatz 2 (NO 2) nachzuweisen waren.



**Abb. 3.51 a: MPN-Ansatz Herbst 2002 Höglwald;** im ersten Ansatz wurden Ammoniak-Oxidierer (AO 1) mit  $2,42 \times 10^5$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht, im zweiten Ansatz (AO 2) mit  $6,59 \times 10^5$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; Nitrit-Oxidierer wurden in beiden Höglwald-Ansätzen mit einer Zellzahl von  $4,16 \times 10^4$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen; mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) konnten in beiden Ansätzen nicht detektiert werden; AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Im Anschluß an die MPN-Auswertung erfolgte die Kontrolle der nachgewiesenen Nitrifizierer-Zellen mittels der PCR-Technik (s. Abb. 3.51 b). Hierbei konnten jedoch die Ergebnisse aus den MPN-Ansätzen nicht bestätigt werden. Weder im Teilansatz Höglwald 1 (Spur 5 – 7) noch im Teilansatz Höglwald 2 (Spur 15 – 17) konnten DNA-Banden der PCR-Amplifikate entsprechend der Postitivkontrollen (Spur 4 und 14 für Ammoniak-Oxidierer, Spur 8 und 18 für die Nitrit-Oxidierer) im Agarose-Gel nachgewiesen werden.

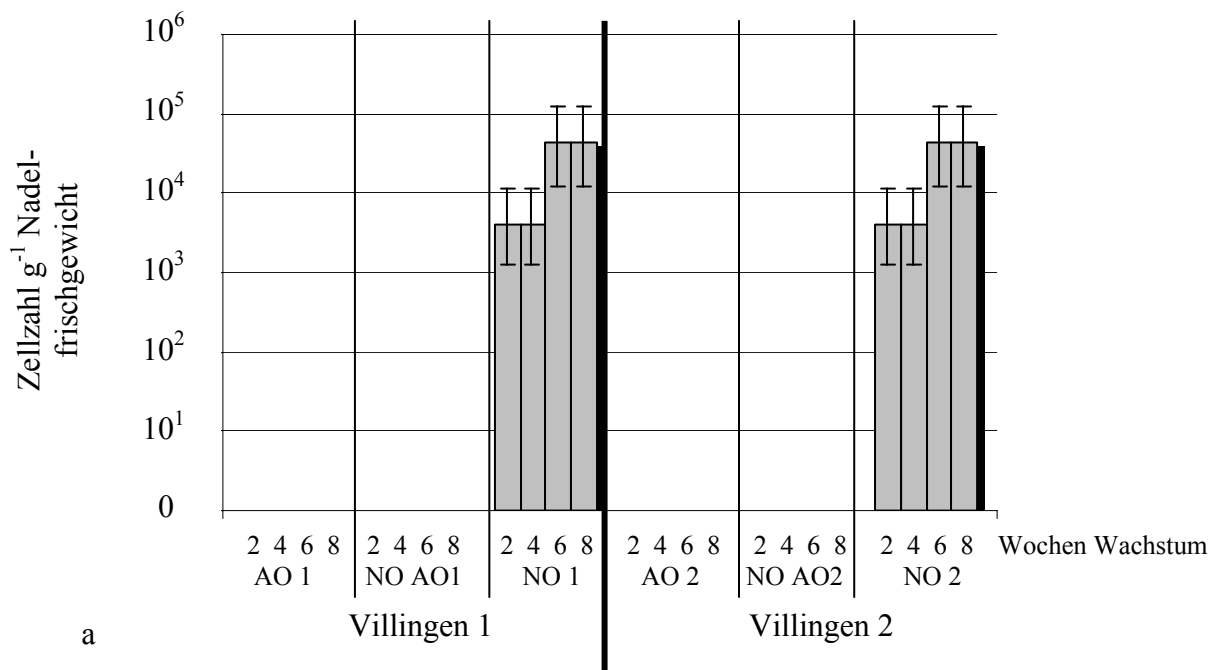
Das Ergebnis der MPN-Auswertung der Villingen-Proben zeigt in Abbildung 3.52. Es waren keine Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) in den Proben zu finden.



b

**Abb. 3.51 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Herbst 2002 Höglwald;** im Doppelsatz wurden keine autotrophen Nitrifizierer aus den Fichtennadelproben des Höglwaldes nachgewiesen; in den Spuren 5 – 7 und 15 – 17, welche die entsprechenden Proben enthielten, waren keine DNA-Banden zu entdecken; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Höglwald Probe AO 1, 6. Höglwald Probe NO AO 1, 7. Höglwald Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Höglwald Probe AO 2, 16. Höglwald Probe NO AO2, 17. Höglwald Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

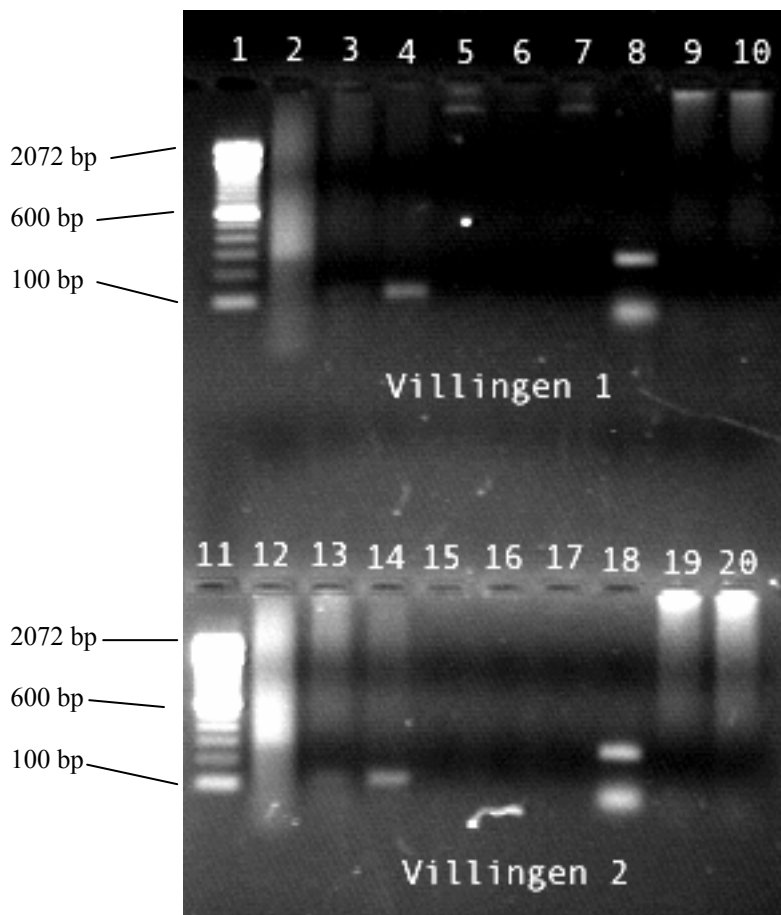
In den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierern konnten keine mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) entdeckt werden. Hingegen wurden in den Kulturröhrchen, die speziell für den Nachweis von Nitrit-Oxidierern angesetzt wurden (NO 1 und NO 2), diese mit den Zellzahlen von  $4,24 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in Ansatz Villingen 1 (NO 1) bzw.  $4,24 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in Ansatz Villingen 2 (NO 2) detektiert.



**Abb. 3.52 a: MPN-Ansatz Herbst 2002 Villingen;** am Standort Villingen wurden in beiden Teilansätzen (NO 1 und NO 2) Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $4,24 \times 10^4$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert; Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) wurden dort nicht gefunden, ebensowenig wie mit Ammoniak-Oxidierer vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2); AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen für Ammoniak-Oxidierer auf Vorkommen von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Nach der letzten Auswertung des MPN-Doppelansatzes erfolgte die Kontrolle auf vorhandene Nitrifizierer-Zellen mittels der PCR-Technik (s. Abb. 3.52 b, S. 150). Die Ergebnisse aus den MPN-Ansätzen konnten nicht bestätigt werden. Die in den MPN-Ansätzen nachgewiesenen Nitrit-Oxidierer konnten weder im Ansatz Villingen 1 (Spur 7) noch im Ansatz Villingen 2 (Spur 17) anhand entsprechender Banden der PCR-Amplifikate neben den Positivkontrollen (Spur 8 bzw. 18) nachgewiesen werden.

Eine Zusammenfassung und einen Überblick über die Ergebnisse der MPN-Versuchsreihen mit den entsprechenden PCR-Kontrollen zum direkten Nachweis der autotrophen Nitrifizierer aus den MPN-Kulturröhrchen gibt Tabelle 3.6 (s. S. 151). Wie aus der Übersichtstabelle zu entnehmen ist, konnten in den Fichtennadelproben des Standortes Höglwald in allen MPN-Ansätzen zu allen Probenahmezeitpunkten sowohl Ammoniak-Oxidierer als auch Nitrit-Oxidierer eindeutig nachgewiesen werden. An den Zahlen kann man ferner erkennen, daß bei den Probenahmen in den Jahren 2000 und 2001, in denen die Fichtennadelproben aus dem Kronenbereich der Höhe von 2 – 10 m genommen wurden, die Zellzahlen bei den Ammoniak-Oxidierern im Bereich zwischen  $8,28 \times 10^3$  und  $1,19 \times 10^4$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht liegen.



b

**Abb. 3.52 b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Herbst 2002 Villingen;** autotrophe Nitrifizierer wurden im Doppelansatz nicht nachgewiesen; in den Spuren 5 – 7 und 15 – 17, welche die isolierte DNA aus den MPN-Kulturröhrchen der jeweiligen Teilansätze enthielten, sind keine DNA-Banden im Agarose-Gel zu finden; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Villingen Probe AO 1, 6. Villingen Probe NO AO 1, 7. Villingen Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Villingen Probe AO 2, 16. Villingen Probe NO AO2, 17. Villingen Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Die Probenahmen im Jahr 2002 aus dem oberen Kronenbereich der Fichten aus einer Höhe von etwa 35 m zeigt hingegen Zellzahlen, die um eine Potenzstufe höher liegen und bis zu  $6,59 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht erreichten. Bei den Nitrit-Oxidierern war in den Höglwald-Proben dieselbe Entwicklung festzustellen, wenngleich die Zellzahlen im Jahr 2002 aus der oberen Fichtenkrone sich nicht ganz so deutlich von den Zellzahlen der Vorjahre unterschieden. Sie erreichten eine Größe von  $4,32 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht. Aus den Kulturröhrchen des MPN-Ansatzes aus dem Höglwald Herbst 2000 konnten die Ammoniak-Oxidierer nicht nur über den chemischen Nitrit-Nachweis detektiert werden, sondern gleichzeitig direkt

durch die PCR-Kontrolle über ein DNA-Amplifikat, das als DNA-Bande im Agarose-Gel (s. Abb. 3.46 b) deutlich zu erkennen ist.

**Tab. 3.6: Überblick über die Zellzahlen der MPN-Ansätzen und die PCR-Kontrollen;** die Zahlen geben die höchste ermittelte Zellzahl  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht des jeweiligen Probenahmezeitpunktes an; AO: Ammoniak-Oxidierer; PCR AO: PCR-Kontrolle der Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO: Nitrit-Oxidierer; PCR NO: PCR-Kontrolle der Kulturröhrchen der Nitrit-Oxidierer; +: erfolgreich verlaufene PCR-Kontrolle; -: negativ verlaufene PCR-Kontrolle

Zeitpunkt der Probenahme	Höglwald				Villingen			
	MPN AO	PCR AO	MPN NO	PCR NO	MPN AO	PCR AO	MPN NO	PCR NO
Herbst 2000	$1,19 \times 10^4$	+	$1,19 \times 10^4$	-	-	-	$1,10 \times 10^4$	-
Frühling 2001	$8,28 \times 10^3$	-	$8,28 \times 10^3$	-	-	-	$9,60 \times 10^3$	-
Herbst 2001	$9,47 \times 10^3$	+	$9,47 \times 10^3$	-	-	-	$6,98 \times 10^3$	-
Frühling 2002	$1,34 \times 10^5$	-	$4,13 \times 10^4$	-	-	-	$4,32 \times 10^4$	-
Herbst 2002	$6,59 \times 10^5$	-	$4,16 \times 10^4$	-	-	-	$4,24 \times 10^4$	-

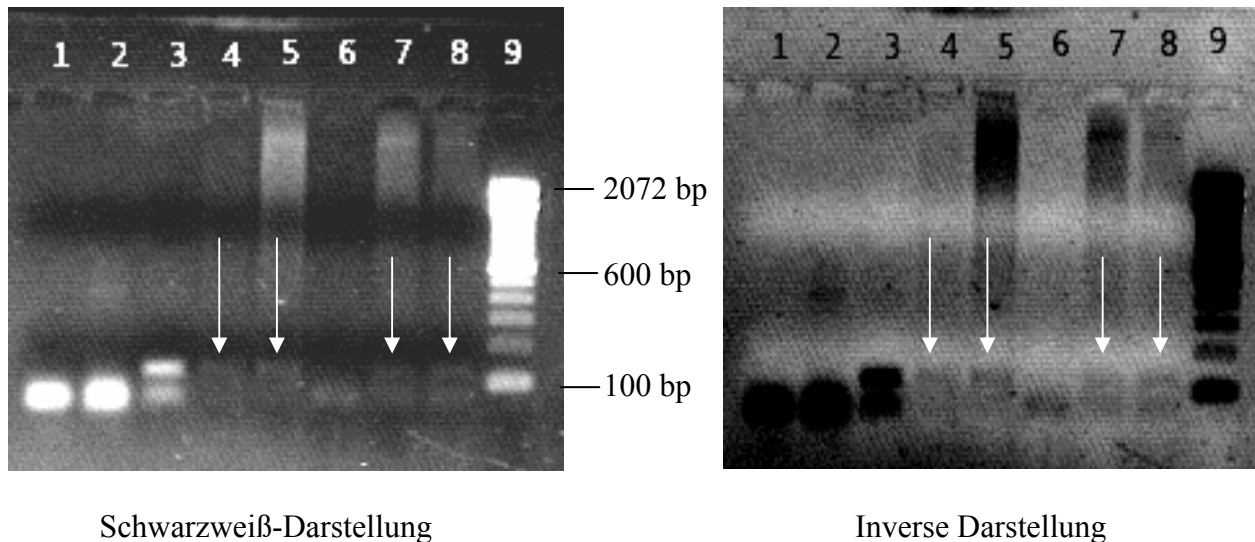
Auch aus dem MPN-Ansatz mit den Proben vom Höglwald im Herbst 2001 konnten neben dem chemischen Nitrit-Nachweis Ammoniak-Oxidierern direkt über eine DNA-Bande im Agarose-Gel aufgespürt werden. Alle übrigen Kontrollen aus den MPN-Ansätzen über die PCR-Technik erbrachten keinen direkten Nachweis der Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer in den Proben des Standortes Höglwald. In den Fichtennadelproben des Standortes Villingen konnten weder über den chemischen Nitrit-Nachweis noch über die PCR-Kontrolle Ammoniak-Oxidierer nachgewiesen werden. Hingegen wurden Nitrit-Oxidierer über den chemischen Nachweis von Nitrat in den MPN-Kulturröhrchen nachgewiesen. Die Zahlen liegen zwischen  $6,98 \times 10^3$  und  $1,10 \times 10^4$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht und bewegen sich damit im selben Bereich wie die Zahlen der Nitrit-Oxidierer aus dem Höglwald. Ein direkter Nachweis über die PCR-Methode gelang nicht.

Somit bleibt festzuhalten, daß in den Fichtennadelproben aus dem Höglwald autotrophe Ammoniak-Oxidierer sowohl indirekt über die MPN-Technik als auch z.T. direkt über die PCR-Technik aus den MPN-Kulturröhrchen nachgewiesen werden konnten. Die Zellzahlen erreichten dabei in den unteren Kronenbereichen der Fichten Zellzahlen bis zu  $1 \times 10^4$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht, während im oberen Kronenbereich die Zellzahlen signifikant um eine Potenzstufe höher und bei bis zu  $6,59 \times 10^5$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht lagen. Ebenso eindeutig konnten Nitrit-Oxidierer über den chemischen Nitrat-Nachweis gefunden werden. Die direkten Nachweise der Zellen der Nitrit-Oxidierer über die PCR-Kontrolle aus den MPN-Kulturröhrchen verliefen negativ.

In den Fichtennadelproben des Standortes Villingen wurden zu keinem Probenahmezeitpunkt Ammoniak-Oxidierer gefunden. Der direkte PCR-Nachweis der Ammoniak-Oxidierer aus den Kulturröhrchen der MPN-Ansätze verlief negativ. Nitrit-Oxidierer traten mit einer Zellzahl von bis zu  $4,32 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht auf, konnten jedoch nur über den chemischen Nitrat-Nachweis detektiert werden und nicht über die PCR-Technik.

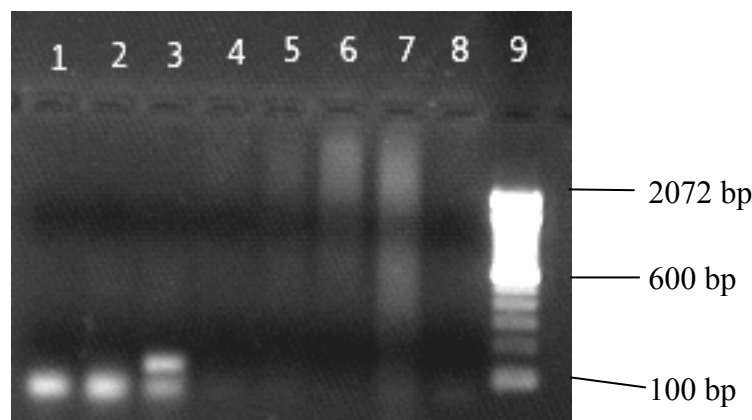
#### 3.3.1.2 Direkter Nachweis in den Fichtennadelproben

Nach dem indirekten Nachweis der autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben des Standortes Höglwald und der Nitrit-Oxidierer in den Proben des Standortes Villingen über die MPN-Technik wurde ein direkter Nachweis der Nitrifizierer mit der DNA, die unmittelbar aus den Fichtennadeln der Standorte isoliert worden ist, über die PCR-Technik geführt. Zu diesem Zweck wurden aus jeweils 1 g Fichtennadelmaterial eines jeden Probenahmezeitpunktes und je Standort die genomische DNA aus den Fichtennadeln isoliert und mit den für die Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotide ein PCR-Ansatz zusammenpipettiert. Zunächst wurden die Nadelproben auf die Anwesenheit von Ammoniak-Oxidierer untersucht. Es folgte die Überprüfung der Fichtennadeln auf das Vorkommen der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*, wobei zunächst das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r und im Anschluß daran das aus der Literatur gewählte Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' verwendet wurden. Die PCR-Ergebnisse zum Nachweis der Ammoniak-Oxidierer aus den Fichtennadelproben des Höglwaldes sind in Abbildung 3.53 zu sehen. Um die schwachen DNA-Bandensignale auswerten zu können, liegt das Bild des Agarose-Gels einmal in normaler Schwarzweiß-Darstellung und ein weiteres Mal als inverses Bild vor. In Abbildung 3.53 kann man deutlich die schwachen DNA-Banden der PCR-Amplifikate für die Ammoniak-Oxidierer aus den Fichtennadelproben des Standortes Höglwald erkennen. Die DNA-Banden der Proben Herbst 2000 (Spur 4), Frühling 2001 (Spur 5), Frühling 2002 (Spur 7) und Herbst 2002 (Spur 8) lagen auf gleicher Höhe wie das PCR-Amplifikat des als Positivkontrolle dienenden Ammoniak-Oxidierer *N. europaea*. In der Spur 6, Probe Herbst 2001, war keine DNA-Bande zu erkennen. Auch bei der inversen Darstellung des Agarose-Gel-Bildes waren diese Banden deutlich zu sehen (s. Pfeile). Damit konnte klar gezeigt werden, daß in den Fichtennadelproben aus dem Höglwald Ammoniak-Oxidierer zu finden waren und diese über die PCR-Technik auch direkt nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 3.53: PCR-Ergebnisse Ammoniak-Oxidierer in Höglwald-Nadeln;** die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt eine Länge von 116 Basenpaaren (bp); sowohl das Amplifikat aus *N. europaea* (Spur 3) als auch die Amplifikate aus den Höglwald-Proben (Spuren 4 – 8, Pfeile) lagen im Agarose-Gel knapp über der 100 bp-Markierung; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 4. Höglwald Herbst 2000, 5. Höglwald Frühling 2001, 6. Höglwald Herbst 2001, 7. Höglwald Frühling 2002, 8. Höglwald Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

Auch die Fichtennadelproben aus Villingen wurden dieser direkten Überprüfung durch die PCR-Technik unterzogen. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 3.54 zu entnehmen.

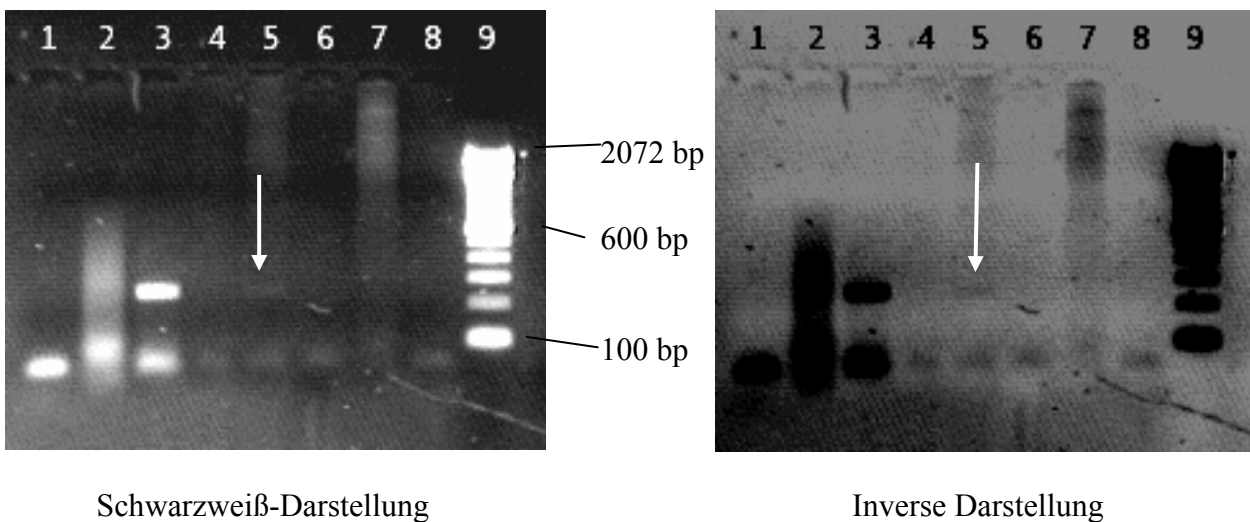


**Abb. 3.54: PCR-Ergebnisse Ammoniak-Oxidierer in Villingen-Nadeln;** nur das PCR-Amplifikat aus *N. europaea* (Spur 3) war im Agarose-Gel knapp über der Markierung für die Länge von 100 bp klar zu erkennen; die Spuren 4 bis 8, welche die DNA aus den Fichtennadelproben aus Villingen enthielten, zeigten keine DNA-Banden; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 4. Villingen Herbst 2000, 5. Villingen Frühling 2001, 6. Villingen Herbst 2001, 7. Villingen Frühling 2002, 8. Villingen Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

Im Agarose-Gel-Bild waren in den Spuren 4 – 8, welche die DNA-Proben aus den Fichtennadeln aus Villingen enthalten, keine DNA-Banden in Höhe der Positivkontrolle (Spur 3) mit der

DNA aus *N. europaea* zu finden. In den Fichtennadelproben aus Villingen waren keine Ammoniak-oxidierenden Bakterien vorhanden.

In der nächsten Versuchsreihe wurden die Fichtennadelproben auf das Vorkommen von Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* untersucht. Im ersten Versuch wurde dabei das neu ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r für die PCR-Reaktionen verwendet. Das PCR-Ergebnis der Fichtennadelproben aus dem Höglwald ist aus Abbildung 3.55 zu entnehmen. Auch in diesem Fall wurde zur leichteren Auswertung der schwachen DNA-Signale der PCR-Amplifikate eine inverse Bilddarstellung des Agarose-Gel-Bildes gewählt. In Spur 3 ist die DNA-Bande des als Positivkontrolle verwendeten Nitrit-Oxidierers *N. winogradskyi* zu erkennen. Diese Bande hat eine Größe von 236 Base. Während in den Spuren 4, 6, 7 und 8 keine DNA-Banden in dieser Höhe des Agarose-Gels zu erkennen waren und damit die Fichtennadelproben keine Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* enthielten, war in Spur 5 eine schwache DNA-Bande zu finden (Pfeil). In der Probe Frühling 2001 aus dem Höglwald waren somit Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* anwesend.

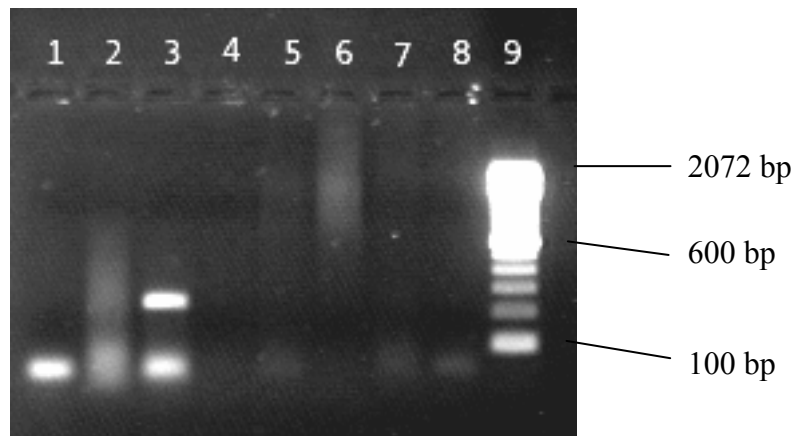


**Abb. 3.55: PCR-Ergebnisse Nitrit-Oxidierer in Höglwald-Nadeln mit Nw f und Nw r;** die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt eine Länge von 236 Basenpaaren (bp); sowohl das Amplifikat aus *N. winogradskyi* (Spur 3) als auch das Amplifikat aus der Höglwald-Probe Frühling 2001 (Spur 5) lagen im Agarose-Gel knapp über der 200 bp-Markierung; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 4. Höglwald Herbst 2000, 5. Höglwald Frühling 2001, 6. Höglwald Herbst 2001, 7. Höglwald Frühling 2002, 8. Höglwald Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

Die PCR-Ergebnisse auf Überprüfung der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* aus den Fichtennadelproben vom Standort Villingen sind in Abbildung 3.56 zu sehen. Wie man an den Spuren 4 – 8 erkennen konnte, fehlten im Vergleich zur Positivkontrolle (Spur 3) von *N. winogradskyi* die DNA-Amplifikate zum Nachweis von Nitrit-Oxidierer in diesen Spuren völlig.

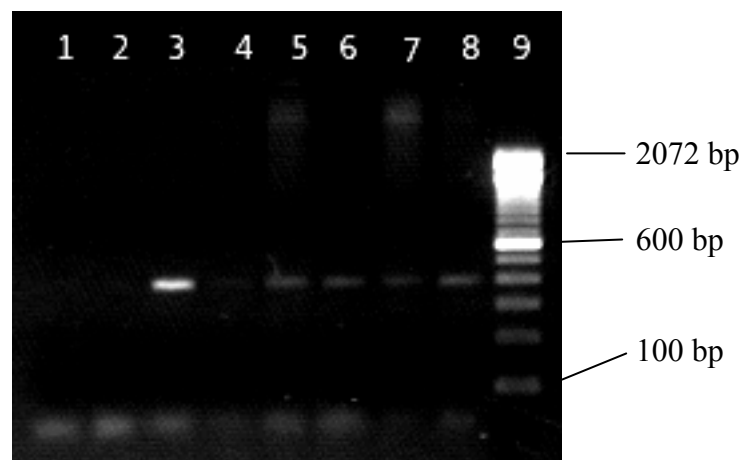


Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* waren in den Fichtennadelproben aus dem Standort Villingen nicht vorhanden.



**Abb. 3.56: PCR-Ergebnisse Nitrit-Oxidierer aus Villingen mit Nw f und Nw r;** nur das Amplifikat aus *N. winogradskyi* (Spur 3) war im Agarose-Gel knapp über der 200 bp-Markierung zu erkennen; die Spuren 4 bis 8, welche die DNA aus den Fichtennadelproben aus Villingen enthielten, zeigten keine DNA-Banden; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 4. Villingen Herbst 2000, 5. Villingen Frühling 2001, 6. Villingen Herbst 2001, 7. Villingen Frühling 2002, 8. Villingen Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

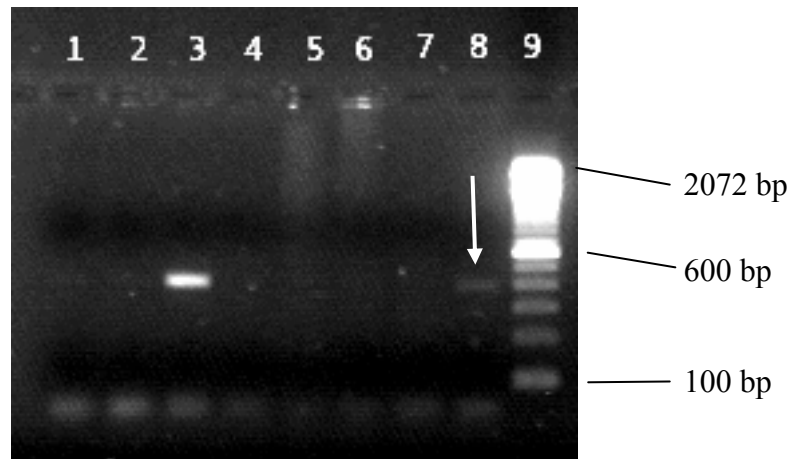
Nachdem die PCR-Anwendung zum Test der Fichtennadelproben auf das Vorkommen von Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* mit dem neu ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r nur ein positives Signal im Agarose-Gel zeigten, wurden dieselben Fichtennadelproben mit dem aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' durchgeführt. In der Abbildung 3.57 sind die PCR-Kontrollen mit den Proben aus dem Höglwald dargestellt.



**Abb. 3.57: PCR-Ergebnisse Nitrit-Oxidierer in Höglwald-Nadeln mit FGPS872 und FGPS 1269';** die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt eine Länge von 397 Basenpaaren (bp); sowohl das PCR-Amplifikat aus *N. winogradskyi* (Spur 3) als auch die PCR-Amplifikate aus den Höglwald-Proben in den Spuren 4 – 8 lagen im Agarose-Gel fast

auf derselben Höhe der 400 bp-Markierung; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 4. Höglwald Herbst 2000, 5. Höglwald Frühling 2001, 6. Höglwald Herbst 2001, 7. Höglwald Frühling 2002, 8. Höglwald Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

Nach den Fichtennadelproben vom Höglwald wurden im Anschluß wiederum die Fichtennadeln vom Standort Villingen der entsprechenden PCR-Kontrolle unterzogen. Das Ergebnis der PCR-Kontrolle mit dem Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' ist in Abbildung 3.58 zu finden.



**Abb. 3.58: PCR-Ergebnisse Nitrit-Oxidierer in Villingen-Nadeln mit FGPS872 und FGPS1269'**; das Amplifikat aus *N. winogradskyi* (Spur 3) war im Agarose-Gel knapp über der 400 bp-Markierung zu erkennen; die Spuren 4 bis 7, welche die DNA aus den Fichtennadelproben aus Villingen enthielten, zeigten keine DNA-Banden; hingegen ist in Spur 8, der Probe aus Villingen Herbst 2002, eine schwache DNA-Bande im Bereich um 400 bp deutlich zu erkennen; Spuren: 1. Negativkontrolle ohne DNA, 2. Negativkontrolle mit *E. coli*, 3. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 4. Villingen Herbst 2000, 5. Villingen Frühling 2001, 6. Villingen Herbst 2001, 7. Villingen Frühling 2002, 8. Villingen Herbst 2002, 9. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter

Die amplifizierte DNA-Sequenz besaß eine Länge von 397 Basenpaaren. In Spur 8, Villingen Herbst 2002, war sehr schwach eine Bande zu erkennen. Das Amplifikat aus *N. winogradskyi* (Spur 3) als auch die Bande in der Spur 8 lagen im Agarose-Gel genau neben der 400 bp-Markierung. Der Vergleich der PCR-Amplifikate aus der Villingen-Probe mit *N. winogradskyi* zeigte, daß die Villingen-Probe sowohl der Länge als auch der Lage nach im Agarose-Gel dem PCR-Amplifikat aus *N. winogradskyi* entsprach. Im Herbst 2002 konnte über die PCR-Technik in den Fichtennadeln aus Villingen Nitrit-Oxidierer detektiert werden, die vermutlich auf die Kalkung des Standortes im Sommer 2002 zurückzuführen sein dürfte. In den anderen Spuren waren keine DNA-Banden zu finden. In den Fichtennadelproben aus Villingen waren also bis zum Herbst 2002 keine Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* zu finden.

Der direkte Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über die PCR-Technik aus dem Fichtennadelmaterial der Standorte Höglwald und Villingen hatte ergeben, daß Ammoniak-Oxidierer nur im Fichtennadelmaterial vom Höglwald zu finden waren, während im Fichtennadelmaterial von Villingen das Ergebnis negativ blieb. Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* konnten mit dem neu ausgewählten Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r nur in der Probe Höglwald Frühling 2001 detektiert werden, in den Proben aus Villingen überhaupt nicht. Hingegen verlief der Nachweis der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* über das Oligodesoxynukleotid-Paar FGPS872 und FGPS1269' im Nadelmaterial aus dem Standort Höglwald eindeutig positiv und in den Probe aus Villingen negativ.

Der Nachweis der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* war auf Grund der speziell ausgesuchten Oligodesoxynukleotide so spezifisch, daß von einer genaueren Untersuchung der PCR-Amplifikate über eine Sequenzierung abgesehen wurde. Der Nachweis der Ammoniak-Oxidierer erfolgte mit Oligodesoxynukleotide, welche Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -*Proteobacteria* detektieren, d.h. vor allem die Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrospira*. Um die in den Höglwald-Proben über die PCR-Technik aufgespürten Ammoniak-Oxidierer einer dieser beiden Gattungen näher zuordnen zu können, wurden im Anschluß mit allen Höglwald-Proben Klonierungen durchgeführt, die so erhaltenen DNA-Sequenzen sequenziert und ein Gendatenbank-Abgleich durchgeführt. In Abbildung 3.59 ist der Sequenzvergleich der aus der Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenzen mit den aus den Gendatenbanken erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen der Ammoniak-Oxidierer *Nitrosomonas europaea* C31 und verschiedenen *Nitrospira multiformis*-Stämmen dargestellt. Aus dem Vergleich konnte man ersehen, daß die DNA-Sequenzen, die aus den klonierten PCR-Amplifikaten sequenziert wurden, durch die zahlreichen rot unterlegten Basen recht deutlich von den 16S rRNA-Gensequenzen der Ammoniak-Oxidierer abwichen. Über diesen Vergleich ließ sich nicht eindeutig klären, welchen Gattungen der Ammoniak-Oxidierern die PCR-Amplifikate aus den Fichtennadelproben des Höglwaldes zuzuordnen waren. Daher wurden die DNA-Sequenzen der Klone H 1.3.r, H 4.2.r, H 4.5.f und H 4.4.r einem Sequenzvergleich mit der Gendatenbank „GenBank“ unterzogen. Dabei konnte für den Klon H 1.3.r als Bakterium mit der höchsten Übereinstimmungswahrscheinlichkeit eine 16S rRNA-Gensequenz von *Nitrosomonas cryotolerans* (AJ298738) ermittelt werden, für den Klon H 4.2.r eine Gensequenz von *Nitrosomonas* sp. R7c187 (AF386757), für den Klon H 4.5.f eine Gensequenz von einem nichtkultivierten Bakterium *Nitrospira* sp. Klon (AY114348) und für den Klon H 4.4.r das Bakterium *Azospira oryzae* (AF011347) zugeordnet werden. Das Ergebnis dieses Vergleichs zeigte deutlich, daß es sich bei den über die PCR-Technik direkt aus dem Fichtennadelmaterial vervielfältigten PCR-Amplifikaten mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -*Proteobacteria* handelte. Die PCR-Amplifikate der Ammoniak-Oxidierer konnten entweder der Gattung *Nitrosomonas* bzw. *Nitrospira* zugeordnet werden.

```

H1.3.r      GGAGAAAAGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCCTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCT
H4.2.r      GGAGCAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTATTGGAGCGGCCGATGTCACATTAGCT
H4.5.f      GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCT
H4.4.r      GGAGCAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCT
NM          GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
Nm25198     GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
Nm25196     GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
Nm24C       GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTTTTGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
C31         GGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTAAAAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCT
          **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
H1.3.r      AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCCGCGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
H4.2.r      TGTGGGGGGTAAAAGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
H4.5.f      TGTGGTGGGGTAAAAGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
H4.4.r      TGTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
NM          AGTTGGTGAGGTAAGGCTTACCAAGGCCGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
Nm25198     AGTTGGTGAGGTAAGGCTTACCAAGGCCGCGATCAGTAGCTNGTCT-----
Nm25196     AGTTGGTGAGGTAAGGCTTACCAAGGCCGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
Nm24C       AGTTGGTGAGGTAAGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
C31         AGTTGGTGGGTAAAAGGCTTACCAAGGCCAACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACG
          ***** * ***** ** ***** ***** * *****

```

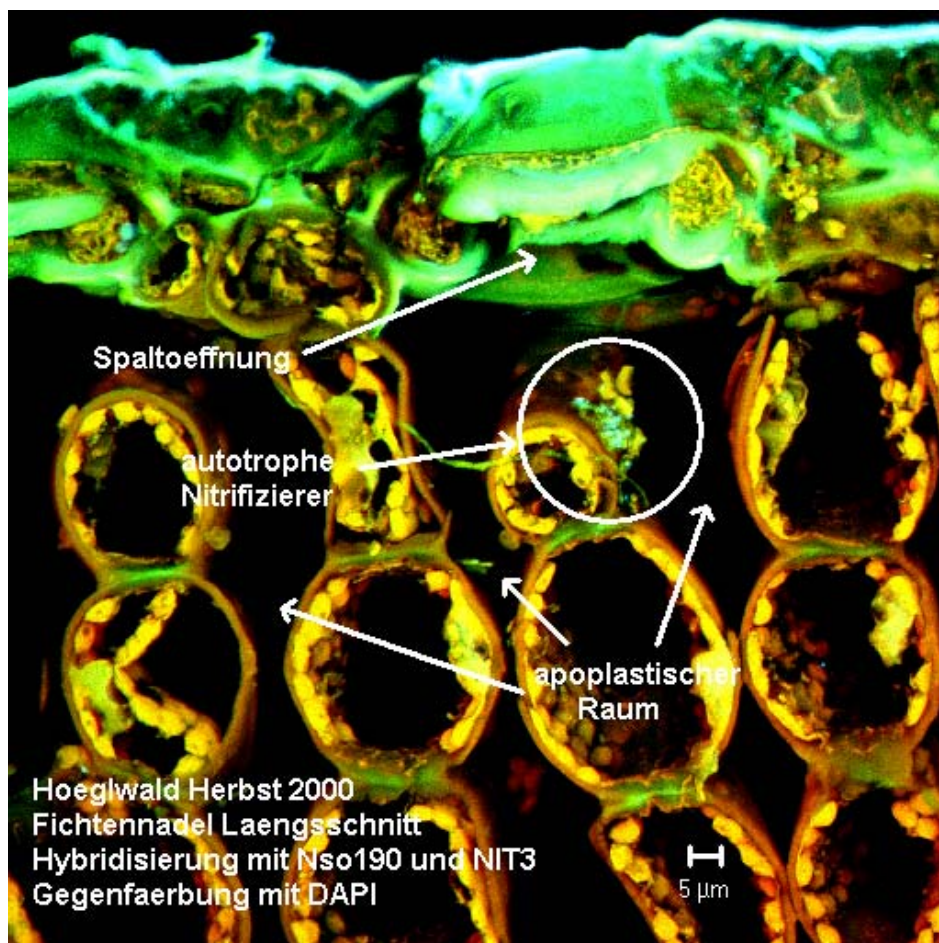
**Abb. 3.59: DNA-Sequenzvergleich der Ammoniak-Oxidierer aus den Fichtenproben des Höglwaldes;** DNA-Sequenzen der Klone H 1.3.r, H 4.2.r, H 4.5.f und H 4.4.r mit den 16S rRNA-Gensequenzen von *N. multiformis* (M96401), *N. multiformis* ATCC 25198 (L35508), *N. multiformis* ATCC 25196 (L35509), *N. multiformis* 24C (AF408634) und *N. europaea* C31 (M96399); grau unterlegt: Oligodesoxynukleotide; rot unterlegt: abweichende Basen; Übereinstimmungen sind in der letzten Zeile durch Sterne gekennzeichnet

### 3.3.1.3 Lokalisation und direkter Nachweis im Fichtennadel-Apoplasten

Nachdem mit der MPN-Technik die autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadelproben aus dem Höglwald indirekt über ihre Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat nachgewiesen und quantifiziert werden konnten, sollte im folgendem Versuchsabschnitt erstmalig geklärt werden, ob die autotrophen Nitrifizierer auf der Blattoberfläche der Fichtennadeln im Bewuchs (vgl. Abb. 3.4) oder in den Nadelblätter selbst, genauer im Interzellularraum - also dem Apoplasten, zu finden waren. Die Untersuchung der Fichtennadeln erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop. Um Kontaminationen der Fichtennadelpräparate während der Anfertigung der Präparate, der Hybridisierung und der anschließenden Auswertung zu vermeiden und einem Verlust von autotrophen Nitrifizierern vorzubeugen, wurden nach der Gefriereinbettung Fichtennadel-Längsschnitte mit einer Dicke von ca. 100 µm angefertigt. Die Auswertung erfolgte über das konfokale Laserrastermikroskop, das eigens dazu entwickelt wurde, dicke, lichtdurchlässige Präparate zu untersuchen. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der Fichtennadeln aus dem Höglwald sind in der Reihenfolge der Probenahmenzeitpunkte dargestellt, d.h. von Herbst 2000 bis zum Herbst 2002. Die hier in den Abbildungen gezeigten Ergebnisse stellen dabei einen repräsentativen Quer-

schnitt der Untersuchungen dar. Sowohl die Nadelblattoberfläche als auch das Nadelblattgewebe der Fichtennadel-Längsschnitte wurden auf die Anwesenheit der autotrophen Nitrifizierer untersucht. Als Vergleichsmöglichkeiten dienten die in den Validierungsuntersuchungen (s. 3.2.2.3) angefertigten Negativ- und Positivkontrollen, um somit die Befunde klar bewerten und einordnen zu können.

Im ersten Schritt wurden die Fichtennadeln aus der Probenahme Höglwald Herbst 2000 näher untersucht. Abbildung 3.60 zeigt repräsentativ einen entsprechenden Fichtennadel-Längsschnitt nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.

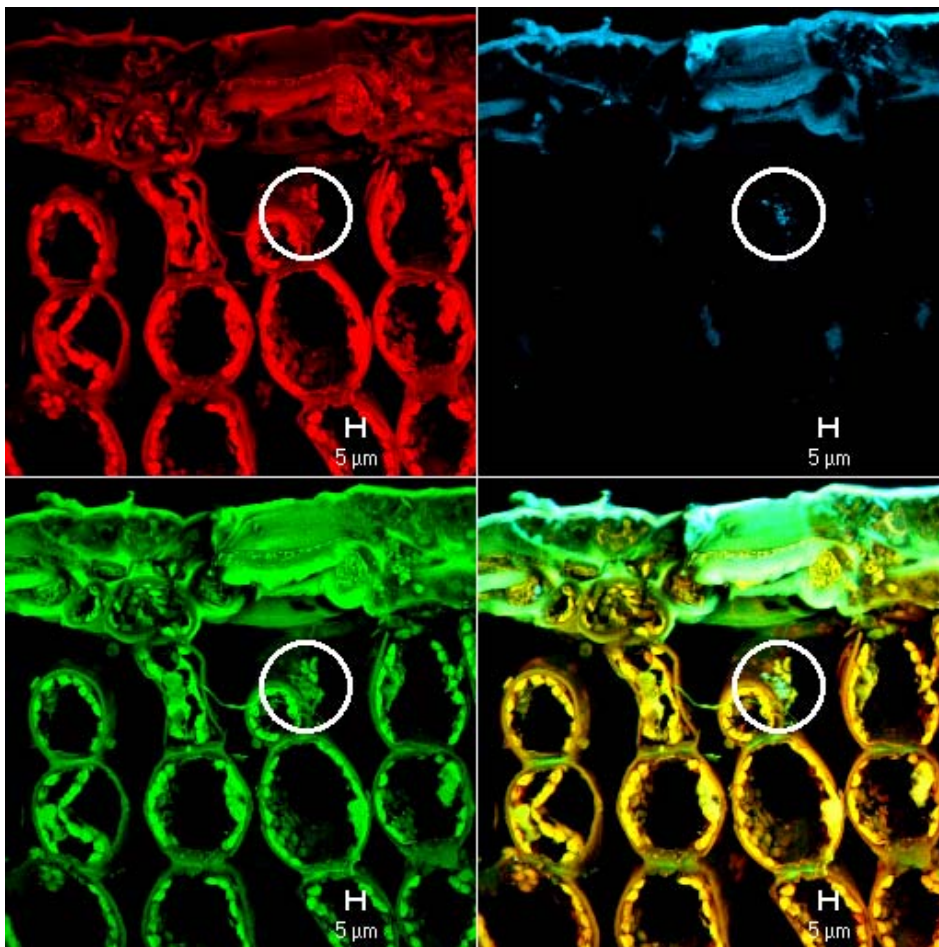


**Abb. 3.60: Fichtennadel-Längsschnitt Herbst 2000 Höglwald;** oben ist der Nadelrand mit der Epidermis, der Hypodermis und einer Spaltöffnung zu erkennen; darunter befindet sich der substomatäre Hohlraum und das sich anschließende Palisadenparenchym; deutlich sind unterhalb der Spaltöffnung im Apoplasten auf der Außenwand einer Pflanzenzelle autotrophe Nitrifizierer an den blaugrünen Fluoreszenzsignalen zu erkennen (s. Kreis); das Bild wurde durch die Integration von 50 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 31,85 µm erstellt; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 364, 488 und 543 nm; Maßstab: 5 µm

Unterhalb der Spaltöffnung im substomatären Hohlraum waren auf der Außenseite einer Parenchymzelle nach erfolgter Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung blaugrünen Fluoreszenzsig-



nale zu erkennen (s. Kreis). Um beurteilen zu können, ob es sich bei den blaugrünen Fluoreszenzsignalen tatsächlich um die Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI und der an die Oligodesoxynukleotid-Sonden gebundenen Farbstoffe ROX und FITC (s. Tab. 2.7) und nicht um Artefakte handelte und ob die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erfolgreich abgelaufen war, wurde das aufgenommene Bild in die einzelnen Detektionskanäle für die jeweiligen Laser, mit denen die Fluoreszenzfarben angeregt wurden, aufgeteilt. Dabei handelte es sich um eine Funktion des Bildbearbeitungsprogrammes des konfokalen Laserrastermikroskops, bei der kein neues Bild mehr erstellt werden mußte, sondern das bestehende Bild wurde in die einzelnen Kanäle und ein Gesamtbild aufgetrennt. In Abbildung 3.61 ist die Abbildung 3.60 nach der Auftrennung in die verschiedenen Kanäle der jeweiligen Laser zu sehen.

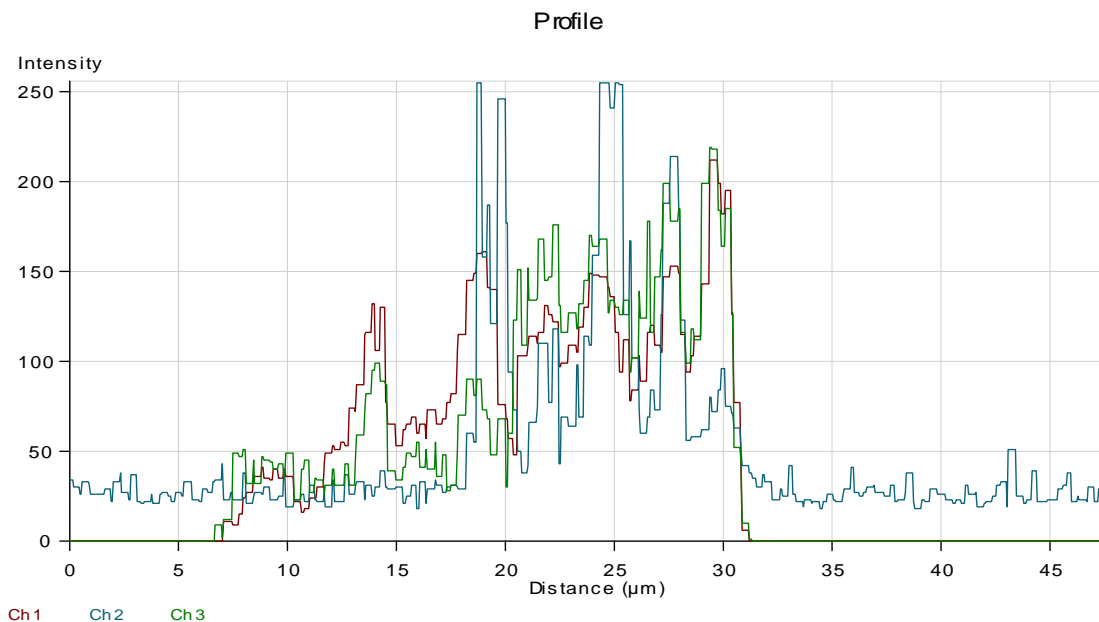
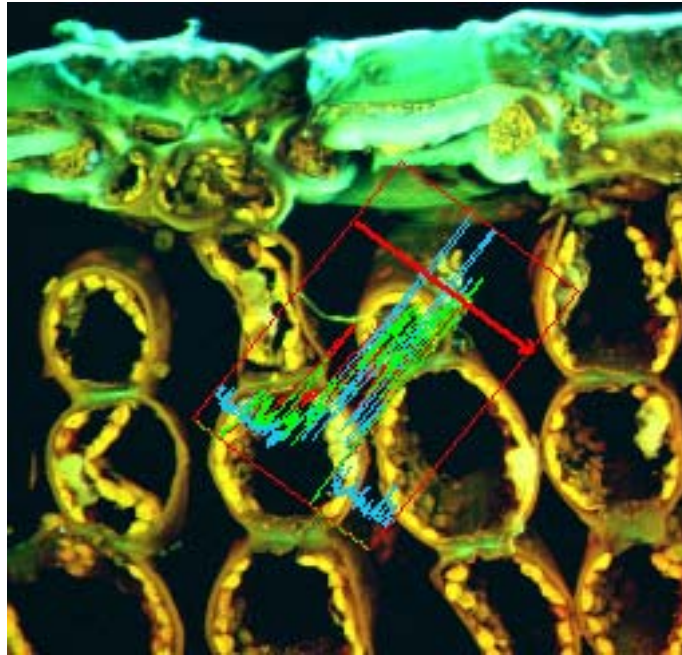


**Abb. 3.61:** Auftrennung der Abbildung 3.63 in die einzelnen Detektionskanäle; oben rechts ist der Kanal des UV-Lasers mit der Anregungswellenlänge  $\lambda = 364$  nm (Blau, DAPI-Signal), oben links der Kanal für den Laser der Anregungswellenlänge  $\lambda = 543$  nm (Rot, Sonde Nso190 mit ROX) und unten links der Kanal für den Laser der Anregungswellenlänge  $\lambda = 488$  nm (Grün, Sonde NIT3 mit FITC) abgebildet; rechts unten ist das Gesamtbild aus der Integration aller drei Einzelkanäle zu sehen

Im Teilbild oben rechts waren im Blau-Kanal deutlich die blauen Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI zu erkennen (s. Abb. 3.61, Kreis), die mit dem UV-Laser bei einer Wellen-

länge von  $\lambda = 364$  nm angeregt wurden. DAPI besaß eine spezifische Affinität zu AT-reichen DNA-Molekülen und konnte daher grundsätzlich jede DNA anfärben. Die Fluoreszenzsignale des DAPI's entsprachen in ihrer Größe und ihrem Erscheinungsbild genau denjenigen Signalen der Bakterien, wie sie in der Positivkontrolle der künstlich mit Bakterien inokulierten Fichtennadel-Längsschnitten (s. Abb. 3.43) zu sehen waren. In Abbildung 3.61 oben links, im Rot-Kanal, waren (Kreis) die Fluoreszenzsignale der für die Ammoniak-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotide-Sonde Nso190, an welcher der Farbstoff ROX gekoppelt ist, zu erkennen. Dieser Farbstoff besaß eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 543$  nm. Auch in diesem Fall zeigte der Vergleich mit der Positivkontrolle aus Abbildung 3.44, daß sich die Fluoreszenz-Signale in ihrer Größe und Erscheinungsbild entsprechend glichen. Zusätzlich konnte man erkennen, daß die Rot-Signale genau an derselben Stelle im Präparat lagen, an der auch die Blau-Signale des DAPI's zu finden waren. Im Grün-Kanal, in Abbildung 3.61 unten links, waren deutlich die grünen Fluoreszenzsignale des Farbstoffes FITC, der an die für die Nitrit-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 gebunden war, im Kreis zu sehen. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC besaß eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm. Auch hier lagen die grünen Fluoreszenzsignale des Farbstoffes FITC an derselben Stelle im Präparat, an der die Signale der Blau- und Rot-Fluoreszenz der DAPI- und ROX-Färbung zu finden waren. In diesem Fall entsprachen die Signale den Fluoreszenzsignalen, wie sie aus der Positivkontrolle in Abbildung 3.45 zu entnehmen waren. Die Integration der einzelnen Teilbilder zeigte im Gesamtergebnis (s. Abb. 3.61 unten rechts) das Abbild 3.60. Aus dem Vergleich mit den Positivkontrollen ergab sich, daß es sich bei den blauen Fluoreszenzsignalen um die mit DAPI angefärbte DNA von Mikroorganismen handelte, bei den roten Fluoreszenzsignalen um mit der für Ammoniak-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 spezifisch markierten Zellen von Ammoniak-Oxidierern und bei den grünen Fluoreszenzsignalen um mit der für Nitrit-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 spezifisch markierten Zellen des Nitrit-Oxidierers *Nitrobacter* handelte. Neben der Größe und dem Erscheinungsbild der Fluoreszenzsignale sprach besonders die Spezifität der Oligodesoxynukleotid-Sonden, wie sie in der Validierung unter 3.2.1.5 anhand von Bakteriengemischen überprüft worden war, dafür, daß es sich bei den roten und grünen Fluoreszenzsignalen tatsächlich um die Signale der Fluoreszenzfarbstoffe handelte, die an die jeweiligen Oligodesoxynukleotid-Sonden gebunden waren. Da die roten und grünen Fluoreszenzsignale bei einer Laserlichtanregung nur dann aufleuchteten, wenn die Oligodesoxynukleotid-Sonden an die vorhandenen entsprechenden Bakterien gebunden waren, konnte man folglich davon ausgehen, daß es sich im Fichtennadel-Längsschnitt um autotrophe Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer handelte. Zusätzlich kam hinzu, daß die Signale zusammen mit dem blauen DAPI-Signal im Präparat an ein und derselben Stelle im Präparat zu finden waren. Da die Oligodesoxynukleotid-Sonden an Ribosomen banden (vgl. Validierung Abb. 3.28 und 3.29) und DAPI nur an DNA-Moleküle, und diese beiden Moleküle nur in Zellen an ein und demselben Ort zu

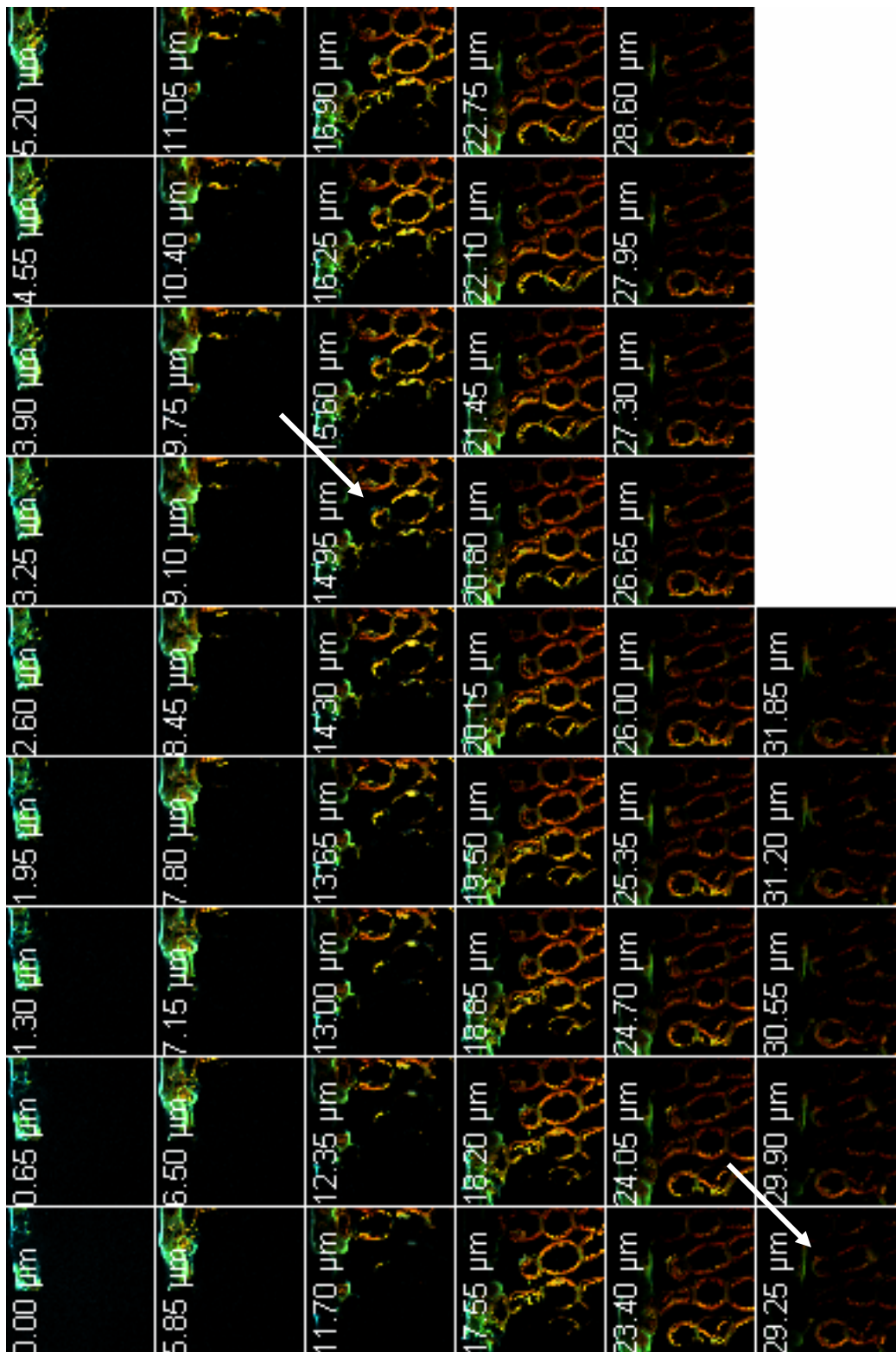
finden waren, war aus der Lage aller Fluoreszenzsignale im Präparat davon auszugehen, daß es sich tatsächlich um Bakterienzellen von Ammoniak- und Nitrit-Oxidierern handelte. Zur exakten Überprüfung, ob sich die Fluoreszenzsignale im Präparat wirklich an ein und derselben Stelle befanden, wurde das Profil und die Intensität der Fluoreszenzsignale aufgezeichnet, die in Abbildung 3.62 zu finden sind.



**Abb. 3.62: Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale aus Abbildung 3.60;** das obere Bild zeigt die Lage des Profilschnittes im Präparat; zur besseren Auswertung sind in der Graphik darunter der Intensitätskurven aufgezeichnet; die deckungsgleiche Überlagerung der blauen, grünen und roten Kurven zeigt, daß die Fluoreszenzsignale an derselben Stelle im Präparat zu finden sind; die Intensitätshöhen zeigen, welche der Fluoreszenzfarben in den Bakterienzellen am besten gebunden wurden; blau: DAPI-Färbung; grün: Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 mit FITC; rot: Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 mit ROX



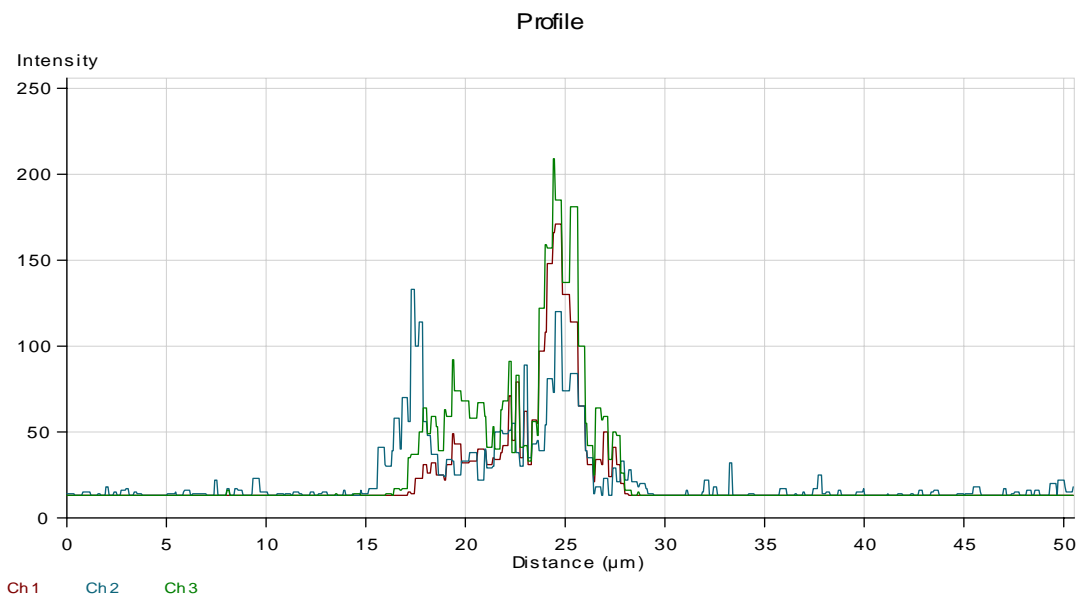
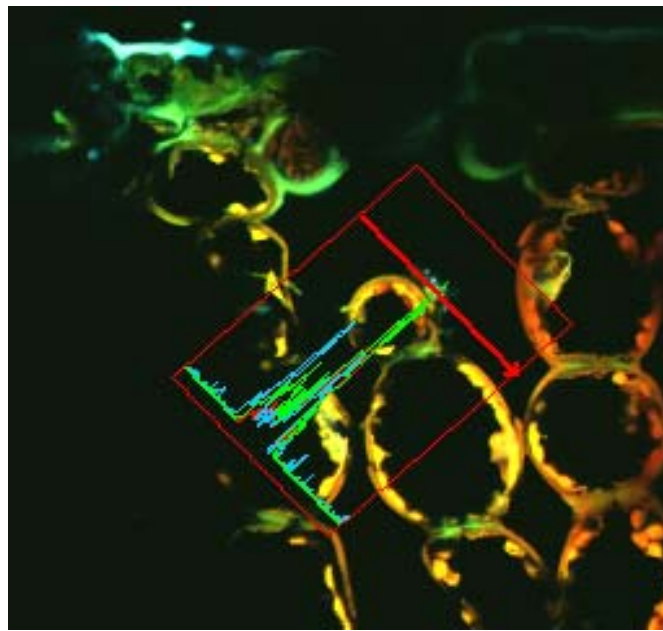
Durch die Fluoreszenzsignale in der Abbildung 3.60 wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramm des konfokalen Laserrastermikroskops eine Linie gezogen (s. Abb. 3.62 oberes Bild, roter Pfeil), welche die Strecke anzeigt, über die das Profil der Fluoreszenzsignale aufgenommen wurde. Zur besseren Auswertung des Profils dieser Fluoreszenzsignale und deren Intensitäten wurden die Kurven der Fluoreszenzsignale über diese Strecke in einer Graphik unterhalb des Bildes separat aufgetragen. Deutlich war zu erkennen, daß alle drei Fluoreszenzsignale der einzelnen Farbstoffe genau in dem Bereich des Präparates an Intensität zunahmen, in dem die Kolonie der autotrophen Nitrifizierer lag. Durch die Übereinstimmung und fast deckungsgleiche distanzuelle Ausdehnung der Intensitätskurven in der Graphik konnte man feststellen, daß die Fluoreszenzsignale auf derselben Distanz zu- und abnehmen. Der Beginn des Anstieges der Intensitäten stimmte mit dem Anfang der Kolonie überein. Über die Distanz, in der die Signale der Kolonie aus dem Bild zu sehen waren, war ein hohes Intensitätsniveau zu erkennen, das genau dann abnahm, wenn auch die Fluoreszenzsignale der Kolonie im Bild endeten. Die Intensitäten aller drei Fluoreszenzfarbstoffe stiegen an, was bewies, daß nicht nur DAPI gebunden wurde, sondern auch die Oligodesoxynukleotid-Sonden mit den jeweiligen Farbstoffen. Dies wurde durch einen Vergleich mit den Profilen und Intensitäten, die in der Validierung aufgenommen wurden (s. Abb. 3.31 und 3.33) einwandfrei bestätigt. Die bisherigen Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der Validierungsversuche überein und zeigten, daß nicht nur der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, sondern auch die spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden im Fichtennadel-Längsschnitt Höglwald Herbst 2000 an derselben Stelle gebunden wurden. Da die angefärbten Ribosomen und DNA-Moleküle zusammen nur in Zellen vorkamen, handelte es sich daher bei den Fluoreszenzsignalen, die in Abbildung 3.60 im Kreis zu sehen sind, eindeutig und zweifelslos um Zellen von autotrophen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierern. Nach dem Beweis, daß es sich bei den in Abbildung 3.60 aufgefundenen Fluoreszenzsignalen tatsächlich um Zellen von autotrophen Nitrifizierern handelte, bestand die Möglichkeit, daß durch eine Kontamination die Zellen auf das Fichtennadelpräparat gelangten. Um dies auszuschließen und nachzuweisen, daß sich die autotrophen Nitrifizierer mitten im Fichtennadelpräparat befanden, wurde die Abbildung 3.60, die durch die Integration von 50 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 31,85  $\mu\text{m}$  erstellt wurde, in die Einzelbilder aufgetrennt. Die Auftrennung des Bilderstapels ist in Abbildung 3.63 dargestellt. Der Abstand zwischen den einzelnen Bildern betrug 0,65  $\mu\text{m}$ . Dieser Abstand wurde so groß gewählt, um Bildinformationen zwischen den Einzelbildern nicht zu verlieren und die Bakterienzellen der autotrophen Nitrifizierer, die eine Zellgröße von 1 – 2  $\mu\text{m}$  aufweisen, entdecken und die entsprechenden Fluoreszenzsignale aufzeichnen zu können. Im ersten und letzten Bild ließ sich erkennen, daß die Fluoreszenzsignale, die von der Kolonie der autotrophen Nitrifizierer in der Mitte der Abbildung 3.60 ausgingen, dort nicht zu finden waren.



**Abb. 3.63:** Auftrennung des Bilderstapels der Abbildung 3.60; sowohl im ersten als auch im letzten Einzelbild sind keine Fluoreszenzsignale der autotrophen Nitrifizierer zu sehen; hingegen sind mitten im Präparat die Fluoreszenzsignale der autotrophen Nitrifizierer ab Bild Nr. 24 (14,59  $\mu\text{m}$ ) bis Bild Nr. 46 (29,25  $\mu\text{m}$ ) (s. Pfeile) zu erkennen; Abstände der Einzelbilder zum ersten Bild in  $\mu\text{m}$ ; der Bilderstapel umfaßt eine Höhe von insgesamt 31,85  $\mu\text{m}$

Die Fluoreszenzsignale waren erstmalig im Bild 24 (14,95  $\mu\text{m}$ ) und im Bild 46 (29,25  $\mu\text{m}$ ) zum letzten Mal (s. Pfeile) zu erkennen und lagen somit mitten im Fichtennadelpräparat. Eine Kontamination von Fichtennadelpräparaten mit autotrophen Nitrifizierern wurde in der Validierung (s. 3.2.2.3) als Positivkontrolle vorgenommen. Das Erscheinungsbild der künstlich auf die Fichtennadel-Längsschnitte aufgebrauchten Bakterien in den Validierungen (s. z.B. Abb. 3.44) unterschied sich deutlich von der Abbildung 3.60. Die autotrophen Nitrifizierer verteilten sich bei dieser Kontamination wahllos über das Fichtennadelgewebe. Bei einer Auftrennung der Bilderstapel der Abbildungen der Positivkontrollen waren die Fluoreszenzsignale bereits auf dem ersten bzw. letzten Einzelbild deutlich zu erkennen und lagen somit in keinem Fall in der Mitte des Fichtennadelpräparates. Da in Abbildung 3.60 die Fluoreszenzsignale in der Mitte des Präparates lagen, augenscheinlich auf der Zellwandaußenseite einer Parenchymzelle saßen und sich nicht wahllos über das Präparat verteilten, wurde ausgeschlossen, daß es sich bei den Zellen der autotrophen Nitrifizierer in dem Fichtennadelpräparat Höglwald Herbst 2000 um eine Kontamination handelte. Damit war ein weiterer Beweis erbracht worden, daß die autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten von Fichten vorkommen.

Zuletzt wurde überprüft, ob es sich bei den Fluoreszenzsignalen aus Abbildung 3.60 tatsächlich um Fluoreszenzsignale von autotrophen Nitrifizierern handelte. Durch die Integration aller 50 Einzelbilder bestand die Möglichkeit, daß sich die Fluoreszenzsignale der hybridisierten autotrophen Nitrifizierer mit den darunterliegenden Fluoreszenzsignalen der Autofluoreszenz der Pflanzenzellen überschneiden konnten. Um dies auszuschließen und trotzdem einen einwandfreien Beweis zu erbringen, daß die Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotide und der DAPI-Färbung tatsächlich nur in der Kolonie der autotrophen Nitrifizierer zu finden waren, erfolgte eine weitere Aufnahme des Profils und der Intensitäten der Fluoreszenzsignale an einem Einzelbild. Durch die Verwendung des Einzelbildes Nr. 25 (15,60  $\mu\text{m}$ ) wurden alle Fluoreszenzsignale in den Ebenen über oder unter dem Einzelbild ausgeblendet, also auch die Autofluoreszenzsignale der Pflanzenzelle. Dieser erneute Profil- und Intensitätsvergleich ist in Abbildung 3.64 zu sehen. Durch die Fluoreszenzsignale der autotrophen Nitrifizierer auf der Zellwand der Parenchymzelle wurde ein weiteres Mal mit einem roten Pfeil die Strecke markiert, über die das Profil der Fluoreszenzsignale aufgezeichnet wurde. Um eine bessere Auswertung und einen Intensitätsvergleich vornehmen zu können, wurden die Intensitätskurven als Graphik unterhalb des Bildes dargestellt. Die Profilstrecke verlief nur durch die Fluoreszenzsignale, die auf der Außenseite an der Zellwand der Parenchymzelle zu erkennen waren, den Signalen der autotrophen Nitrifizierer. Das zugehörige Profil zeigte den Anstieg der Fluoreszenzsignale genau in dem Bereich, in dem der rote Pfeil die Kolonie der autotrophen Nitrifizierer berührt. Die Fluoreszenzsignale nahmen wieder ab, als der rote Pfeil den Bereich der Kolonie verließ.

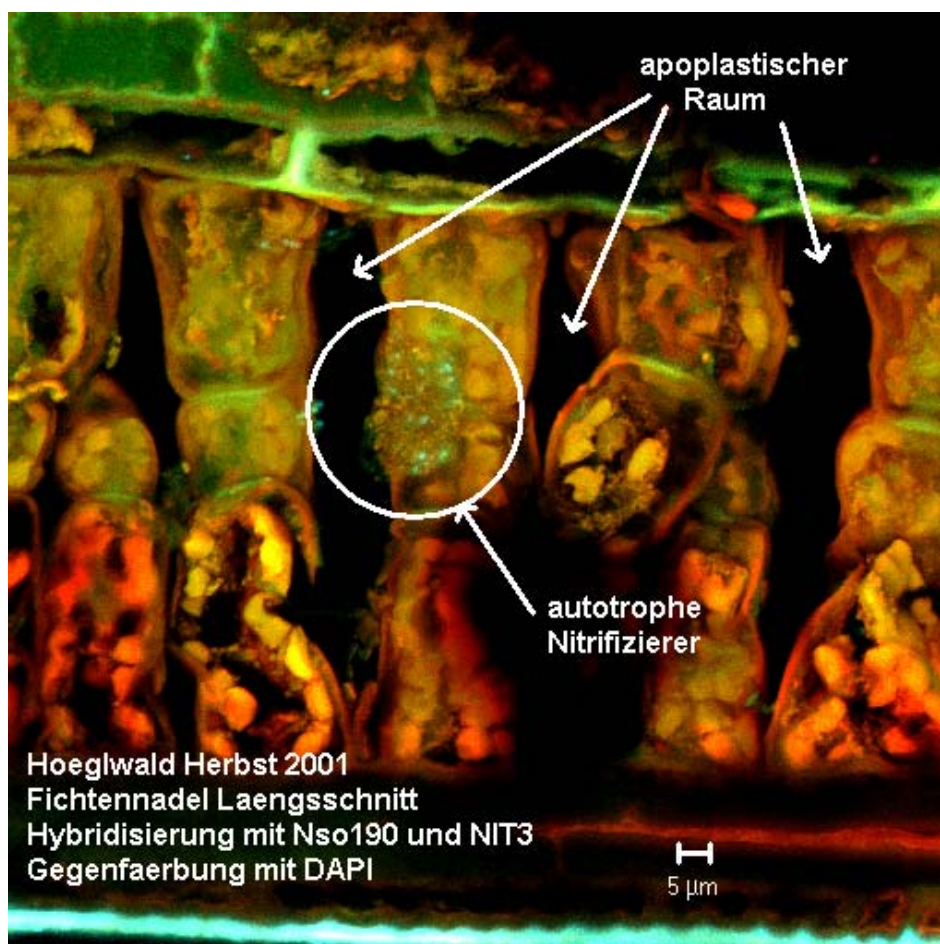


**Abb. 3.64: Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale des Einzelbildes Nr. 25;** Lage des Profilschnittes im Präparat; zur genauen Auswertung sind in der Graphik die Intensitätskurven aufgezeichnet; die deckungsgleiche Überlagerung der blauen, grünen und roten Kurven zeigt, wo die Fluoreszenzfarben in den Bakterienzellen zu finden sind; blau: DAPI-Färbung; grün: Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 mit FITC; rot: Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 mit ROX

Aus der Graphik war zu entnehmen, daß die Fluoreszenzsignale im Präparat am selben Ort gebunden sind. Der Abgleich mit der x-Achse, auf der die Distanz der Profilstrecke aufgetragen war, zeigte, daß die Fluoreszenzsignale alle gleichzeitig zu- bzw. abnahmen, d.h. an demselben Ort in den Bakterienzellen lokalisiert waren. Die Fluoreszenzsignale aus Abbildung 3.60 stammten somit nicht von der Autofluoreszenz der Parenchymzelle, die durch die Integration der Einzelbilder unter die Signale der Kolonie der autotrophen Nitrifizierer zum Liegen kamen, sondern waren eindeutig den Bakterienzellen der autotrophen Nitrifizierer zuzuordnen. Erstmals war es somit gelungen, chemolithoautotrophe Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer mit Hilfe der Fluores-

zenz-*in situ*-Hybridisierung und der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop eindeutig und zweifelsfrei **im** Apoplasten von Fichtennadeln nachzuweisen und zu lokalisieren. Damit war der direkte Beweis der Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierern in der Fichtenphyllosphäre erbracht worden. Im weiteren Verlauf wurden alle weiteren Fichtennadelproben der Jahre 2001 und 2002 mit dem etablierten Nachweisverfahren über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der Auswertung anhand des konfokalen Laserrastermikroskops näher untersucht. Im Folgenden werden repräsentativ für die jeweiligen Probenahmezeitpunkte Abbildungen gezeigt, die als Ergebnis entsprechend der Probe Herbst 2000 hybridisierte Kolonien autotropher Nitrifizierer aufweisen. Für jede Abbildung, die durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung markierte, autotrophe Nitrifizierer enthält, wurde dieselbe Überprüfung, wie bei Abbildung 3.60 geschildert, durchgeführt.

Die in der Fichtennadel-Probe aus dem Höglwald Herbst 2001 entdeckten autotrophen Nitrifizierer sind in Abbildung 3.65 als Kolonie im Palisadenparenchym auf der Außenseite einer Pflanzenzelle deutlich zu erkennen (s. Kreis).

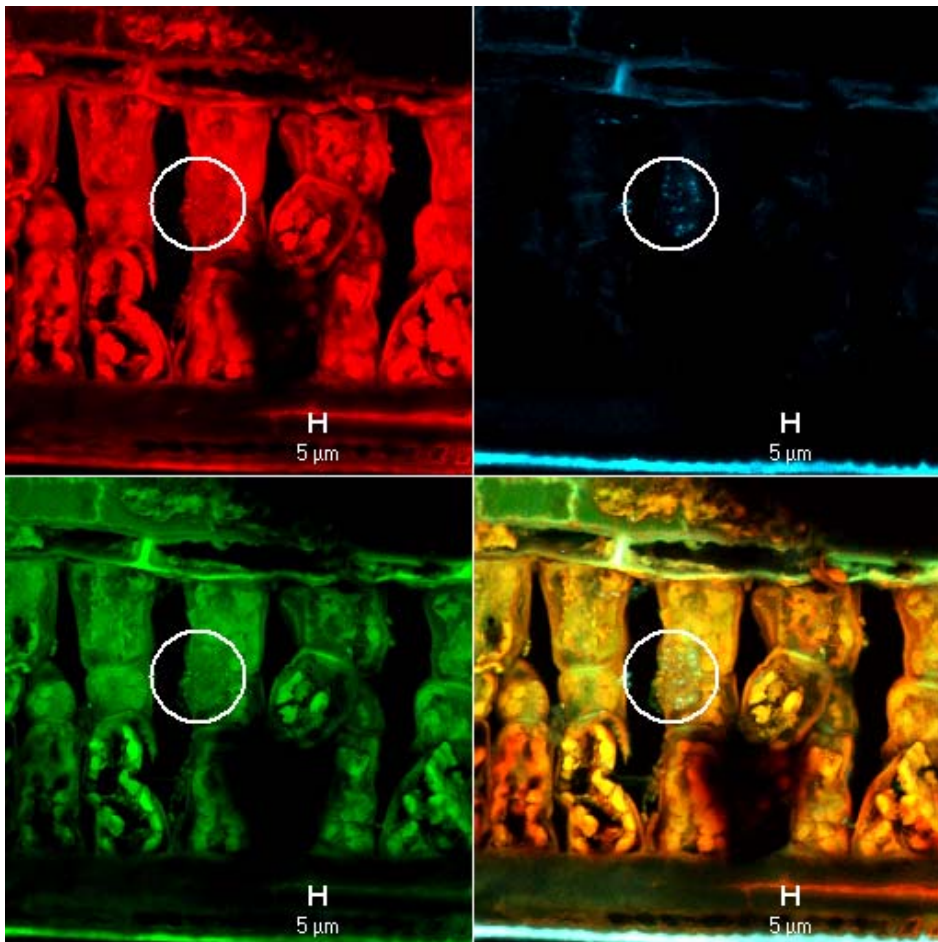


**Abb. 3.65:** Fichtennadel-Längsschnitt Herbst 2001 Höglwald; unten ist der Nadelrand (blau) mit der Epidermis und der Hypodermis zu erkennen, darüber befindet sich das Palisadenparenchym; deutlich ist auf der Zellaußenwand eine Kolonie autotropher Nitrifizierer an den blaugrünen Fluoreszenzsignalen zu erkennen (s. Kreis); das Bild wur-



de durch die Integration von 36 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 15,73  $\mu\text{m}$  erstellt; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 364, 488 und 543 nm; Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

Die Abbildung 3.65 wurde aus einem Bilderstapel mit einer Höhe von 15,73  $\mu\text{m}$  erstellt. Die 36 Einzelbilder wurden aus der Mitte des Präparates aufgenommen. Zur Überprüfung der Fluoreszenzsignale wurde eine Auftrennung des Gesamtbildes in die jeweiligen Detektionskanäle vorgenommen. Diese Auftrennung ist in Abbildung 3.66 zu sehen.

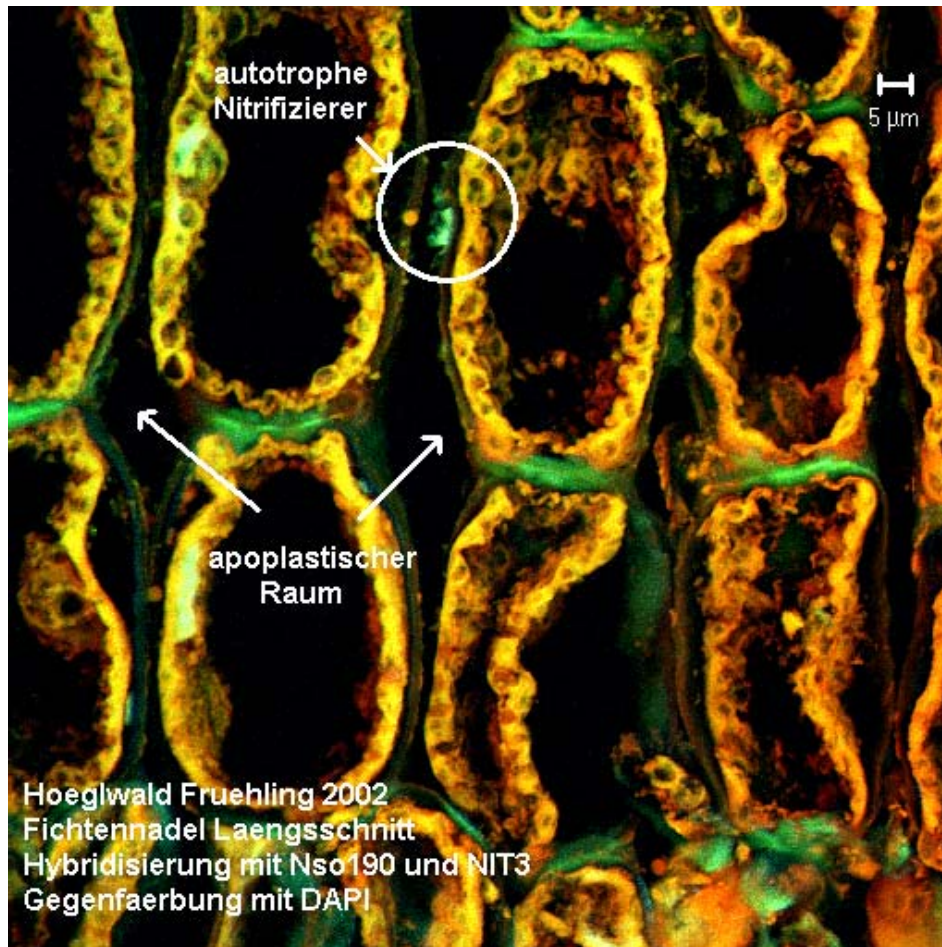


**Abb. 3.66:** Auftrennung der Abbildung 3.65 in die einzelnen Detektionskanäle; oben rechts ist der Kanal des UV-Lasers mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 364$  nm (Blau, DAPI), oben links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 543$  nm (Rot, Sonde Nso190 mit ROX) und unten links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm (Grün, Sonde NIT3 mit FITC) abgebildet; rechts unten ist das Gesamtbild aus der Integration aller drei Einzelkanäle zu sehen

Im oberen rechten Teilbild waren die blauen Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI zu erkennen. Deutlich konnte man im Kreis die mit DAPI angefärbten Bakterienzellen sehen. Im Teilbild oben links waren die roten Fluoreszenzsignale bei der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 543$  nm dargestellt. Bei dieser Anregungswellenlänge emittierte der Fluoreszenzfarbstoff ROX der

Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 die Fluoreszenzsignale der Ammoniak-Oxidierer, die in der Rot-Darstellung schwach aber dennoch klar zu identifizieren waren. Ebenso deutlich waren die Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für *Nitrobacter* zu sehen (s. Kreis). Auch in diesem Präparat waren beide Gruppen der Nitrifizierer, die Ammoniak- und die Nitrit-Oxidierer, als Kolonie zu finden.

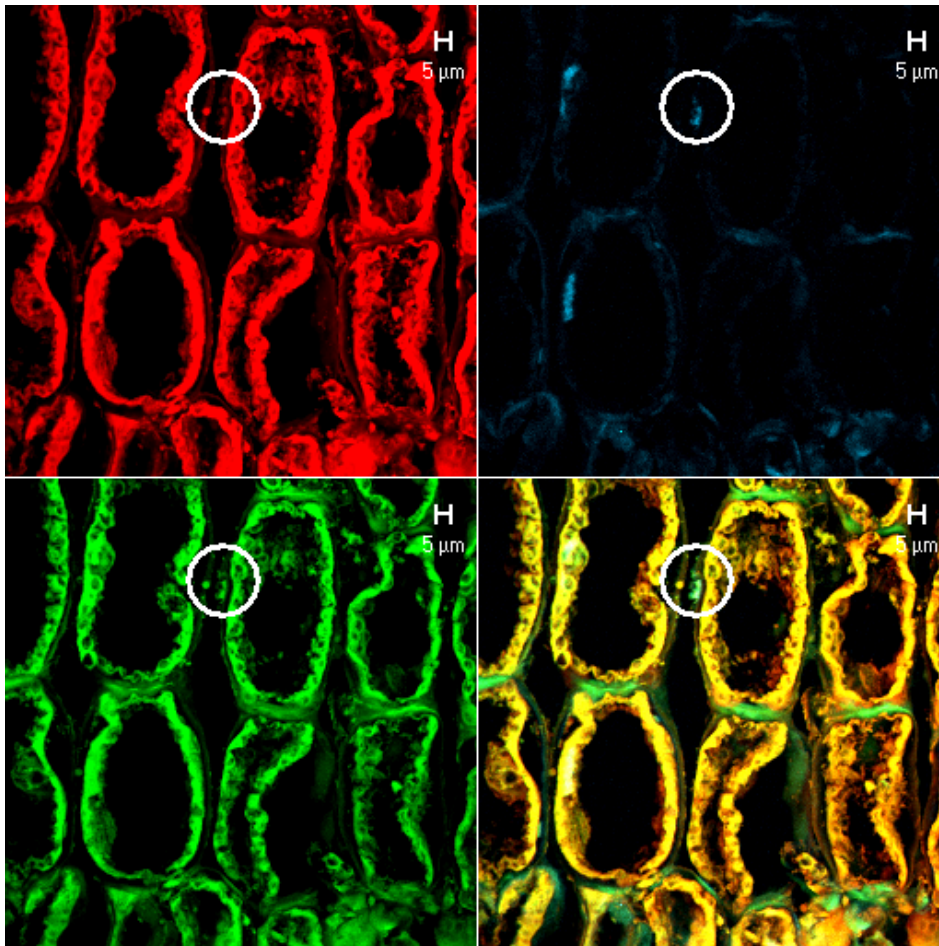
Die Abbildung 3.67 zeigt den Längsschnitt eines Fichtennadelpräparates aus dem Höglwald Frühling 2002, in dessen Palisadenparenchym autotrophe Nitrifizierer sitzen (s. Kreis).



**Abb. 3.67: Fichtennadel-Längsschnitt Frühling 2002 Höglwald;** in der Abbildung ist das Palisadenparenchym sehen; deutlich ist auf der Außenwand zwischen zwei Pflanzenzellen eine Kolonie autotropher Nitrifizierer an den blaugrünen Fluoreszenzsignalen zu erkennen (s. Kreis); das Bild wurde durch die Integration von 31 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 15,00 µm erstellt; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlängen der Laser: 364, 488 und 543 nm; Maßstab: 5 µm

Die Kolonie der autotrophen Nitrifizierer saß auch in dieser Abbildung auf einer Zellwand zwischen zwei Pflanzenzellen des Palisadenparechym. Die Abbildung wurde aus der Mitte eines Fichtennadelpräparates mit einer Schnittdicke von 100 µm aus 31 Einzelbildern als Gesamtbild integriert. Der sich aus der Übereinanderlegung der Einzelbilder ergebende Bilderstapel

besaß eine Höhe von 15 µm. Die Auftrennung des Gesamtbildes 3.67 in die einzelnen Detektionskanäle in Abbildung 3.68 zeigte auch in diesem Fall in allen drei Kanälen, dem Blau-Kanal zum Nachweis des DAPI-Signals, dem Rot-Kanal zum Nachweis des Signals für die Ammoniak-Oxidierer und dem Grün-Kanal zum Nachweis der Nitrit-Oxidierer klar zu identifizierende Fluoreszenzsignale.



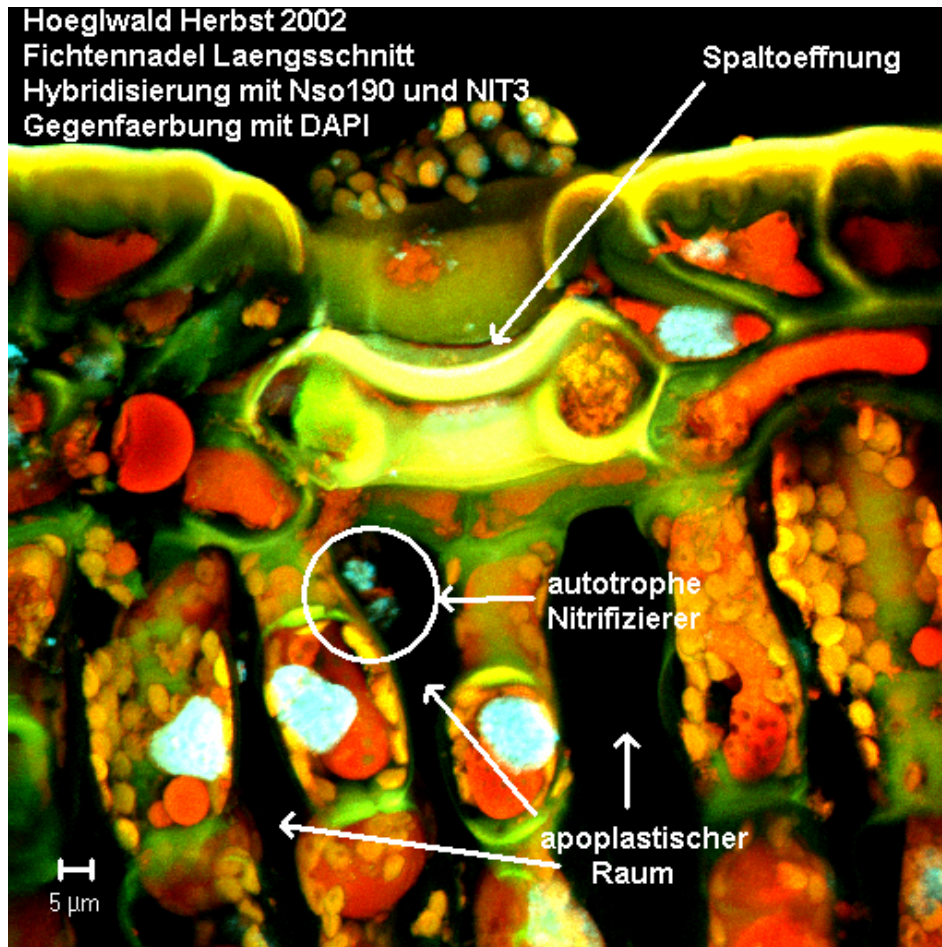
**Abb. 3.68: Auftrennung der Abbildung 3.67 in die einzelnen Detektionskanäle;** oben rechts ist der Kanal des UV-Lasers mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 364$  nm (Blau, DAPI-Signal), oben links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 543$  nm (Rot, Sonde Nso190 mit ROX) und unten links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm (Grün, Sonde NIT3 mit FITC) abgebildet; deutlich sind die entsprechenden Fluoreszenzsignale in den Kanälen (s. Kreis) zu erkennen; rechts unten ist das Gesamtbild aus der Integration aller drei Einzelkanäle zu sehen

In dem Präparat aus dem Frühling 2002 waren die autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten zu sehen.

Repräsentativ für die letzten Probenahme des Höglwaldes im Herbst 2002 zeigt Abbildung 3.69 eine Kolonie von autotrophen Nitrifizierern direkt unterhalb einer Spaltöffnung im Nadelblattgewebe. Die Bakterienkolonie saßen, wie in den Abbildungen zuvor zu sehen war, ebenfalls

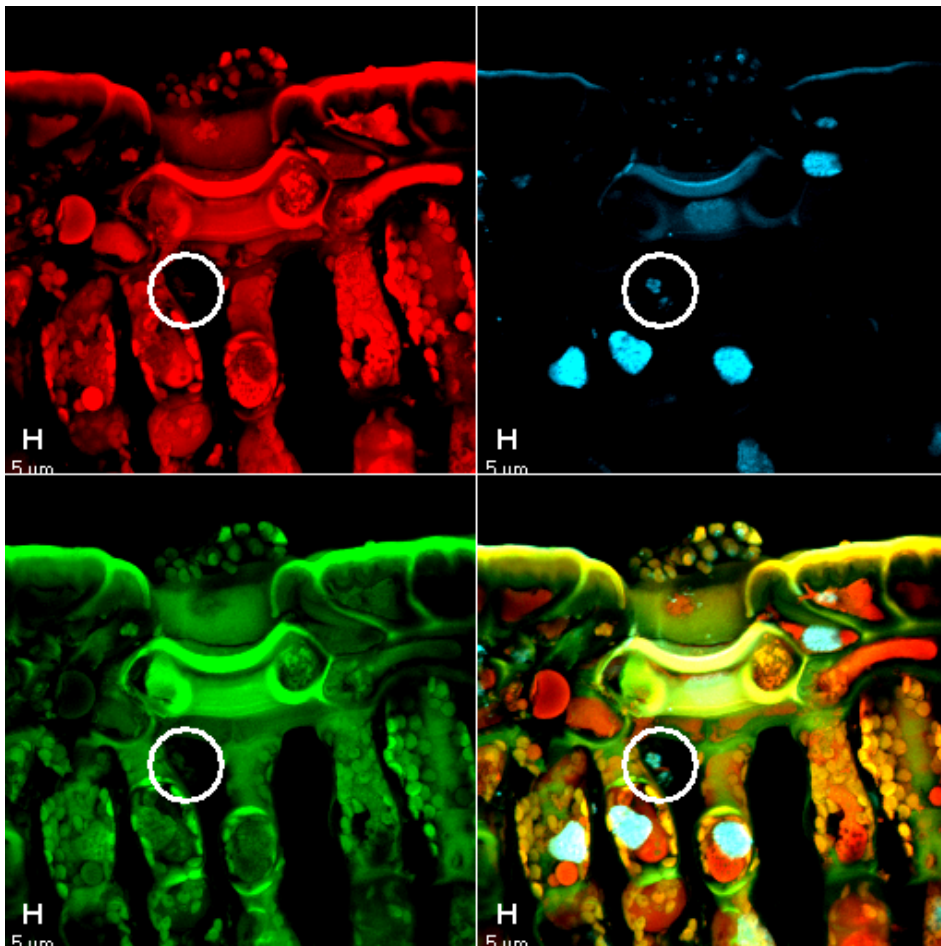


auf der Außenseite einer Pflanzenzelle (s. Kreis) und war an den Fluoreszenzsignalen sehr deutlich zu erkennen.



**Abb. 3.69: Fichtennadel-Längsschnitt Herbst 2002 Höglwald;** im Palisadenparenchym ist deutlich auf der Außenwand einer Pflanzenzelle eine Kolonie autotropher Nitrifizierer an den Fluoreszenzsignalen zu erkennen (s. Kreis); das Bild wurde durch die Integration von 33 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 19,2 µm erstellt; Objektiv: C-Apochromat 63 x; Anregungswellenlänge der Laser: 364, 488 und 543 nm; Maßstab: 5 µm

Wie alle Präparate aus der Gerfriereinbettung besaß auch der Fichtennadel-Längsschnitt in Abbildung 3.69 eine Schnittdicke von 100 µm. Die Gesamtabbildung entstand aus der Integration von 33 Einzelbildern. Der Bilderstapel aus diesen 33 Einzelbildern wies eine Höhe von 19,2 µm auf und lag in der Mitte des Längsschnittes des Fichtennadelpräparates. Um auch bei diesem Präparat die Eindeutigkeit der Fluoreszenzsignale zu zeigen, wurde das Gesamtbild 3.69 in die einzelnen Detektionskanäle aufgetrennt. Aus der Abbildung 3.70 sind in den einzelnen Kanälen die Fluoreszenzsignale zu entnehmen. Sowohl im Blau-Kanal für die Gegenfärbung mit DAPI als auch im Rot-Kanal für die Detektion der Signale der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer und auch im Grün-Kanal für die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für *Nitrobacter* waren die Farbsignale deutlich zu erkennen.



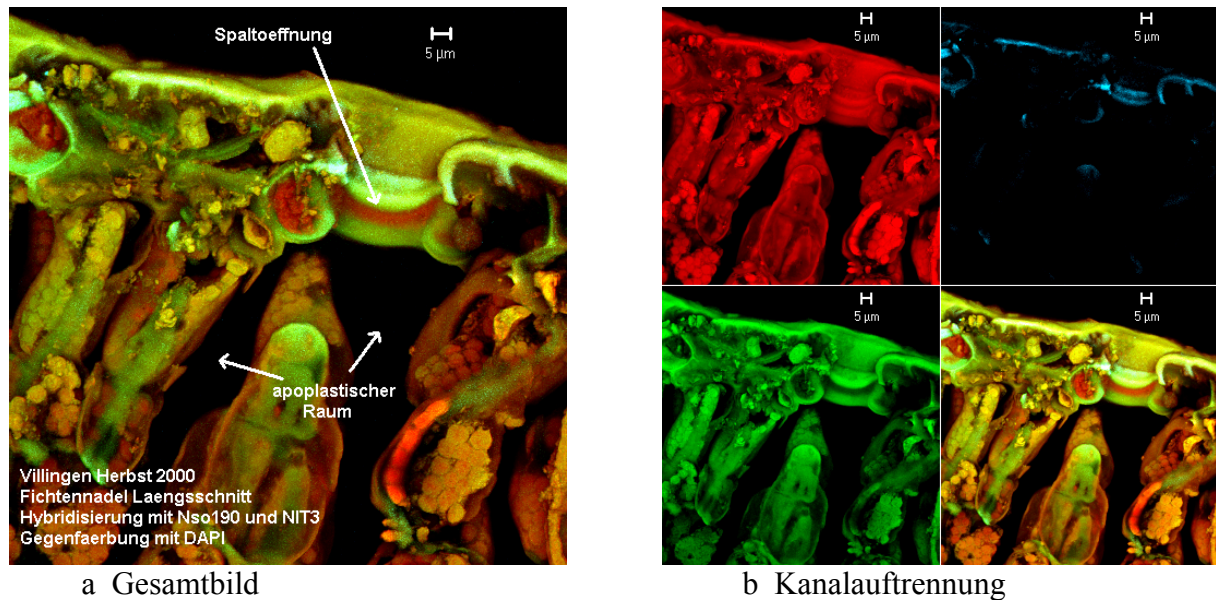
**Abb. 3.70: Auftrennung der Abbildung 3.69 in die jeweiligen Detektionskanäle;** oben rechts ist der Kanal des UV-Lasers mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 364$  nm (Blau; DAPI-Signal), oben links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 543$  nm (Rot; Sonde Nso190 mit ROX) und unten links der Kanal für den Laser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm (Grün; Sonde NIT3 mit FITC) abgebildet; deutlich sind die entsprechenden Fluoreszenzsignale in den Kanälen (s. Kreis) zu erkennen; rechts unten ist das Gesamtbild aus der Integration aller drei Einzelkanäle zu sehen

In den Fichtennadeln aus dem Höglwald des Frühlings 2001 hingegen konnten bis zum Abschluß der Arbeit keine autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplast entdeckt werden.

Als Endergebnis konnte festgehalten werden, daß außer in der Probenahme im Frühling 2001 des Höglwaldes in allen anderen Probenahmen eindeutig autotrophe Nitrifizierer entdeckt, identifiziert und im Nadelblatt-Apoplasten lokalisiert werden konnten, wie aus den repräsentativen Abbildungen 3.60 bis 3.70 klar hervorgeht. Zudem konnten die autotrophen Nitrifizierer sowohl in den Fichtennadeln aus dem unteren Kronenbereich als auch in Fichtennadeln des oberen Kronenbereichs nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurden die Fichtennadeln vom Standort Villingen auf die Anwesenheit autotropher Nitrifizierer mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung überprüft. Zusammenfassend konnte dabei festgehalten werden, daß bis zum Abschluß dieser Arbeit in den Fichtenna-

delproben von Villingen vom Herbst 2000 bis Herbst 2002 weder im unteren, noch im oberen Kronenbereich der Fichten autotrophe Nitrifizierer im Nadelblattgewebe entdeckt werden konnten. Repräsentativ für die Untersuchungsreihen aus dem unteren Kronenbereich der Fichten zeigt Abbildung 3.71 einen Fichtennadel-Längsschnitt vom Standort Villingen der Probenahme Herbst 2000.

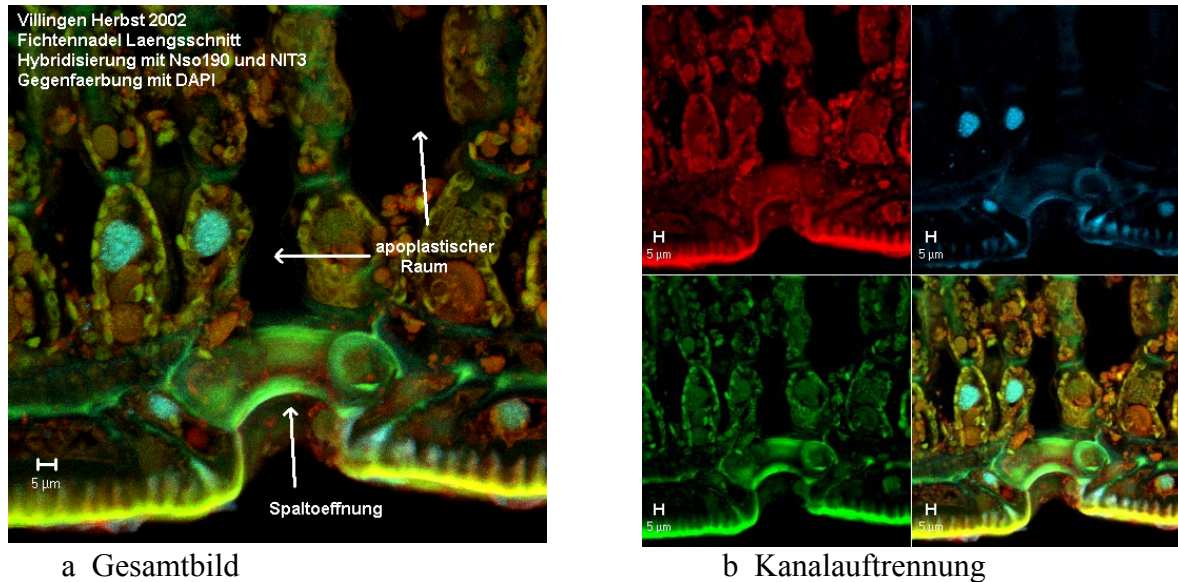


**Abb. 3.71: Fichtennadel-Längsschnitt Villingen Herbst 2000;** in der Abbildung ist unter dem Nadelrand, der aus Epi- und Hypodermis gebildet wird, das Palisadenparenchym, der apoplastischen Raum und eine Spaltöffnung zu sehen; autotrophe Nitrifizierer konnten nicht detektiert werden; das Bild wurde durch die Integration von 58 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 31,4 µm erstellt

Für den Nachweis, daß in der Fichtennadel aus Villingen tatsächlich keine Fluoreszenzsignale zu finden waren, die auf die Anwesenheit von Mikroorganismen und besonders autotrophen Nitrifizierer schließen ließen, wurde das Gesamtbild 3.71 a in die einzelnen Detektionskanäle der jeweiligen Laser aufgetrennt (s. Abb. 3.71 b). Sollten im Nadelblattgewebe Mikroorganismen vorkommen, so mußte die DNA von diesen Mikroorganismen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI anzufärben sein und im Blau-Kanal (s. Abb. 3.71 b, oben rechts) in Form von kleinen blauen Fluoreszenzsignalen, wie man sie aus der Positivkontrolle der Validierungsreihen (vgl. Abb. 3.43) entnehmen konnte, zu finden sein. Im Blau-Kanal konnten jedoch in keinem der Fichtennadelpräparate, die aus den Nadelproben des unteren Kronenbereiches vom Standort Villingen angefertigt wurden, blaue Fluoreszenzsignale gefunden werden. Daraus wurde geschlossen, daß keine DNA-Moleküle von Mikroorganismen, und damit diese selbst, im Nadelblattgewebe vorkamen. Für die autotrophen Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer spezifische Fluoreszenzsignale, wie sie nach der *in situ*-Hybridisierung in den Positivkontrollen (s. Abb. 3.44 und 3.45) der Validierungsreihen zu finden waren, waren im Rot-Kanal (s. Abb. 3.71 b, oben links) für die Detektion der Signale der Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 für die Ammoniak-Oxidierer



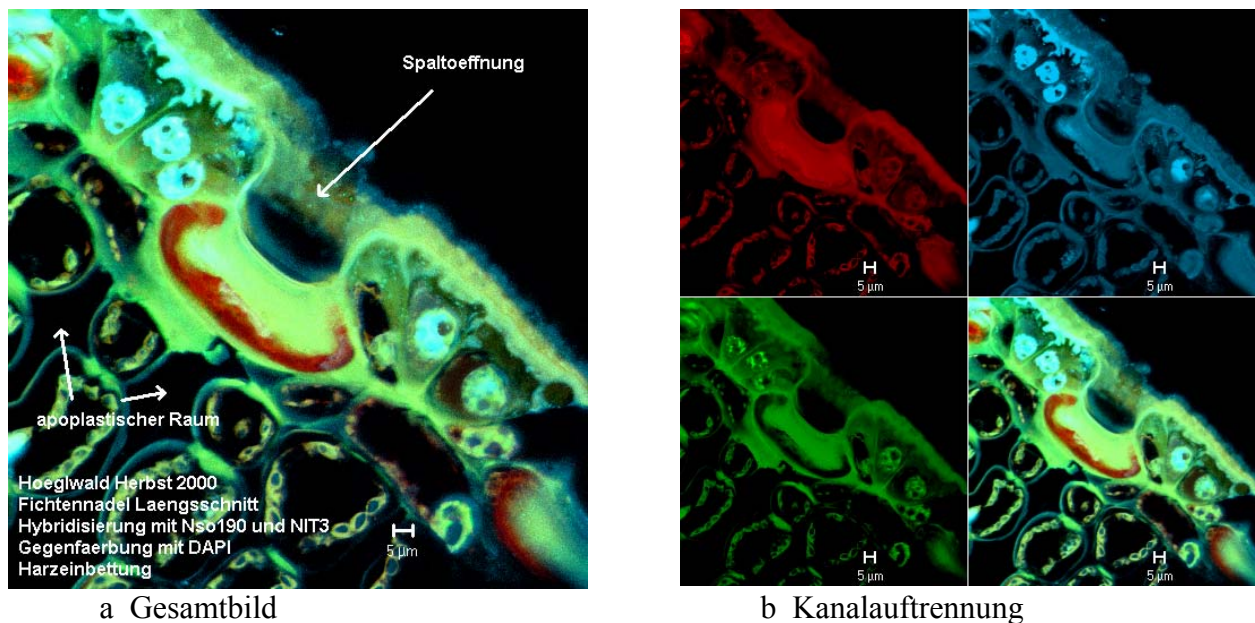
und auch im Grün-Kanal (s. Abb. 3.71 b, unten links) für die Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 für *Nitrobacter* nicht zu erkennen. Repräsentativ für die zahlreichen Untersuchungen von Fichtennadeln aus dem oberen Kronenbereich zeigt Abbildung 3.72 einen Längsschnitt durch eine Fichtennadel vom Standort Villingen aus dem Herbst 2002.



**Abb. 3.72: Fichtennadel-Längsschnitt Villingen Herbst 2002;** in der Abbildung ist unten der Nadelrand, darüber das Palisadenparenchym, der apoplastischen Raum und eine Spaltöffnung zu sehen; autotrophe Nitrifizierer konnten nicht detektiert werden; das Bild wurde durch die Integration von 22 Einzelbildern aus einem Bilderstapel mit einer Gesamthöhe von 16,8 µm erstellt

In der Auftrennung der Abbildung 3.72 a in die jeweiligen Detektionskanäle (s. Abb. 3.72 b) waren in keinem der Kanäle, weder im Blau-Kanal für den DAPI-Nachweis (s. Abb. 3.72 b, oben rechts), noch im Rot-Kanal (s. Abb. 3.72 b, oben links) für den Nachweis der Ammoniak-Oxidierer über die Oligodesoxynukleotid-Sonde Nso190 mit dem Farbstoff ROX oder im Grün-Kanal (s. Abb. 3.72 b, unten links) zum Nachweis der Nitrit-Oxidierer über die spezifische Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 mit dem Farbstoff FITC, die für die Anwesenheit der autotropen Nitrifizierer so charakteristischen Fluoreszenzsignale (vgl. Positivkontrollen der Validierung (Abb. 3.43 – 3.45) im Nadelblattgewebe zu entdecken. Die Untersuchungen der Fichtennadelproben aus dem oberen Kronenraum der Fichten aus Villingen ergaben bis zum Abschluß dieser Arbeit keine positiven Ergebnisse. Autotrophe Nitrifizierer konnten nicht nachgewiesen werden.

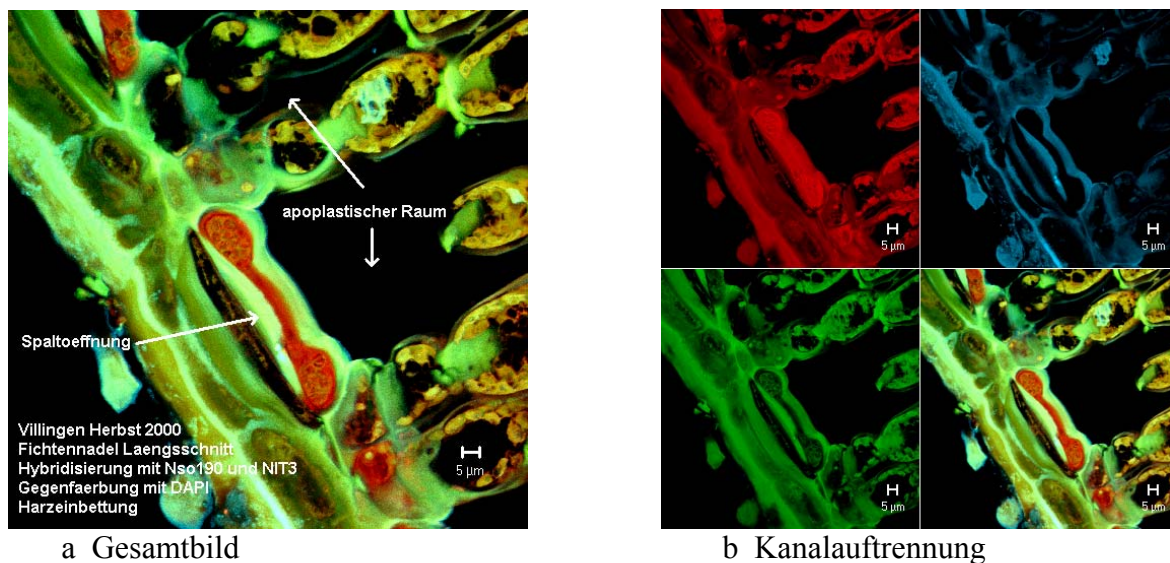
Nach dem erfolgreichen Nachweis der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichtennadeln vom Standort Höglwald über die Anfertigung von Fichtennadel-Präparaten über die Gerfriereinbettung wurden in weiteren Versuchsreihen Fichtennadel-Präparate über die Einbettung in Kunstharz (s. 2.9.3.2) angefertigt. Hierbei konnten jedoch nur 10 - 20 µm dünne Schnitte angefertigt werden. Das Kunstharz wurde aufgrund der Dünne der Fichtennadel-Längsschnitte nicht aus den Präparaten herausgelöst, um eine Kontamination während der *in situ*-Hybridisierung zu unterbinden und gleichzeitig einen evtl. Verlust von Bakterien im Nadelblattgewebe auszuschließen. Repräsentativ für diese Untersuchungen sind im folgenden Abbildungen von Fichtennadel-Präparaten von den Standorten Höglwald und Villingen zu sehen. Abbildung 3.73 zeigt einen Längsschnitt einer Fichtennadel vom Standort Höglwald aus der Probenahme Herbst 2000. Das Bild wurde aus einem Bilderstapel mit 10 Einzelbildern, die eine Stapelhöhe von 7,6 µm umschlossen, gebildet. Das Kunstharz, welches im weiteren Präparationsverlauf nicht mehr herausgelöst wurde, zeigte, wie man aus Abbildung 3.73 a sehen kann, keine Auto-fluoreszenz. Zu erkennen waren eine Spaltöffnung im Nadelrand und das darunterliegende Palisadenparenchym. Charakteristische Fluoreszenzsignale für autotrophe Nitrifizierer, wie sie z.B. aus der Abbildung 3.60 oder 3.69 zu entnehmen waren, waren in der Abbildung nicht zu sehen.



**Abb. 3.73: Fichtennadel-Längsschnitt Höglwald Herbst 2000 Kunstharzeinbettung;** zu erkennen ist eine Spaltöffnung und das darunterliegende Palisadenparenchym; Fluoreszenzsignale von autotrophen Nitrifizierer sind im Gewebe nicht zu sehen; der Bilderstapel besteht aus 10 Einzelbilder und hat eine Höhe von 7,6 µm

Für die genaue Analyse von Fluoreszenzsignale wurde auch in diesem Fall das Bild der Abbildung 3.73 a in die einzelnen Detektionskanäle der jeweiligen Laser aufgetrennt und in Abbildung 3.73 b dargestellt. Im Blau-Kanal (oben rechts) zum Nachweis für die Fluoreszenzsignale

des Farbstoffes DAPI waren keine für die Mikroorganismen charakteristischen kleinen blauen Signale im Zellzwischenraum und auf den Zellwänden zu entdecken, obgleich man erkennen konnte, daß der Farbstoff DAPI gut in das Präparat eingedrungen war und das Präparat angefärbt hatte. Rote Fluoreszenzsignale für den an die für Ammoniak-Oxidierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde gebundenen Farbstoff ROX waren im Rot-Kanal im linken oberen Teilbild nicht zu finden. Dasselbe traf für den Nachweis auf Nitrit-Oxidierer mit dem Farbstoff FITC, der an die spezifische Oligodesoxynukleotid-Sonde NIT3 gebunden war, bei der Überprüfung des Grün-Kanals zu. In allen anderen Fichtennadel-Präparaten aus der Kunstharzeinbettung vom Standort Höglwald, also die Proben aus dem Frühling und Herbst 2001 und 2002 wurden keine Fluoreszenzsignale gefunden. Nach der Untersuchung der Fichtennadelproben aus dem Höglwald wurden im Anschluß die Fichtennadelproben des Standortes Villingen auf das Vorkommen von autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten überprüft. Auch in diesen Untersuchungsreihen konnten in allen Fichtennadelpräparaten bis zum Abschluß der Arbeit keine autotrophen Nitrifizierer im Nadelblattgewebe aufgefunden werden. Repräsentativ für die Nadelpräparate aller Probenahmen von Herbst 2000 bis Herbst 2002 zeigt Abbildung 3.74 a ein Fichtennadelpräparat aus Villingen aus dem Herbst 2000.



**Abb. 3.74: Fichtennadel-Längsschnitt Villingen Herbst 2000 Kunstharzeinbettung;** zu erkennen ist eine Spaltöffnung und das darüberliegende Palisadenparenchym; charakteristische Fluoreszenzsignale von autotrophen Nitrifizierern waren im Gewebe nicht zu sehen; der Bilderstapel besteht aus 42 Einzelbilder und hat eine Höhe von 20,5 µm

Die Abbildung zeigt eine Spaltöffnung in der Epidermis der Fichtennadel und darüber das Palisadenparenchym mit entsprechenden Zellzwischenräumen. Wie in Abbildung 3.73 – dem Fichtennadelpräparat der Höglwaldprobe – waren auch in diesem Präparat im apoplastischen Raum keine charakteristischen Fluoreszenzsignale für die autotrophen Nitrifizierer zu entdecken.

Das Bild aus Abbildung 3.74 a wurde durch die Integration aus insgesamt 42 Einzelbildern erstellt und umfaßte eine Bilderstapelhöhe von 20,5  $\mu\text{m}$ . In diesem Präparat wurde das Kunstharz ebenfalls nicht aus dem Gewebe herausgelöst. Die Auftrennung der Abbildung 3.74 a in die einzelnen Detektionskanäle zur Kontrolle der Fluoreszenzsignale ist in Abbildung 3.74 b dargestellt. In der Auftrennung konnten keine charakteristischen Fluoreszenzsignale für autotrophe Nitrifizierer gefunden werden.

Die Einbettung der Fichtennadeln in Kunstharz und die Anfertigung der - im Vergleich zu den 100  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte aus der Gefriereinbettung – 10 – 20  $\mu\text{m}$  dünnen Längsschnitte der Fichtennadeln ergaben, daß nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der sich anschließenden Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop keine autotrophen Nitrifizierer gefunden werden konnten. Weder in den Proben des Standortes Höglwald noch in den Proben aus Villingen konnten zu allen Probenahmezeitpunkten autotrophe Nitrifizierer detektiert werden.

Als Gesamtergebnis der Versuchsreihen zur Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der Fichtennadelproben und der anschließenden Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop konnte festgehalten werden, daß es weltweit erstmalig eindeutig gelungen ist, autotrophe Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten von Fichtennadeln direkt nachzuweisen und dort auf der Außenseite der Zellwände des Palisadenparenchym genau zu lokalisieren. Als weiteres konnte man aus den Ergebnissen entnehmen, daß die autotrophen Nitrifizierer nur in den Fichtennadeln der Proben des durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteten Standortes Höglwald zu finden waren, während in den Fichtennadeln des durch Stickstofflimitierung gekennzeichneten Standortes Villingen bis zum Abschluß dieser Arbeit zu keiner Zeit in keiner der Proben autotrophe Nitrifizierer zu entdecken waren. In den Proben aus dem Höglwald waren die autotrophen Nitrifizierer zu allen Probenahmezeitpunkten bis auf den Frühling 2001 zu finden. Sie waren ebenso im unteren Kronenbereich der Fichten (2 – 10 m) als auch im oberen Bereich (ca. 35 m Höhe) der Fichtenkronen zu finden. Aus Abbildung 3.63 und 3.72 ist zu erkennen, daß die Kolonien der autotrophen Nitrifizierer direkt unter den Spaltöffnungen der Fichtennadelblätter zu finden waren. Sie kamen aber auch direkt im Palisadenparenchym der Nadelblätter vor, wie man in Abbildung 3.68 und 3.70 sehen konnte. Die Kolonien der autotrophen Nitrifizierer konnten sowohl mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI als auch mit den jeweiligen Oligodesoxynukleotid-Sonden eindeutig und problemlos markiert, detektiert und damit identifiziert werden. Besonders deutlich wurde dies bei der Auswertung der Fluoreszenzsignale über die Auftrennung in die jeweiligen Detektionskanäle der einzelnen Laser. Zudem konnte über die Aufnahme der Profile und Intensitäten der Fluoreszenzsignale sowohl in den Bilderstapeln als auch in den Einzelbildern klar der Beweis der Lokalität, der Zuordnung und der Stärke der Fluoreszenzsignale erbracht werden. Durch die Einzelbilddarstellung der Bilderstapel war ferner eindeutig nachweisbar, daß die Kolonien der autotrophen Nitrifizierer direkt im Gewebe saßen und nicht durch eine Kontamination durch die Schnittanfertigung in das Gewebe gelangt waren. Der Nachweis der autotrophen Ni-



trifizierer wurde aus den 100 µm dicken Nadellängsschnitten geführt, die aus der Gefriereinbettung angefertigt wurden. In den Fichtennadelpräparaten, die mit Kunstharzeinbettung hergestellt wurden, konnten keine autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen werden.

#### 3.3.1.4 Quantifizierung autotropher Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten

Neben den qualitativen Untersuchungen der Fichtennadelproben der Standorte Höglwald und Villingen, die sowohl den indirekten Nachweis über die MPN-Technik als auch den direkten Beweis des Vorkommens der chemolithoautotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit dem konfokalen Laserrastermikroskop erbrachten, sollte zusätzlich eine quantitative Auswertung über die mikroskopischen Bilder erfolgen. Eine erste quantitative Auswertung über die MPN-Methode, bei der indirekt durch den Nachweis der Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat die autotrophen Nitrifizierer detektiert und über ein Tabellenwerk abgeschätzt wurden, ergab (s. 3.3.1.1) Zellzahlen von  $8,28 \times 10^3 - 6,59 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht. Im weiteren Versuchsablauf sollten die Bakterien zusätzlich mikroskopisch im Nadelblattgewebe direkt quantitativ erfaßt werden. Dieser quantitative Nachweis sollte über die Auswertung der emittierten Fluoreszenzsignale der markierten Bakterienzellen der autotrophen Nitrifizierer erfolgen. Wie aus den Abbildungen 3.63, 3.68, 3.70 und 3.72 hervorgeht, zeigte das Erscheinungsbild der autotrophen Nitrifizierer kolonieartige Aggregate, in welchen nur äußerst schwer einzelne zelluläre Erscheinungen zu erkennen waren. Aufgrund der Aggregation und der damit verbundenen Schleim- und Biofilmbildung jedoch konnte keine klare Zuordnung und Abgrenzung der einzelnen Bakterienzellen und der jeweiligen Fluoreszenzsignale erreicht werden. Die technische Ausstattung des konfokalen Laserrastermikroskops mit dem Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat 63x/1.2W corr als leistungsstärkstes Objektiv erwies sich als nicht geeignet, da eine weitere Vergrößerung auf 100-fach und eine damit verbundenen klarerer Darstellung der fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen, nicht möglich war. Eine höhere Auflösung der Bilddarstellung über das Computerprogramm der Bildverarbeitung durch eine Erhöhung der Pixelzahl von 512 x 512 auf maximal 2048 x 2048 erbrachte zwar eine größere Auflösung der durch den Computer generierten digitalen Bilddarstellung, jedoch konnten damit nicht die Unschärfen bedingt durch die fehlenden optischen Auflösung und durch die fehlende deutliche Zellabgrenzung innerhalb der Bakterienaggregate beseitigt werden. Zudem erhöhte sich die Verweilzeit des Laserstrahles auf dem Präparat, was zur Folge hatte, daß die Fluoreszenzfarbstoffe durch diese übermäßige Belastung vorzeitig ausbleichten. Eine Vergrößerung über das Bildverarbeitungsprogramm erwies sich ebenfalls als nicht anwendbar, da es sich zum einen nur um eine Vergrößerung des digitalen Computerbildes handelt und nicht um eine wirkliche Vergrößerung, und zum anderen diese Bildvergrößerung zu einer Auftrennung des Bildes in die jeweiligen Pixel führte. Eine saubere Darstellung zellulärer



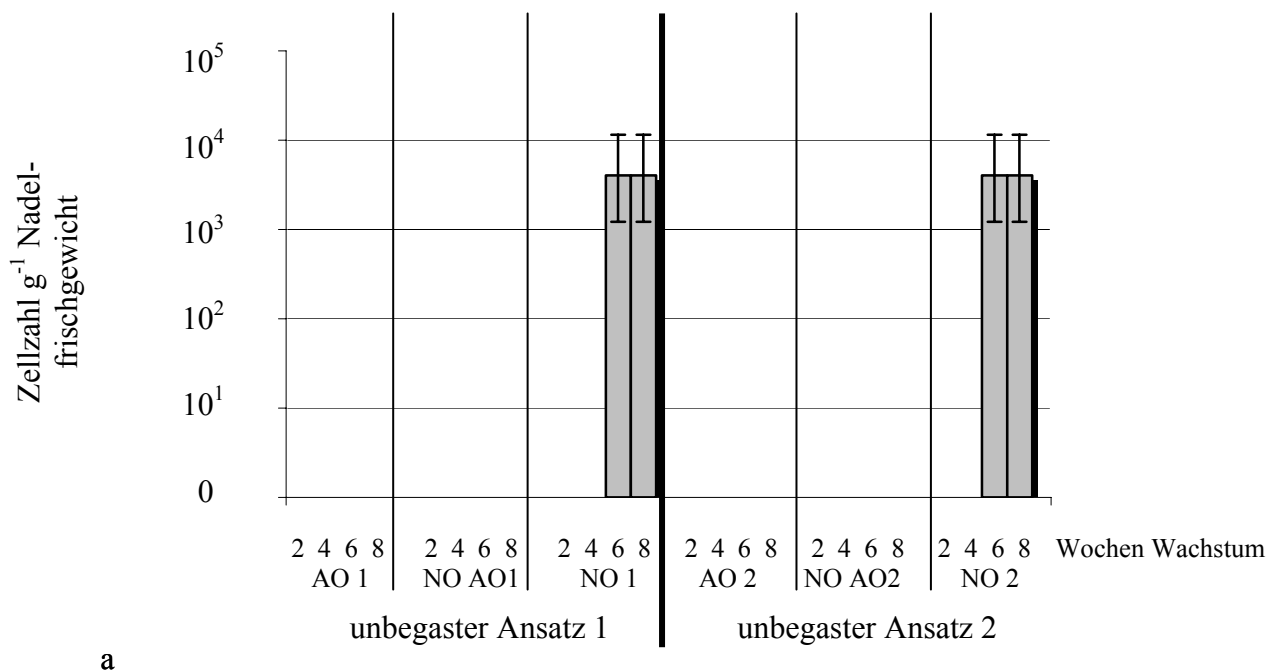
Strukturen und die Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu diesen Zellen war nicht möglich. Eine manuelle Auszählung der einzelnen Bakterienzellen war daher aufgrund der unscharfen Bildqualität, bedingt durch die nicht mehr steigerbare optische Auflösung durch die vorhandenen Objektive, den nicht klar voneinander zu trennenden Bakterienzellen, hervorgerufen durch die Koloniebildung und der Neigung zur Biofilmbildung der autotrophen Nitrifizierer, und der damit nicht eindeutig zuzuordnenden Fluoreszenzsignale nicht möglich. Die räumliche Lage der einzelnen Bakterienzellen im Pflanzengewebe und die Zuordnung zu den benachbarten Bakterienzellen war aufgrund der Unschärfe auch nicht mit einer dreidimensionalen Untersuchung des Präparates bzw. des Bilderstapels möglich. Zusammenfassend konnte man daher festhalten, daß eine exakte Quantifizierung wegen der fehlenden optischen Auflösung und der nicht eindeutigen Abgrenzung der Bakterienzellen in den Kolonien und der Fluoreszenzsignale nicht möglich war.

### **3.3.2 Hinweise zum Besiedlungsvorgang des Apoplasten bei Fichtenkeimlinge**

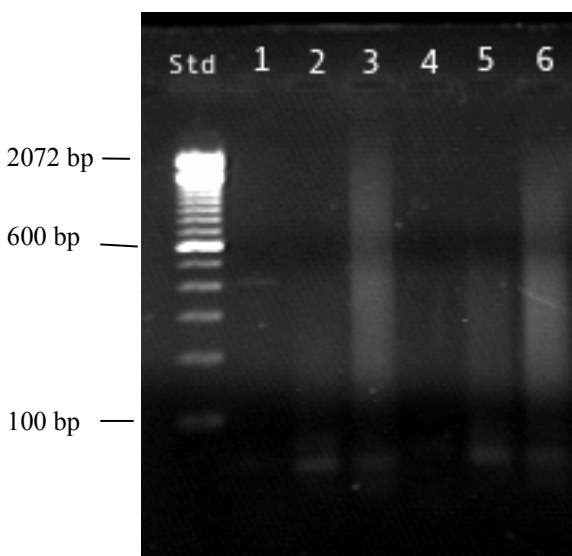
Nach dem erfolgreichen Nachweis und der genauen Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten in den Fichtennadelproben des durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteten Standortes Höglwald stellte sich die Frage des Besiedlungsvorganges und der zeitlichen Entwicklung der Besiedlung der Bakterien im Fichtennadel-Apoplasten. Für die Erarbeitung erster Hinweise zu dieser Fragestellung wurden zunächst Fichtenkeimlinge im Labor steril angezogen und im Anschluß mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert. Die Überprüfung der Besiedlung des Apoplasten der Nadeln von den Fichtenkeimlingen erfolgte mit denselben Untersuchungstechniken, die für den Nachweis, die Lokalisation und die Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer im Fichtenmaterial aus den Standorten der Natur verwendet wurden. In regelmäßigen Abständen von 2 Monaten wurden Nadelproben entnommen und auf die Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierer hin untersucht. In den folgenden Versuchsreihen wurden zunächst die Proben über die MPN-Technik mit entsprechender Kontrolle der MPN-Ansätze über die PCR-Technik überprüft. Daran schloß sich die Untersuchung der Fichtennadel über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs-Technik in Kombination mit dem konfokalen Laserrastermikroskop an. Im Jahr 2000 wurden die Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert, die aus der Nadelstreu des Höglwaldes angereichert wurden. Eine Wiederholung des Versuches erfolgte im Jahr 2001, wobei die Fichtenkeimlinge mit einer Reinkultur des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* inokuliert wurden.

### 3.3.2.1 Untersuchung der Fichtenkeimlinge über die MPN-Technik

Um die Sterilität der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Keimlinge zu überprüfen, wurden in den ersten Versuchsreihen zunächst die Nadelproben ohne jegliche Bakterieninokulation untersucht. Der Ansatz für die MPN-Kulturröhrchen erfolgte wie im Methoden- und Material-Teil unter 2.7 beschrieben. Nach Abschluß der letzten Auswertung der MPN-Ansätze folgte die DNA-Gewinnung aus den Kulturröhrchen mit der sich anschließenden Kontrolle auf Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierer über die PCR-Technik. Getestet wurden die Fichtennadeln sowohl der Fichtenkeimlinge, die mit 20 ppm Ammoniak begast wurden, als auch der Keimlinge, die nicht begast wurden. Das Ergebnis der Versuchsreihe der unbegasteten Fichtenkeimlinge ist in Abbildung 3.75 a und b wiedergegeben.



a

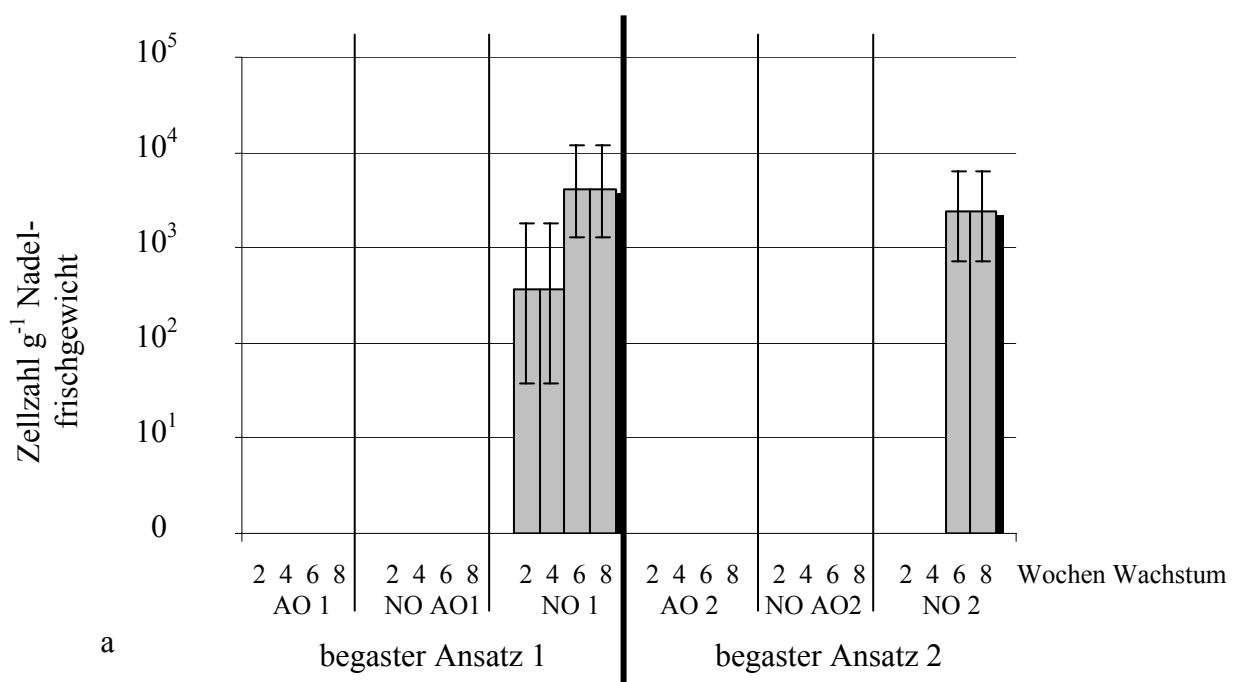


b

**Abb. 3.75 a: MPN-Ansatz Negativkontrolle unbegast;** in beiden Ansätzen wurden Nitrit-Oxidierer mit einer Zellzahl von  $4 \times 10^3$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; Ammoniak-Oxidierer und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf Vorkommen von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

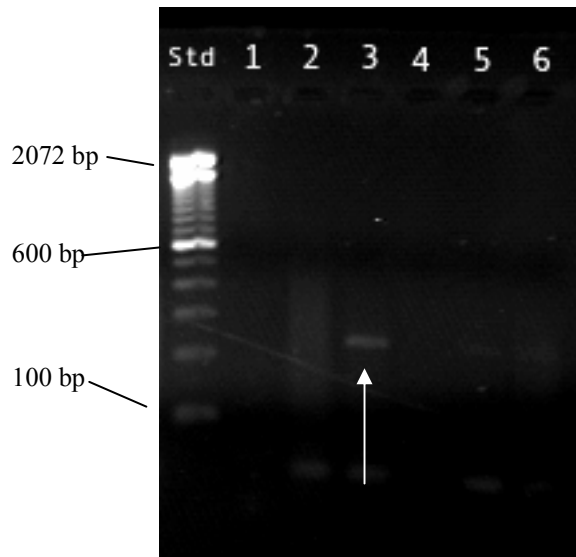
**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Negativkontrolle unbegast;** in den Spuren 1, 2, 4 und 5, welche die PCR-Amplifikate der Ammoniak-Oxidierer und der mit ihnen vergesellschafteten Nitrit-Oxidierer enthalten sollten, sind keine DNA-Banden zu erkennen; Nitrit-Oxidierer konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden, wie in Spur 3 und 6 zu erkennen ist; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Die Auswertung des MPN-Doppelansatzes (s. Abb. 3.75 a) ergab, daß Ammoniak-Oxidierer nicht nachgewiesen werden konnten (AO 1 und AO 2). Auch Nitrit-Oxidierer, die mit den Ammoniak-Oxidierern vergesellschaftet sein konnten, wurden in den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer nicht nachgewiesen (NO AO1 und NO AO2). Dagegen konnten Nitrit-Oxidierer, allein kultiviert, (NO1 und NO2) ab der 6. Wachstumswoche mit  $4 \times 10^3$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden werden. Eine im Anschluß an die letzte MPN-Auswertung erfolgte Kontrolle auf autotrophe Nitrifizierer über die PCR-Technik (s. Abb. 3.75 b) konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Ammoniak-Oxidierer und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer wurden nicht gefunden, wie aus den Spuren 1, 2, 4 und 5 an den fehlenden DNA-Banden zu erkennen ist. Auch Nitrit-Oxidierer, die im MPN-Ansatz mit noch  $4 \times 10^3$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht deutlich detektiert werden konnten, waren nicht nachzuweisen, wie man anhand der fehlenden DNA-Banden im Agarose-Gel erkennen konnte (s. Spur 3 und Spur 6). Im Anschluß erfolgte die Überprüfung der mit Ammoniak begasten und herangezogenen Fichtenkeimlinge auf Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierern. Die Ergebnisse hierzu sind aus Abbildung 3.76 a und b zu entnehmen.



**Abb. 3.76 a: MPN-Ansatz Negativkontrolle begast;** im Ansatz 1 (NO 1) wurden Nitrit-Oxidierer in der 2. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von  $350 \text{ Zellen g}^{-1}$  Nadelfrischge-

wicht gefunden; diese Anzahl stieg im weiteren Verlauf auf 4300 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht an, während im Ansatz 2 (NO 2) in der Endauswertung die Bakterienzahl auf 2300 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht stieg; Ammoniak-Oxidierer und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden



b

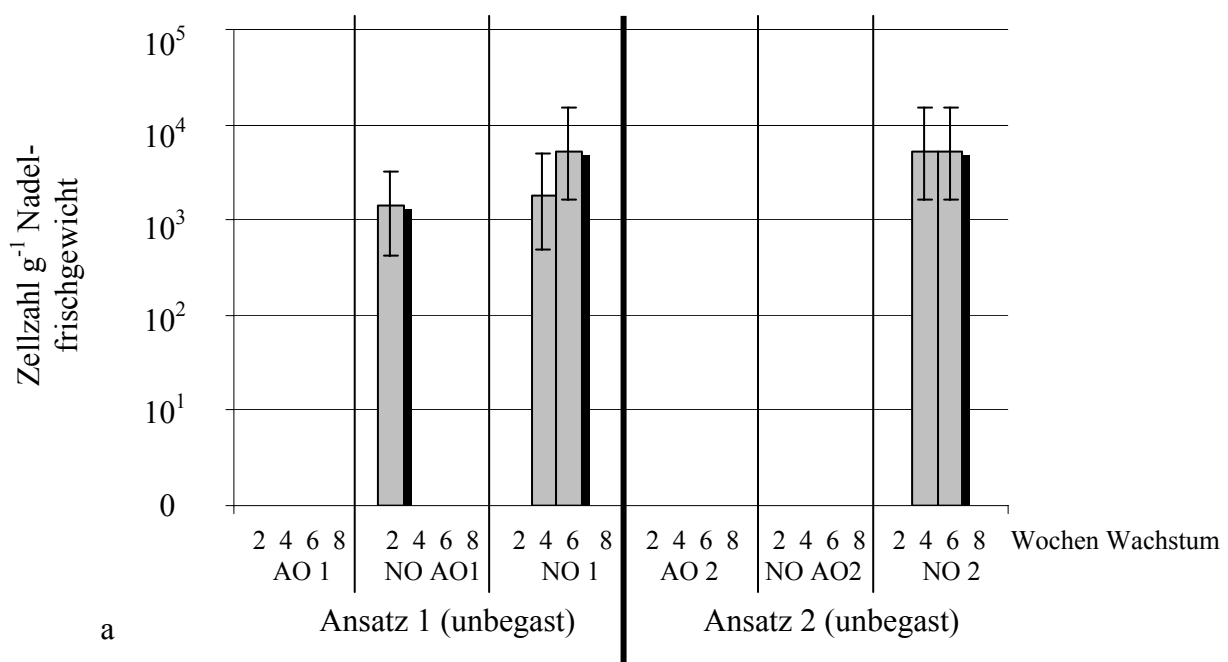
**b: PCR-Kontrolle des MPN-Ansatzes Negativkontrolle begast;** das Agarose-Gel zeigt keine DNA-Banden der Ammoniak-Oxidierer und der mit ihnen vergesellschafteten Nitrit-Oxidierer in den Spuren 1, 2, 4 und 5; Nitrit-Oxidierer konnten dagegen im Ansatz 1 in Spur 3 anhand der DNA-Bande des PCR-Amplifikates nachgewiesen werden (s. Pfeil); in Spur 6 – Ansatz 2 – sind keine DNA-Bande und damit keine Nitrit-Oxidierer zu finden; Spur 1: AO 1; Spur 2: NO AO1; Spur 3: NO 1; Spur 4: AO 2; Spur 5: NO AO 2; Spur 6: NO 2; Std.: 100 bp Längenstandard

Zunächst sind in Abbildung 3.76 a die Ergebnisse des MPN-Doppelansatz dargestellt. Ammoniak-Oxidierer und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (AO 1, AO 2 und NO AO1, NO AO2) konnten nicht nachgewiesen werden. Bei der Überprüfung auf Nitrit-Oxidierer im MPN-Ansatz 1 (NO 1) hingegen wurden bereits ab der 2. Kultivierungswoche 350 Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht, im weiteren Verlauf 4200 Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht und in Ansatz 2 (NO 2) ab der 6. Kultivierungswoche 2300 Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen. Die Kontrolle der MPN-Ergebnisse über die PCR-Technik (s. Abb. 3.76 b) zeigte in Ansatz 1 (s. Spur 3, Pfeil) eindeutig Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter*. In Ansatz 2 (s. Spur 6) waren keine Bakterien über die PCR-Kontrolle zu finden. Ammoniak-Oxidierer und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (Spuren 1, 2, 4 und 5) konnten nicht detektiert werden.

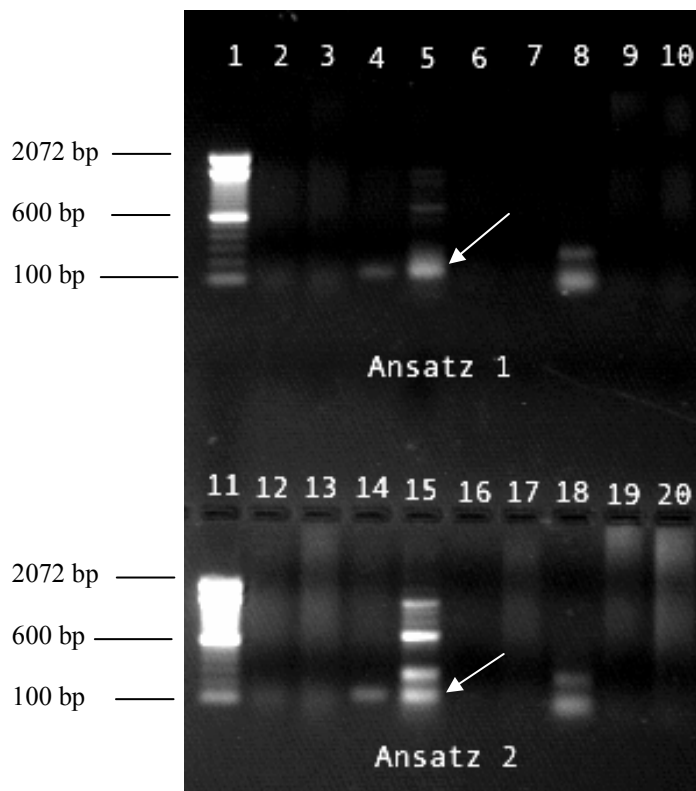
In beiden MPN-Versuchsreihen der Negativkontrollen war in den MPN-Kulturröhrchen ein pilzartiger Bewuchs zu finden. In den im Labor steril aufgezogenen Fichtenkeimlingen konnten über die MPN-Methode autotrophe Nitrit-Oxidierer nachgewiesen werden. Die Kontrolle der

MPN-Ansätze über die PCR-Technik ergab jedoch, daß diese Ergebnisse bei der Versuchsreihe mit den unbegasten Fichtennadeln nicht zu bestätigen waren. In der Versuchsreihe mit den mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlingen wurden ebenfalls über die MPN-Technik Nitrit-Oxidierer nachgewiesen. Hier ergab eine Überprüfung der Kulturröhrchen über die PCR-Technik hingegen im Ansatz 1 des Doppelansatzes, daß autotrophe Nitrit-Oxidierer vorhanden waren.

Im Anschluß an die Versuchsreihen der Negativkontrollen zur Überprüfung der Sterilität erfolgte die erste Versuchsreihe für das Jahr 2000. In dieser Versuchsreihe wurden die im Labor steril aufgezogenen Fichtenkeimlinge im Alter von 2 Monaten mit autotrophen Nitrifizierern, die aus der Nadelstreu des Höglwaldes angereichert worden waren, mit Hilfe eines Zerstäubers auf die Nadeloberfläche inokuliert. Die Konzentration lag zwischen  $5 - 7 \times 10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Unmittelbar im Anschluß daran erfolgte die erste Probenahme zur Überprüfung des Erfolges der Inokulation. Die Ergebnisse der Inokulation sind aus der Abbildung 3.77 a und b zu entnehmen. Abbildung 3.77 a zeigt zuerst die Auswertung des MPN-Doppelansatzes.



**Abb. 3.77 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2000 erste Probenahme;** Ammoniak-Oxidierer wurden zu keiner Zeit gefunden; Nitrit-Oxidierer in den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierern wurden im Ansatz 2 (NO AO2) nicht entdeckt; hingegen konnten im Ansatz 1 (NO AO1) 1400 Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der 2. Wachstumswoche nachgewiesen werden; in Ansatz 1 (NO 1) wurden Nitrit-Oxidierer ab der 4. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von 1700 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; diese Anzahl stieg im weiteren Verlauf auf 5300 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht an, während im Ansatz 2 (NO 2) in der Auswertung die Bakterienzahl auf 5300 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht aufwies; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden



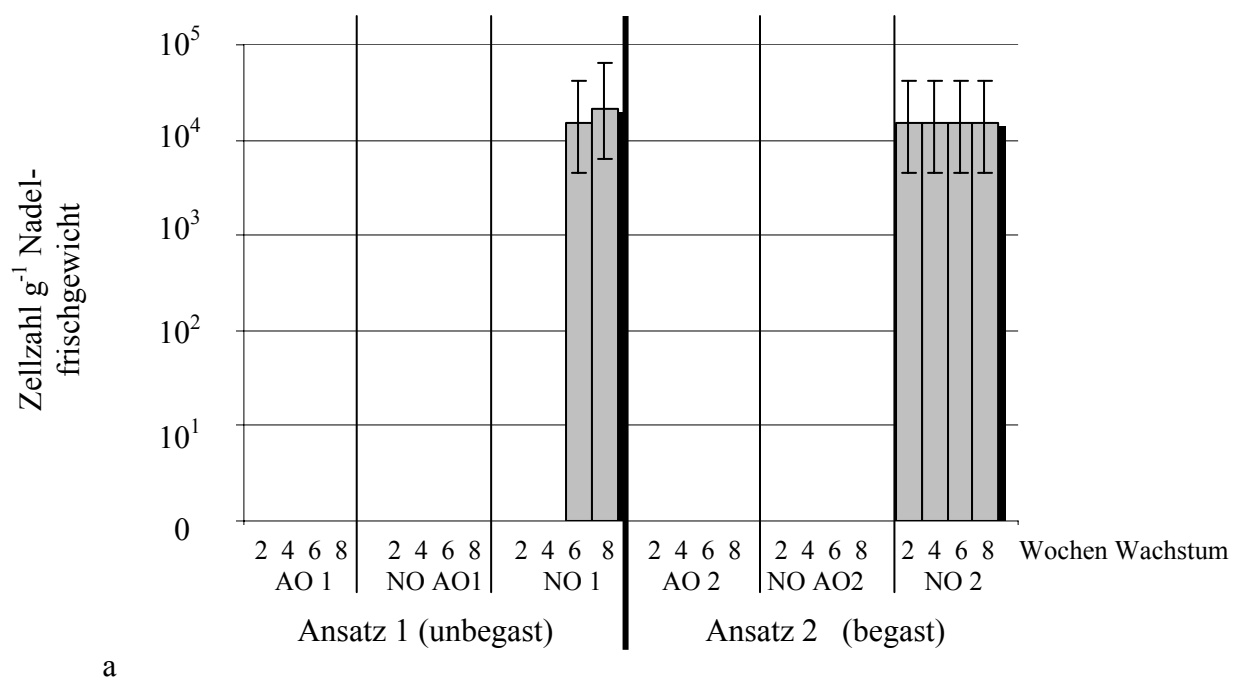
b

**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2000 erste Probenahme;** in den Spuren 5 und 15, welche die isolierte DNA aus den MPN-Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer enthalten, sind deutlich DNA-Banden im Agarose-Gel zu sehen (s. Pfeile), die entsprechend der Positivkontrolle in den Spuren 4 und 14 die richtige Länge aufweisen; Nitrit-Oxidierer (s. Spuren 6, 7, 16 und 17) konnten nicht nachgewiesen werden; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Freiburg Probe AO 1, 6. Freiburg Probe NO AO 1, 7. Freiburg Probe NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Freiburg Probe AO 2, 16. Freiburg Probe NO AO2, 17. Freiburg Probe NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

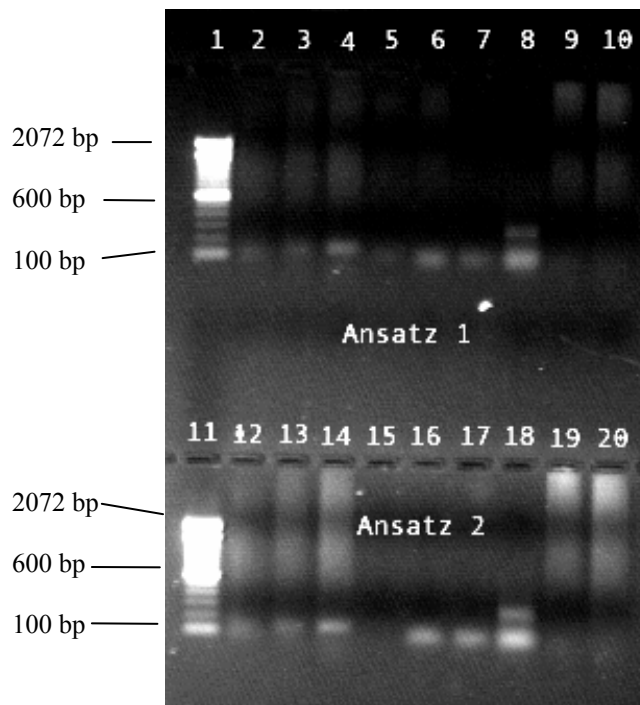
Nach der ersten Probenahme, die unmittelbar nach dem Inokulieren der Fichtenkeimlinge genommen wurde, konnten über die MPN-Technik im Doppelansatz keine Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) nachgewiesen werden. Nitrit-Oxidierer, die zusammen mit den Ammoniak-Oxidierer in denselben Röhrchen herangezogen wurden, konnten nur in Ansatz 1 (NO AO1) mit einer Zellzahl von 1400 Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht in der zweiten Wachstumswoche nachgewiesen werden, nicht jedoch in Ansatz 2 (NO AO2). Hingegen wurden Nitrit-Oxidierer, solitär kultiviert, in beiden Ansätzen (NO 1 und NO 2) ab der vierten Wachstumswoche gefunden. In Ansatz 1 (NO 1) betrug die Zellzahl 1700 Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht, während in Ansatz 2 (NO 2) die Zellzahlen 5300 Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht erreichten. In der 6. Wachstumswoche konnten in beiden Ansätze etwa 5300 Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht registriert werden. Mit Hilfe der PCR-Kontrolle konnten in beiden Ansätzen Ammoniak-Oxidierer über die

Vervielfältigung eines 116 bp-langen Genbereiches des 16S rRNA-Gens in den Spuren 5 und 15 (s. Pfeile) dokumentiert werden. Nitrit-Oxidierer konnten in beiden Ansätzen über die PCR-Kontrolle nicht gefunden werden. Die Inokulation der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierern war erfolgreich verlaufen. Über die MPN-Technik konnten jedoch nur die Nitrit-Oxidierer nachgewiesen werden, während die Ammoniak-Oxidierer im Gegensatz zu den Nitrit-Oxidierern über die PCR-Kontrolle zu registrieren waren.

Zwei Monate nach der Inokulation der Fichtenkeimlingen im Labor wurde erneut eine Probenahme durchgeführt. Die Fichtenkeimlinge hatten ein Alter von 4 Monaten. Bei dieser Probenahme wurde jeweils eine Probe von den unbegasteten und mit Ammoniak begasteten Fichtenkeimlingen genommen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.78 a und b dargestellt.



**Abb. 3.78 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2000 zweite Probenahme;** Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) wurden zu keiner Zeit gefunden; in Ansatz 1 (NO 1) wurden Nitrit-Oxidierer ab der 6. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von  $1,4 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; diese Anzahl stieg im weiteren Verlauf auf  $2,1 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an, während im Ansatz 2 (NO 2) in der Auswertung die Bakterienzahl von Anfang an  $1,4 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht aufwies; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf gleichzeitiges Vorhandensein von Nitrit-Oxidierer hin getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden



b

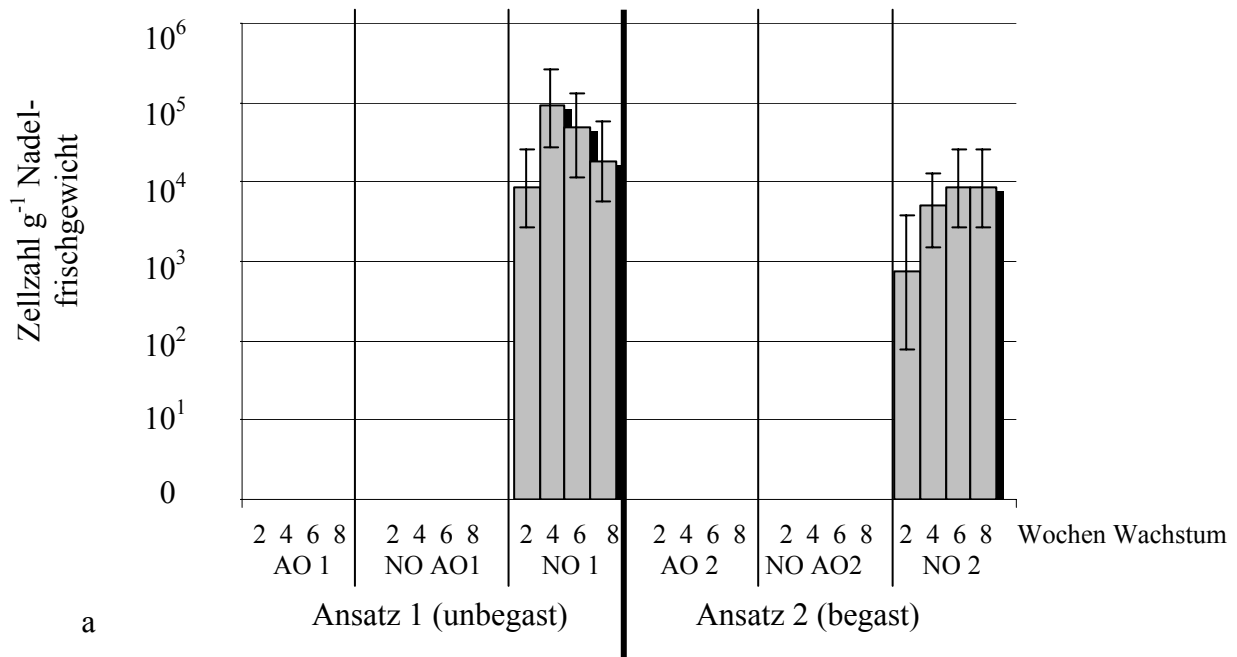
**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2000 zweite Probenahme;** Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer wurden in keinem der Fälle detektiert; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Probe unbegast AO 1, 6. Probe unbegast NO AO 1, 7. Probe unbegast NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Probe begast AO 2, 16. Probe begast NO AO2, 17. Probe begast NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Der Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über die MPN-Technik ergab, daß in beiden Ansätzen – mit Ammoniak begast und unbegast - keine Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) zu finden waren. Hingegen waren Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) zu finden. In Ansatz 1 (unbegast) wurden sie ab der 6. Wachstumswoche zu erstermal mit einer Zellzahl von  $1,4 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert und erreichten in der 8. Wachstumswoche eine Zellzahl von  $2,13 \times 10^4$  Zelle  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht. In Ansatz 2 (mit Ammoniak begast) waren die Nitrit-Oxidierer bereits in der 2. Wachstumswoche nachzuweisen und konnten über 8 Wochen hinweg mit jeweils  $1,48 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht registriert werden. Die PCR-Kontrolle zeigte, daß in beiden Ansätzen, Ansatz 1: Spur 5 bis 7 und Ansatz 2: Spur 15 bis 17, weder Ammoniak- noch Nitrit-Oxidierer über die Vervielfältigung der 16S rRNA-Gene zu entdecken waren. Es waren keine DNA-Banden der PCR-Amplifikate zu erkennen.

Als dritte und letzte Probenahme der Versuchsreihe des Jahres 2000 wurden 4 Monate nach der Inokulation wiederum Fichtennadeln von den Fichtenkeimlingen genommen. Die Keimlinge wiesen nun ein Alter von 6 Monate auf. Auch in diesem Fall wurden jeweils zu den unbegasten

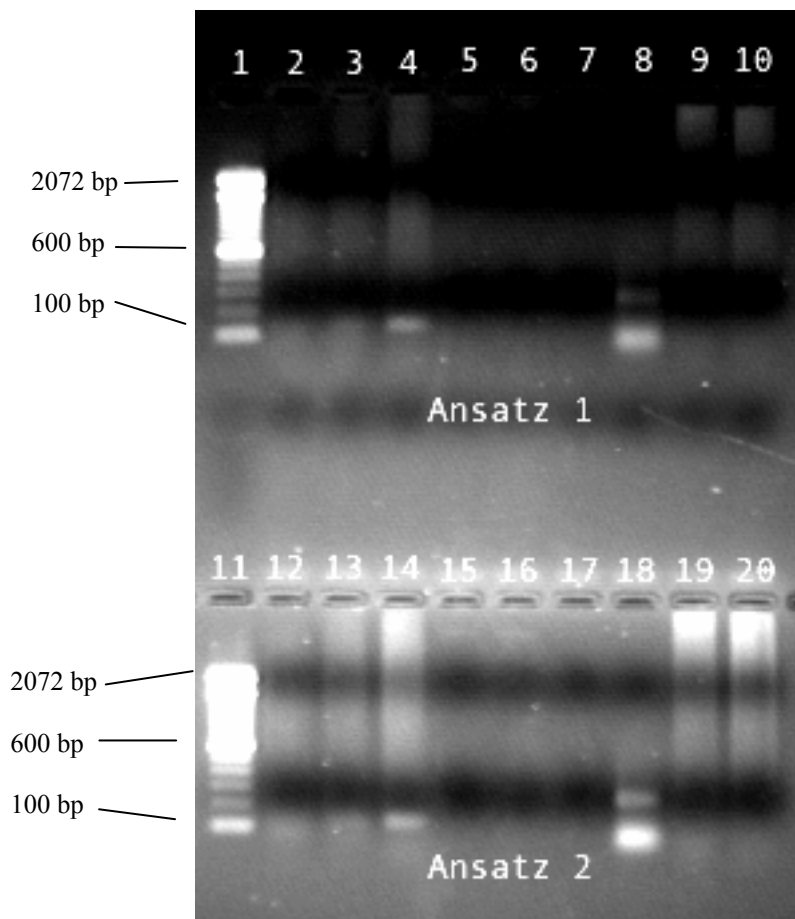


und mit Ammoniak begasten Nadelproben ein MPN-Ansatz eingerichtet. Die Ergebnisse aus dieser Probenahme zeigt Abbildung 3.79 a und b (s. S. 188).



**Abb. 3.79 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2000 dritte Probenahme;** Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) und mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) wurden nicht gefunden; in Ansatz 1 (NO 1) wurden Nitrit-Oxidierer zu Beginn mit einer Zellzahl von  $8,7 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden; diese Anzahl stieg im weiteren Verlauf auf  $9,1 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an, um anschließend auf  $1,86 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht zurückzugehen; im Ansatz 2 (NO 2) stieg die Bakterienzahl von anfangs 760 Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht über  $4,9 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht auf  $8,7 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

In beiden MPN-Ansätzen, Ansatz 1 mit der unbegasteten Probe und Ansatz 2 mit der mit Ammoniak begasteten Probe, waren weder Ammoniak-Oxidierer (AO 1 und AO 2) noch mit ihnen vergesellschaftete Nitrit-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) zu finden. Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) waren hingegen nachweisbar. In Ansatz 1 (unbegast) wurden sie ab der 2. Wachstumswoche zum erstenmal mit einer Zellzahl von  $8,7 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht detektiert und erreichten bereits in der 4. Wachstumswoche die maximale Zellzahl von  $9,12 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht, die im weiteren Verlauf wieder zurückging und nach 8 Wochen Inkubation bei  $1,86 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht lag. In Ansatz 2 (mit Ammoniak begast) waren die Nitrit-Oxidierer ebenfalls bereits in der 2. Wachstumswoche mit 760 Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachzuweisen.



b

**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2000 dritte Probenahme;** Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer wurden in Ansatz 1 (unbegast) in den Spuren 5 bis 7 nicht entdeckt; auch in den Spuren 15 bis 17, welche die Proben des Ansatzes 2 (begast) enthielten, waren keine autotrophen Nitrifizierer zu finden; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Probe unbegast AO 1, 6. Probe unbegast NO AO 1, 7. Probe unbegast NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Probe begast AO 2, 16. Probe begast NO AO2, 17. Probe begast NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Die Bakterienzahl stieg im weiteren Verlauf auf  $4,9 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an und konnte in der 8. Woche hinweg mit jeweils  $8,7 \times 10^3$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht registriert werden. Der Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über die PCR-Technik hingegen konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen. In beiden Ansätzen waren weder Ammoniak- noch Nitrit-Oxidierer über die Vervielfältigung des 16S rRNA-Gens in Ansatz 1, Spur 5 bis 7, und Ansatz 2, Spur 15 bis 17, zu entdecken.

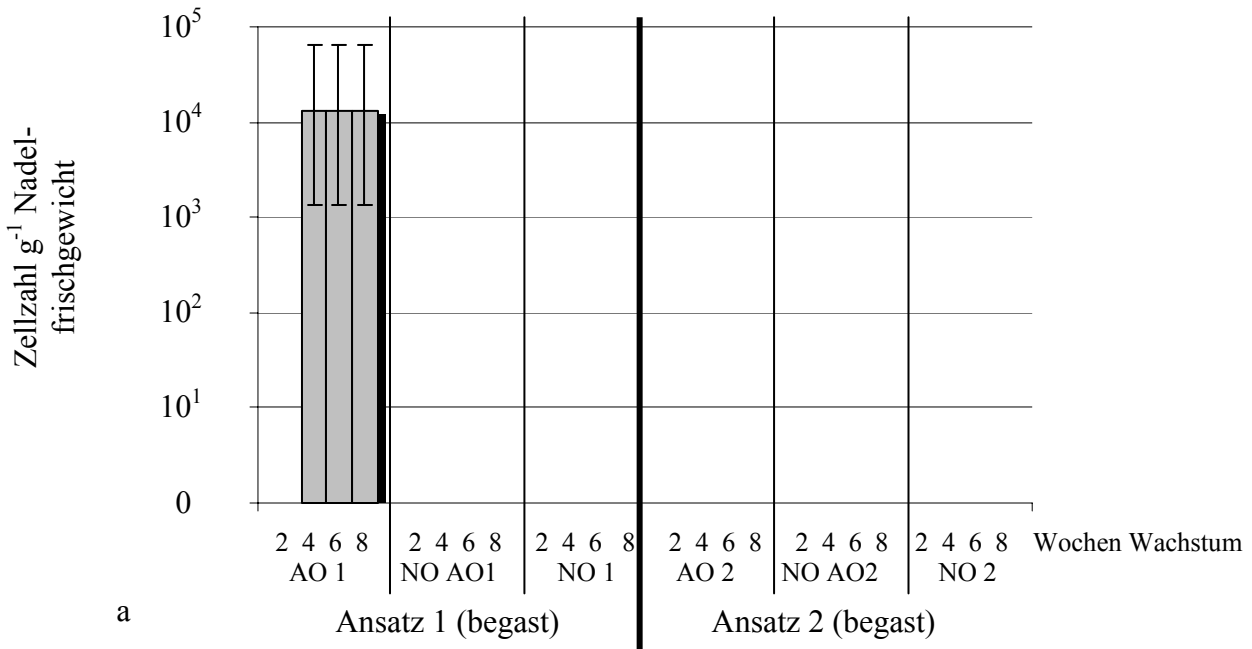
Die Ergebnisse der Versuchsreihe des Jahres 2000 zeigten, daß nach der einmaligen Inokulation der Fichtenkeimlinge mit den aus der organischen Auflage des Höglwald angereicherten autotrophen Nitrifizierer über die MPN-Technik die Ammoniak-Oxidierer nicht nachgewiesen werden konnten. Die Nitrit-Oxidierer waren hingegen in allen drei Probenahmen zu finden. Über

die PCR-Technik waren nur die Ammoniak-Oxidierer in der ersten Probenahme zu entdecken, nicht jedoch die Nitrit-Oxidierer. In allen weiteren Probenahmen waren über die PCR-Technik keine autotrophen Nitrifizierer mehr zu dokumentieren. Eine Etablierung der autotrophen Nitrifizierer im Fichtennadelgewebe gelang nicht, wie aus den abnehmenden Nachweisen während des Jahres zu beobachten war.

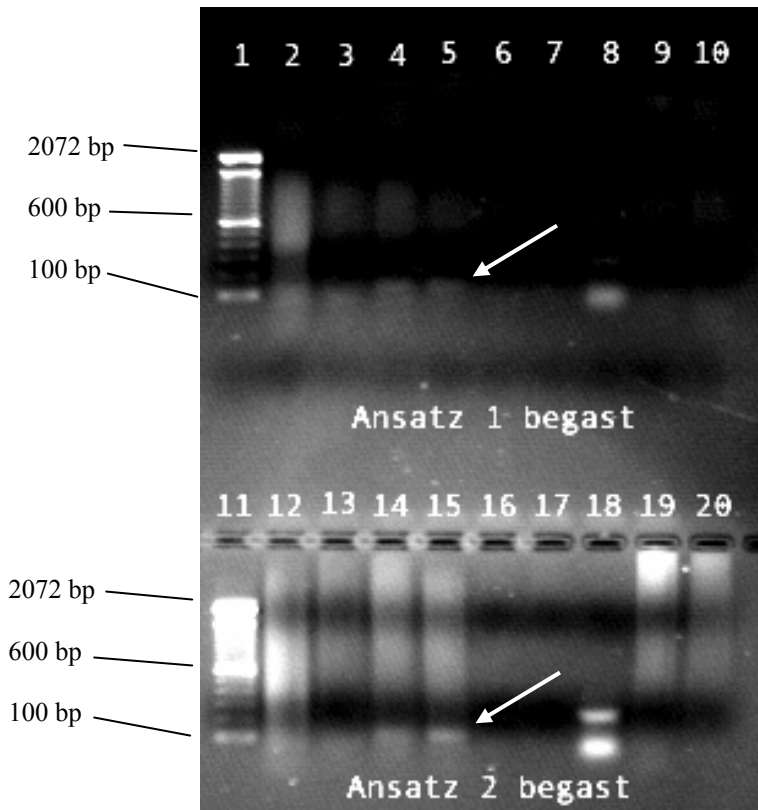
Im Jahr 2001 wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. Da die aus der organischen Auflage vom Höglwald angereicherten Nitrifizierer im Wachstumsverhalten gegenüber der Reinkultur von *N. europaea* zeitlich einen deutlich hinausgezögerten Wachstumsbeginn zeigten, wurde für die Inokulation der Fichtenkeimlinge auf die Bakterienreinkultur von *N. europaea* zurückgegriffen. Ferner wurde die Inokulation wiederholt durchgeführt. Die erste Inokulation der Fichtenkeimlinge fand im Alter von 2 Monaten der Keimlinge statt. Anschließend erfolgte die erste Probenahme. Nach 2 weiteren Monaten Inkubation der Fichtenkeimlinge, also im Alter der Keimlinge von 4 Monaten, fand die zweite Inokulation statt. Die Bakterienkonzentration von *N. europaea* betrug für die erste Inokulation etwa  $4 \times 10^7$  Bakterien  $\text{ml}^{-1}$  und bei der zweiten zwischen  $2 - 4 \times 10^7$  Bakterien  $\text{ml}^{-1}$ . Die zweite Probenahme schloß sich wiederum unmittelbar direkt nach der Inokulation an. Die dritte und letzte Probenahme erfolgte wiederum nach 2 Monaten Inkubation der Fichtenkeimlinge. Die Keimlinge hatten nun ein Alter von 6 Monaten. Neben dem schnelleren Wachstum der Bakterien versprach die Inokulation der Keimlinge mit dem Ammoniak-Oxidierer *N. europaea* zudem die Sicherheit über die MPN-Technik in Kombination mit der PCR-Technik nur die Ammoniak-Oxidierer eindeutig nachweisen zu können, was wiederum Rückschlüsse auf die Nachweisgenauigkeit der angewandten Techniken zuließ.

Die erste Probenahme erfolgte unmittelbar nach der ersten Inokulation der Fichtenkeimlinge mit *N. europaea*. Mit den unbegasten Fichtennadeln wurde ein MPN-Doppelansatz eingerichtet. In beiden Ansätzen des Doppelansatzes konnten jedoch keine Zellen des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* nachgewiesen werden. Die Kontrolle der MPN-Ansätze über die PCR-Technik hatte ebenfalls keinen Nachweis der Zellen von *N. europaea* erbracht. Nitrit-Oxidierer waren erwartungsgemäß nicht zu detektieren. Als Ergebnis der ersten Versuchsreihe des Jahres 2001 mußte festgehalten werden, daß nach der ersten Inokulation weder über die MPN- noch über die PCR-Kontrolle Zellen des autotrophen Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* wiederentdeckt werden konnten.

Zwei Monate nach der ersten Inokulation der Fichtenkeimlinge mit *N. europaea* wurden die Keimlinge erneut mit *N. europaea* inokuliert. Es wurden Proben von den mit Ammoniak begasten und unbegasten Fichtenkeimlingen genommen und damit jeweils ein MPN-Doppelansatz hergestellt. Abbildung 3.80 a und b zeigen die Ergebnisse von den Fichtennadeln der mit Ammoniak begasten Keimlingen der zweiten Probenahme.

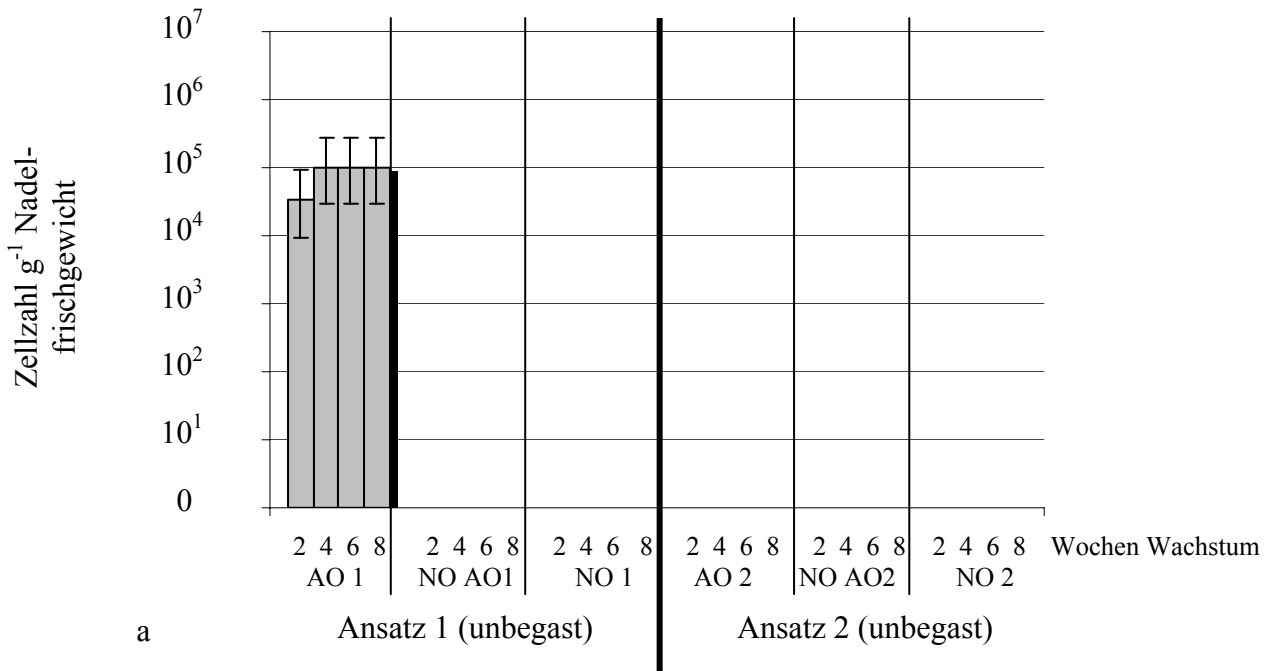


**Abb. 3.80 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2001 zweite Probenahme begast; *N. europaea*** konnte im Ansatz 1 (AO 1) mit einer Zellzahl von  $1,32 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht ab der 4. Kultivierungswoche nachgewiesen werden; in Ansatz 2 (AO 2) konnte *N. europaea* nicht gefunden werden; Nitrit-Oxidierer konnten weder in den Kulturröhren der Ammoniak-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) noch solitär (NO 1 und NO 2) kultiviert nachgewiesen werden; AO: Kulturröhren der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhren Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhren für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

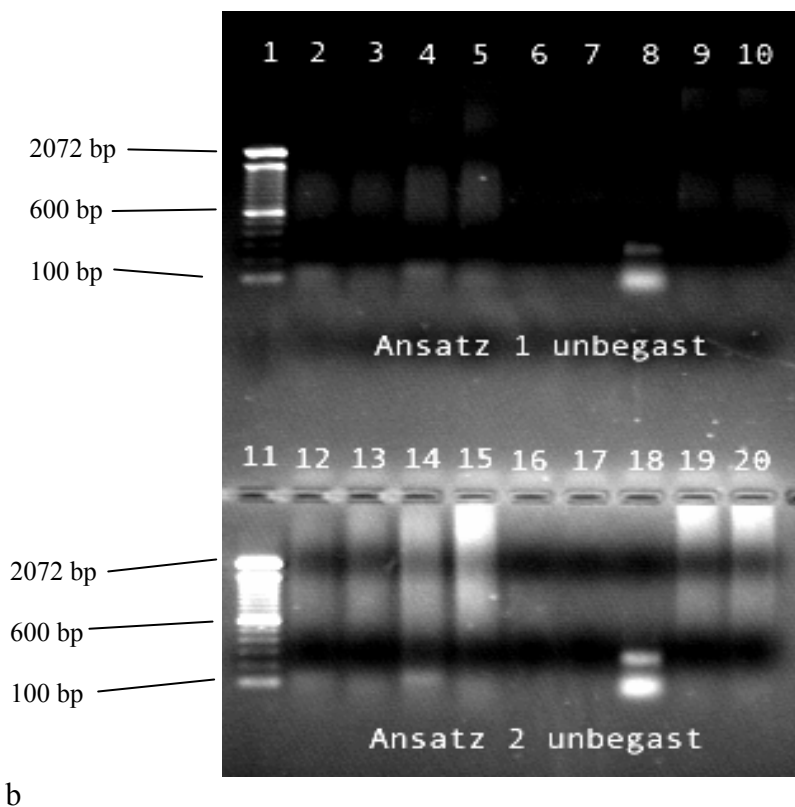


**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2001 zweite Probenahme begast;** *N. europaea* war anhand der DNA-Banden der PCR-Amplifikate sowohl in Spur 5 im Ansatz 1 (begast) als auch in Spur 15 im Ansatz 2 (begast) zu detektieren (s. Pfeile); Nitrit-Oxidierer waren nicht zu entdecken; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Probe begast AO 1, 6. Probe begast NO AO 1, 7. Probe begast NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Probe begast AO 2, 16. Probe begast NO AO2, 17. Probe begast NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Im Doppelansatz, der die Nadelprobe der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlingen enthielt, wurde über die MPN-Technik (s. Abb. 3.80 a) im Ansatz 1 (AO 1) in der 4. Wachstumswoche *N. europaea* mit einer Zellzahl von  $1,32 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen. Diese Zellzahl konnte auch noch nach 8 Wochen Wachstum ermittelt werden. Im Ansatz 2 (AO 2) konnte hingegen *N. europaea* nicht gefunden werden. Erwartungsgemäß konnten in beiden Ansätzen keine Nitrit-Oxidierer (NO AO1, NO AO2, NO 1 und NO 2) detektiert werden. Im Anschluß an die MPN-Technik wurden die Proben auch mit Hilfe der PCR-Technik (s. Abb. 3.80 b) auf die Anwesenheit von Ammoniak-Oxidierer getestet. In Ansatz 1 konnten dabei die Zellen von *N. europaea* nachgewiesen werden. In Spur 5, welche die Probe der Ammoniak-Oxidierer aus dem MPN-Ansatz erhielt, ist eine schwache DNA-Bande sichtbar (s. Pfeil), die auf derselben Höhe lag, wie die Kontrollbande in Spur 4. Sowohl die Kontrollbande, als auch die DNA-Bande der MPN-Probe waren auf die Vervielfältigung des 16S rRNA-Gens der Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -*Proteobacteria* zurückzuführen. In Ansatz 2 war dieselbe Konstellation zu erkennen. Hier lag die MPN-Probe in Spur 15, unmittelbar neben der Spur 14 mit der Positivkontrolle. Die DNA-Bande war deutlicher zu erkennen als im Ansatz 1. Nitrit-Oxidierer konnten erwartungsgemäß nicht dokumentiert werden. In Abbildung 3.81 a und b sind die Ergebnisse der Fichtennadelproben der unbegasten Keimlinge dargestellt. Im Doppelansatz mit den unbegasten Fichtenkeimlingen konnte über die MPN-Technik (s. Abb. 3.81 a) im Ansatz 1 (AO 1) bereits in der 2. Wachstumswoche *N. europaea* mit einer Zellzahl von  $3,37 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen werden. Im weiteren Wachstumsverlauf stiegen die Zellzahlen auf  $9,95 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht an. Diese Zellzahl konnte auch noch nach 8 Wochen Wachstum ermittelt werden. Im Ansatz 2 (AO 2) konnten dagegen keine Ammoniak-Oxidierer gefunden werden. Erwartungsgemäß konnten in beiden Ansätzen weder in den Kulturröhrchen für die Ammoniak-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) noch in den Röhrchen für die Nitrit-Oxidierer (NO 1 und NO 2) diese detektiert werden. Im Anschluß an die MPN-Technik wurden die Proben auch über die PCR-Kontrolle (s. Abb. 3.81 b) auf die Anwesenheit von *N. europaea* getestet. Hierbei konnten jedoch keine eindeutigen Banden im Agarose-Gel gefunden werden.



**Abb. 3.81 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2001 zweite Probenahme unbegast; *N. europaea*** konnte im Ansatz 1 (AO 1) in der 2. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von  $3,37 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht und ab der 4. Kultivierungswoche mit einer Zellzahl von  $9,95 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht nachgewiesen werden; in Ansatz 2 (AO 2) konnte *N. europaea* nicht gefunden werden; Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer getestet; NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden



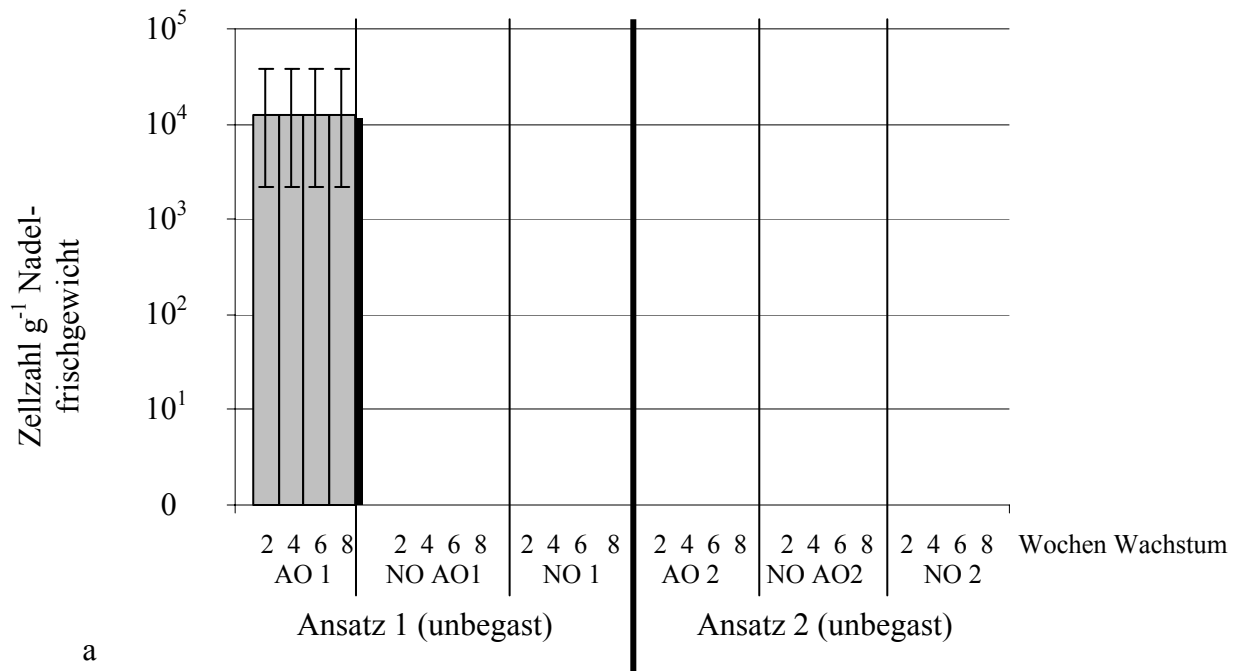
**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2001 zweite Probenahme unbegast;** *N. europaea* war weder in Spur 5 im Ansatz 1 (unbegast) noch in Spur 15 im Ansatz 2 (unbegast) zu finden; Nitrit-Oxidierer waren ebenfalls nicht zu entdecken; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Probe unbegast AO 1, 6. Probe unbegast NO AO 1, 7. Probe unbegast NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Probe unbegast AO 2, 16. Probe unbegast NO AO2, 17. Probe unbegast NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer wurden nicht nachgewiesen; die Spuren 5 – 7 und 15 – 17 waren leer. Als Endergebnis konnte festgehalten werden, daß nach der zweiten Inokulation der Fichtenkeimlinge mit *N. europaea* in den Versuchsreihen des Jahres 2001 sowohl über die MPN-Technik die Ammoniak-Oxidierer in den begasten als auch unbegasten Ansätzen nachzuweisen waren und darüber hinaus über die PCR-Kontrolle die Bakterien aus dem MPN-Ansatz Fichtennadelproben der mit Ammoniak begasten Keimlinge angetroffen wurden.

Die letzte Probenahme dieser Versuchsreihe fand 2 Monaten nach der zweiten Inokulation statt. Die Fichtenkeimlinge wiesen nun ein Gesamtalter von 6 Monaten auf. Auch mit diesen Fichtennadelproben wurden zum Nachweis der Zellen von *N. europaea* und zur Zellzahlermittlung jeweils MPN-Doppelansätze hergestellt. Zunächst sind die Ergebnisse der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlinge dargestellt. Im Anschluß daran folgen die Ergebnisse der unbegasten Fichtennadelproben.

Der MPN-Doppelansatz der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlinge ergab, daß in beiden Ansätzen 1 und 2 *N. europaea* nicht mehr nachweisbar war. Nitrit-Oxidierer waren erwartungsgemäß nicht zu finden. Die zusätzlich durchgeführte Kontrolle der MPN-Kulturröhrchen mit Hilfe der PCR-Technik bestätigte das Ergebnis aus dem MPN-Doppelansatz. Die Zellen von *N. europaea* ließen sich auch mit der PCR-Technik nicht nachweisen.

Nach den Untersuchungen der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlingen wurden im Anschluß daran die unbegasten Fichtenkeimlinge auf das Vorhandensein des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* überprüft. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind in Abbildung 3.82 a und b dargestellt. Bei dem Test auf *N. europaea* in den unbegasten Proben der Fichtenkeimlinge konnten über die MPN-Technik (Abb. 3.82 a) im ersten Ansatz (AO 1) bereits nach der 2. Wachstumswoche  $1,22 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht ermittelt werden. Diese Zahl veränderte sich bis zur 8. Wachstumswoche nicht mehr. Im 2. Ansatz (AO 2) hingegen waren keine Ammoniak-Oxidierer mehr zu finden. Nitrit-Oxidierer (NO AO1, NO AO 2, NO 1 und NO 2) konnten erwartungsgemäß nicht gefunden werden.

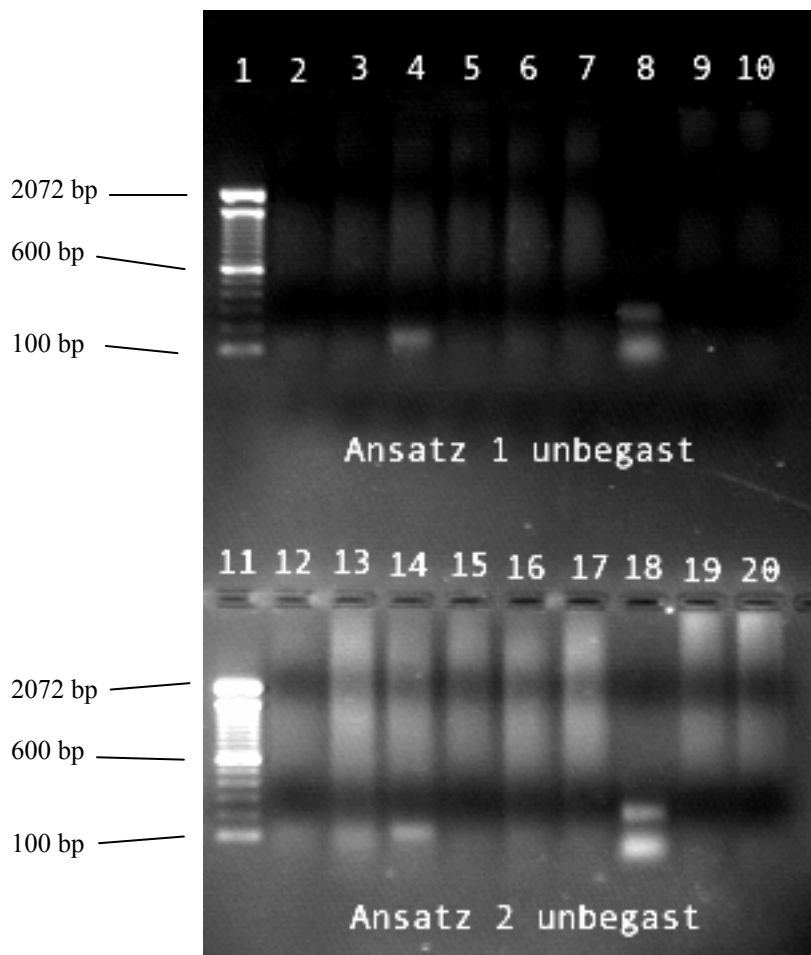


**Abb. 3.82 a: MPN-Ansatz Versuchsreihe 2001 dritte Probenahme unbegast;** *N. europaea* im Ansatz 1 (AO 1) konnte ab der 2. Wachstumswoche mit einer Zellzahl von  $1,22 \times 10^4$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht bis zur 8. Kultivierungswoche nachgewiesen werden; in Ansatz 2 (AO 2) wurde *N. europaea* nicht gefunden; Nitrit-Oxidierer konnten weder in den Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer (NO AO1 und NO AO2) noch solitär (NO 1 und NO 2) kultiviert nachgewiesen werden; AO: Kulturröhrchen der Ammoniak-Oxidierer; NO AO: Kulturröhrchen Ammoniak-Oxidierer auf gleichzeitiges Vorkommen von Nitrit-Oxidierer hin getestet, NO: Kulturröhrchen für Nitrit-Oxidierer; die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an; Säulen ohne Fehlerbalken konnte kein Konfidenzintervall zugeordnet werden

Das Ergebnis aus dem MPN-Doppelansatz konnte über die PCR-Technik (s. Abb. 3.82 b, S. 195) nicht bestätigt werden. In beiden Ansätzen mit den Nadeln der unbegasteten Fichtenkeimlingen waren in den entsprechenden Spuren für den Nachweis des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea*, Ansatz 1 Spur 5 und Ansatz 2 Spur 15, keine Amplifikate des entsprechenden 16S rRNA-Gens zu finden. Die DNA-Banden in der Höhe der Positivkontrollen (s. Spur 4 und 14) fehlten im Agarose-Gel. Nitrit-Oxidierer konnten erwartungsgemäß in den Ansätzen NO AO1 (Spur 6), NO AO2 (Spur 16), NO 1 (Spur 7) und NO 2 (Spur 17) nicht registriert werden.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß nach der ersten Inokulation der Fichtenkeimlinge *N. europaea* weder über die MPN-Technik noch über die sich anschließende PCR-Kontrolle nachweisen ließ. Erst nach der zweiten Inokulation der nunmehr 4 Monate alten Fichtenkeimlinge gelang es, *N. europaea* in den MPN-Ansätzen über den Nitrit-Nachweis zu detektieren.





b

**b: PCR-Kontrolle Versuchsreihe 2001 dritte Probenahme unbegast;** *N. europaea* war weder in Spur 5 im Ansatz 1 (unbegast) noch in Spur 15 im Ansatz 2 (unbegast) zu finden; Nitrit-Oxidierer sind erwartungsgemäß in beiden Ansätzen in den Spuren 6, 7, 16 und 17 nicht zu finden; Spuren: 1. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 2. Negativkontrolle mit Wasser, 3. Negativkontrolle mit *E. coli*, 4. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 5. Probe unbegast AO 1, 6. Probe unbegast NO AO 1, 7. Probe unbegast NO 1, 8. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 9. Negativkontrolle mit *E. coli*, 10. Negativkontrolle mit Wasser, 11. Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter, 12. Negativkontrolle mit Wasser, 13. Negativkontrolle mit *E. coli*, 14. Positivkontrolle mit *N. europaea*, 15. Probe unbegast AO 2, 16. Probe unbegast NO AO2, 17. Probe unbegast NO 2, 18. Positivkontrolle mit *N. winogradskyi*, 19. Negativkontrolle mit *E. coli*, 20. Negativkontrolle mit Wasser

Dabei wurden die Bakterien sowohl in den mit Ammoniak begasten als auch unbegasten Proben nachgewiesen. Auch die Kontrolle auf die tatsächliche Anwesenheit der Zellen über die PCR-Technik ergab bei dem MPN-Ansatz mit den begasten Proben ein positives Signal. In der dritten und letzten Probenahme dieser Versuchsreihe waren die Bakterien in der Nadelprobe der unbegasten Fichtenkeimlinge nachzuweisen. Die Kontrolle über die PCR-Technik konnte kein positives Ergebnis liefern.

Das Gesamtergebnis der Versuchsreihen über die MPN- und PCR-Kontrolle zeigte, daß in den Negativkontrollen, in denen keine autotrophen Nitrifizierer zu finden sein sollten, sowohl bei den begasten als auch unbegasten Nadelproben der Fichtenkeimlinge mit der MPN-Technik

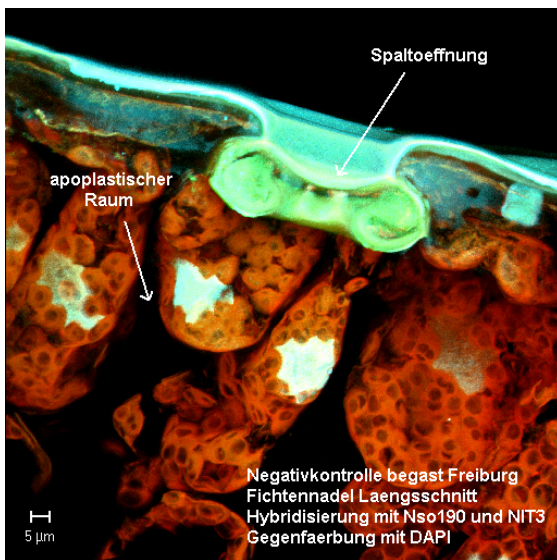
Nitrit-Oxidierer nachweisbar waren. Zusätzlich konnte dieser Befund über die PCR-Technik bei der Probe mit den begasten Fichtenkeimlingen bestätigt werden. Daraus ließ sich folgern, daß die Fichtenkeimlinge nicht vollständig steril angezogen werden konnten. Bei der ersten Versuchsreihe im Jahr 2000 wurden die Fichtenkeimlinge zu Beginn mit autotrophen Nitrifizierern, die aus der Nadelstreu des Höglwaldes angereichert worden waren, einmalig inokuliert. Nach der ersten Probenahme waren über die MPN-Technik Nitrit-Oxidierer nachweisbar. Diese konnten auch nach der zweiten und dritten Probenahme wieder gefunden werden. Mit Hilfe der PCR-Technik konnten nach der ersten Probenahme die Ammoniak-Oxidierer entdeckt werden. Die PCR-Anwendungen der zweiten und dritten Probenahme dagegen verliefen sowohl für die Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierer ergebnislos. Die Ammoniak-Oxidierer waren nur nach der Inokulation und der sich unmittelbar anschließenden Probenahme zu detektieren, während die Nitrit-Oxidierer über die MPN-Technik nach allen Probenahmen nachzuweisen waren. Die Inokulation der zweiten Versuchsreihe im Jahr 2001 wurde mit der Bakterienreinkultur des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* durchgeführt. Nach der ersten Inokulation konnten weder in den MPN-Ansätzen noch über die PCR-Technik die Bakterien wiedergefunden werden. Daher wurden unmittelbar vor der zweiten Probenahme die Fichtenkeimlinge ein weiteres Mal mit *N. europaea* inokuliert. Im darauffolgenden MPN-Ansatz konnte der Ammoniak-Oxidierer aufgefunden werden. Nach der dritten Probenahme wurde *N. europaea* nur noch in der Nadelprobe der unbegasten Fichtenkeimlinge detektiert. Über die PCR-Technik waren hingegen die Zellen in keiner der Probenahmen nachzuweisen. Eine Besiedlung von Fichtenkeimlingen schien grundsätzlich möglich zu sein. Diese Besiedlung schien aber abhängig von der Bakterienkultur und vom Umfang der Inokulation und deren Wiederholungen zu sein.

### 3.3.2.2 Mikroskopische Untersuchungen der Fichtenkeimlinge

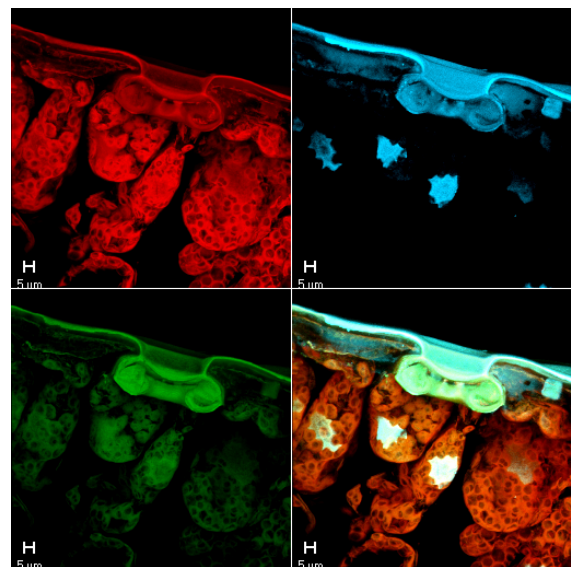
Nach der Untersuchung der künstlich mit autotrophen Nitrifizierern inokulierten Fichtenkeimlinge über die MPN- und PCR-Technik erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Fichtennadeln der inokulierten Keimlinge anhand der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop. Zu diesem Zweck wurden von den Fichtennadeln der inokulierten Keimlinge mikroskopische Präparate hergestellt, die entsprechend der Nadelproben von den Standorten Höglwald oder Villingen über die Gefrierschnitt-Technik angefertigt wurden (s. 2.9.3). Nach der Untersuchung der sterilen Nadelproben der Negativkontrollen schloß sich die Überprüfung der Fichtennadelproben der Versuchsreihe vom Jahr 2000 gefolgt von den Fichtennadeln der Versuchsreihe vom Jahr 2001 an. Die im Anschluß gezeigten Abbildungen geben repräsentativ die Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Versuchsreihen wieder.

Als Negativkontrolle wurden sterile Nadelproben sowohl von den mit Ammoniak begasten als auch den unbegasten, im Labor herangezogenen Fichtenkeimlingen untersucht. Abbildung 3.83 (s. S. 198) zeigt repräsentativ begaste und unbegaste Fichtennadelpräparate. Nach durchgeführter Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten in keinem der untersuchten Fichtennadelpräparate spezifische Fluoreszenzsignale der an die jeweiligen Oligodesoxynukleotid-Sonden gebundenen Farbstoffe bzw. DAPI, entsprechend der Positivkontrollen der Validierungsversuche (s. 3.2.2.3), für die autotrophen Nitrifizierer bzw. Mikroorganismen entdeckt werden. Auch nach Auftrennung der Gesamtbilder (s. Abb. 3.83 a und c) in die für die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe zugeordneten Detektionskanäle konnten in der sich anschließenden Auswertung keine spezifischen Fluoreszenzsignale gefunden werden (s. Abb. 3.83 b und d). In allen untersuchten Nadelpräparaten der sterilen Negativkontrollen fehlten erwartungsgemäß die autotrophen Nitrifizierer im Apoplasten der Fichtennadeln der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge. Auch andere Mikroorganismen konnten über die DAPI-Färbung nicht im Nadelblatt-Apoplasten der Fichtennadeln der begasten und unbegasten Fichtenkeimlinge entdeckt werden.

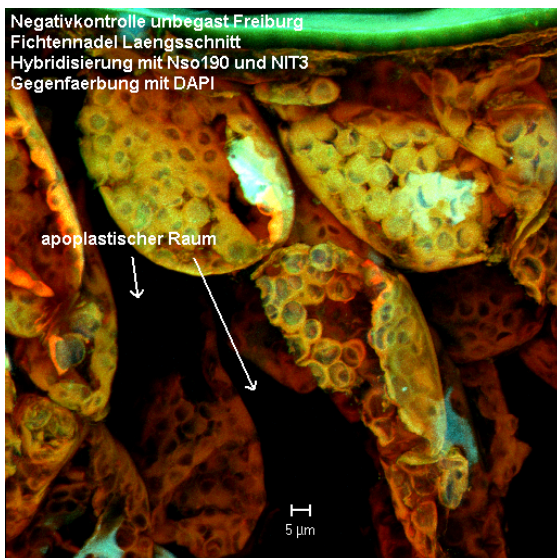
Im nächsten Schritt wurden die Fichtennadelproben der Versuchsreihen des Jahres 2000 näher untersucht. Die Fichtenkeimlinge des Jahres 2000 wurden entsprechend der Negativkontrolle entweder mit Ammoniak begast oder unbegast herangezogen (s. 2.2) und zu Beginn einmalig mit autotrophen Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes künstlich inokuliert (s. 2.6.7). Repräsentativ für die Untersuchungen der Fichtennadelpräparate der mit autotrophen Nitrifizierern künstlich inokulierten Keimlinge zeigt Abbildung 3.84 (s. S. 199) Längsschnitte der Fichtennadeln nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und erfolgter Gegenfärbung mit DAPI. Die Untersuchungen ergaben, daß in allen Fichtennadelpräparaten keine Fluoreszenzsignale zu finden waren, wie sie spezifisch für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind, die an die entsprechenden Oligodesoxynukleotid-Sonden gebunden sind (vgl. Validierung 3.2.2.3).



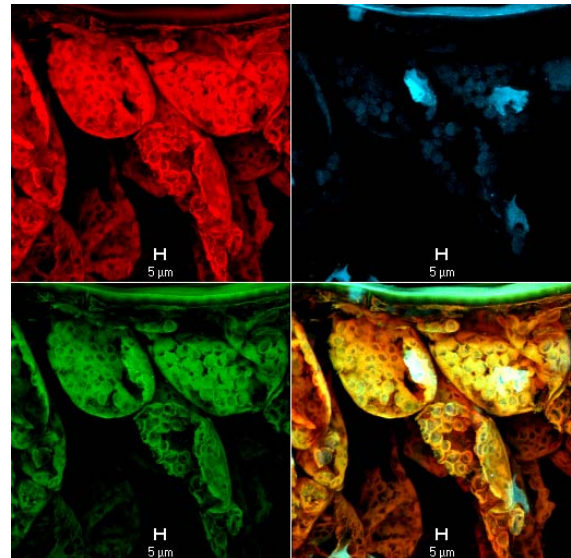
a Negativkontrolle begast



b Kanalauftrennung:  
Negativkontrolle begast



c Negativkontrolle unbegast

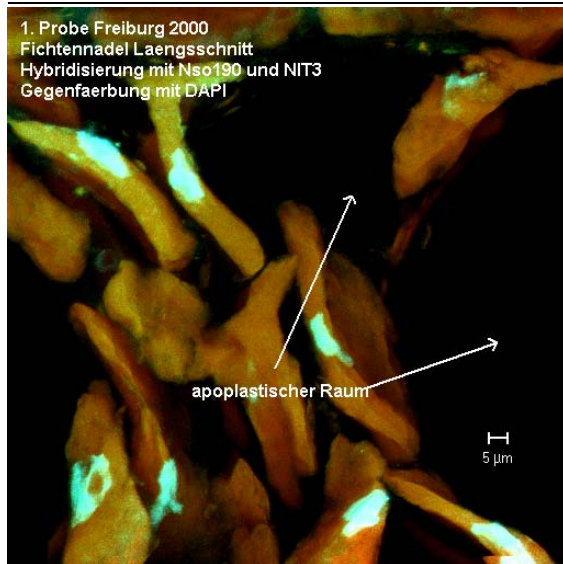


d Kanalauftrennung:  
Negativkontrolle unbegast

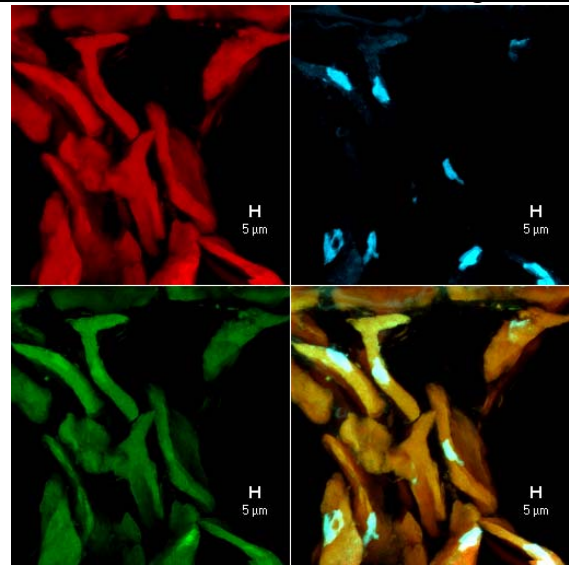
**Abb. 3.83: Fichtennadelpräparate Negativkontrolle;** a: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der mit Ammoniak begasten Negativkontrolle von im Labor herangezogenen Keimlingen, 120 Einzelbilder, Dicke 83,3 µm; b: Auftrennung der linken Abbildung in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektionskanäle; c: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der unbegasten Negativkontrolle von im Labor herangezogenen Keimlingen, 84 Einzelbilder, Dicke 58,1 µm; d: Auftrennung der linken Abbildung in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektionskanäle; die für die autotrophen Nitrifizierer bzw. für Mikroorganismen spezifischen Fluoreszenzsignale fehlen in den Fichtennadelpräparaten; die einzelnen Kanälen zeigen keine spezifischen Signale

Die für Mikroorganismen spezifischen Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI konnten ebenfalls nicht gefunden werden. Abgebildet sind nur die Fichtennadelpräparate der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlinge, da sich diese Ergebnisse nicht von den Ergebnissen der Fichtennadelpräparate der unbegasten Keimlinge unterscheiden.

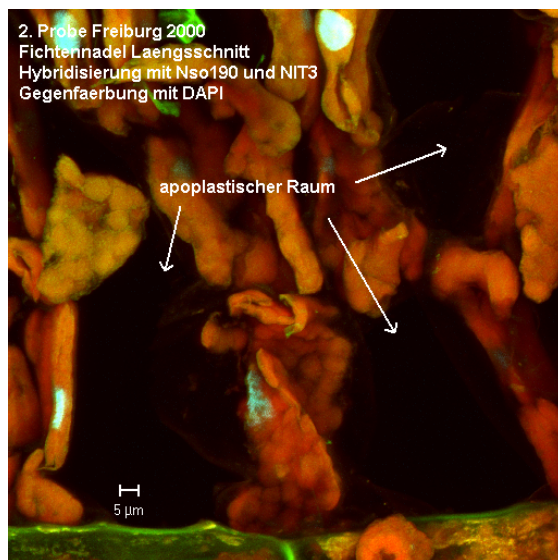




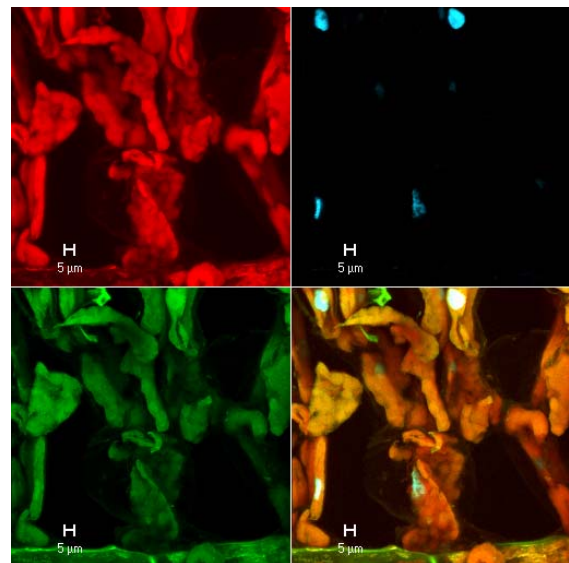
a 1. Probe Versuchsreihe 2000



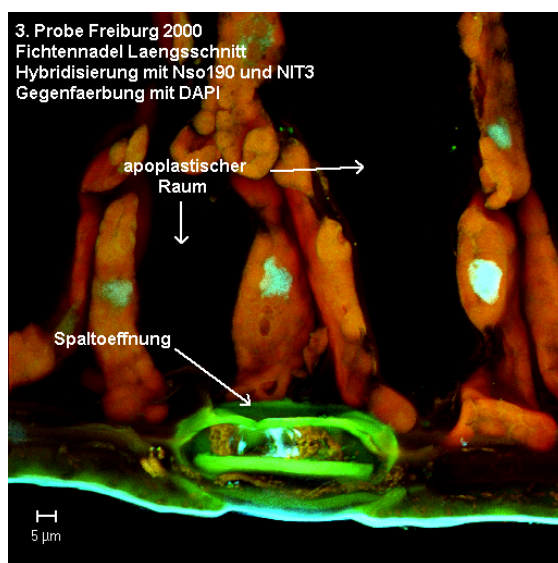
b Kanalauftrennung vom Bild links



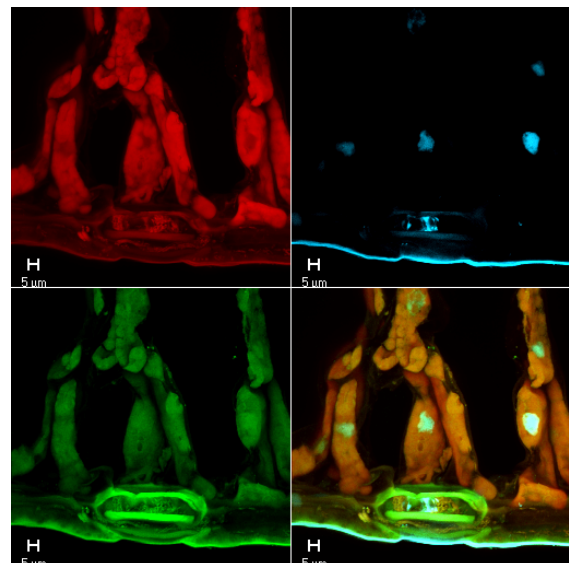
c 2. Probe Versuchsreihe 2000



d Kanalauftrennung vom Bild links



e 3. Probe Versuchsreihe 2000



f Kanalauftrennung vom Bild links

**Abb. 3.84: Fichtennadelpräparate Versuchsreihe 2000;** a: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 1. Probenahme im April, 71 Einzelbilder, Dicke 49,0 µm; c: Gesamt-

ansicht eines Fichtennadelpräparates der 2. Probenahme im Juni, 74 Einzelbilder, Dicke 51,8  $\mu\text{m}$ ; **e**: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 3. Probenahme im September, 76 Einzelbilder, Dicke 45  $\mu\text{m}$ ; **b**, **d** und **f**: Auftrennung der linken Abbildungen in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektionskanäle; die für die autotrophen Nitrifizierer bzw. für Mikroorganismen spezifischen Fluoreszenzsignale fehlen in den Fichtennadelpräparaten; die einzelnen Kanäle zeigen keine spezifischen Signale; die Präparate zeigen repräsentativ Fichtennadelproben der mit Ammoniak begasten Keimlinge; derselbe Befund war auch bei den Fichtennadelproben der unbegasten Keimlinge gegeben

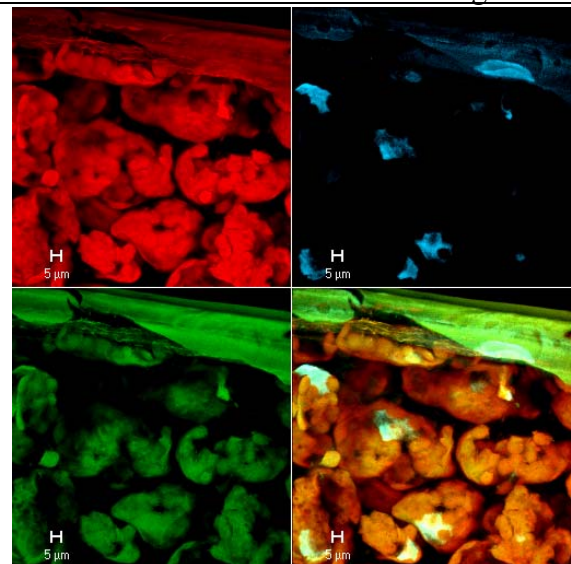
Für eine genauere und zur leichteren Auffindung von Fluoreszenzsignalen wurden die erstellten Gesamtbilder (Abb. 3.84 a, c und e) in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen entsprechenden Detektionskanäle aufgetrennt (Abb. 3.84 c, d, und f). Die Auswertung der Präparate mit einer Kanalauftrennung in die jeweiligen Detektionskanäle für die spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe bestätigte das Ergebnis aus dem Gesamtbild, daß keine autotrophen Nitrifizierer im Apoplasten der Nadelpräparaten zu finden waren. Insgesamt waren in allen Fichtennadelproben keine Bakterien über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu entdecken. Als Endergebnis der Versuchsreihen 2000, die Inokulation der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge mit autotrophen Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Höglwaldes, konnte festgehalten werden, daß in den untersuchten Fichtennadeln aller drei Probenahmen keine autotrophe Nitrifizierer über charakteristische Fluoreszenzsignale mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops nachgewiesen werden konnten.

Nachdem die einmalige Inokulation der Fichtenkeimlinge der Versuchsreihen vom Jahr 2000 mit autotrophen Nitrifizierern ergeben hatte, daß sich die Bakterien nicht auf der Nadelblattoberfläche festsetzen und sich im Nadelblatt-Apoplasten etablieren konnten, wurden in den darauffolgenden Versuchsreihen vom Jahr 2001 die Fichtenkeimling nicht einmal, sondern nach weiteren 2 Monaten Wachstum der Keimlinge erneut mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert. Als autotrophe Nitrifizierer wurde in den Versuchsreihen 2001 eine Reinkultur des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* verwendet. Die erste Inokulation der Fichtenkeimlinge der Versuchsreihen 2001 wurde im Mai durchgeführt. Im unmittelbaren Anschluß erfolgte die erste Probenahme. Vor der zweiten Probenahme im Juni 2001 wurden alle Fichtenkeimlinge, sowohl die mit Ammoniak begasten als auch unbegasten, ein weiteres Mal mit den Zellen von *N. europaea* inokuliert. Unmittelbar im Anschluß wurden wiederum Fichtennadeln als Probe genommen. Die Abbildung 3.85 a zeigt repräsentativ einen Längsschnitt durch eine Fichtennadel der ersten Probenahme von mit Ammoniak begasten Keimlingen nach der Hybridisierung mit den für die autotrophen Nitrifizierern spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden Nso190 und NIT3 und nach der Gegenfärbung mit DAPI. Die Hybridisierungen brachten keine für *N. europaea* spezifischen Fluoreszenzsignale. Auch die Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zeigte keine Hinweise auf das Vorhandensein von Mikroorganismen. Eine genauere Auswertung der Proben über die Auftrennung in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektions-





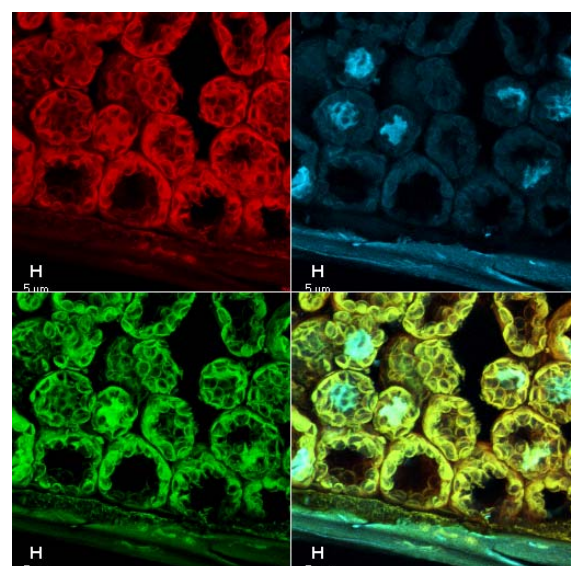
a 1. Probe Versuchsreihe 2001



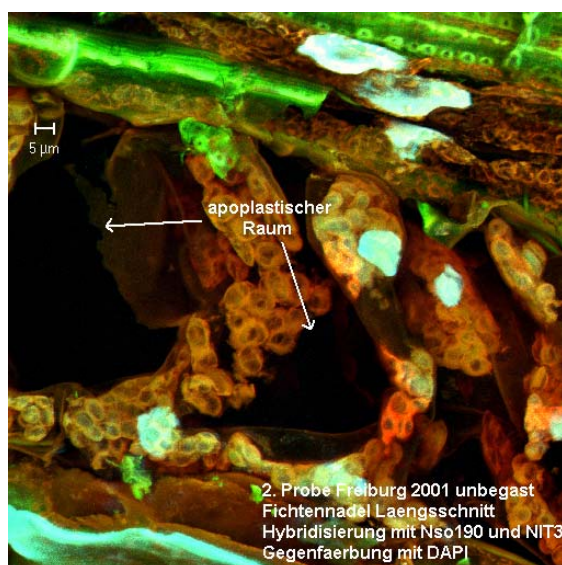
b Kanalauftrennung vom Bild links



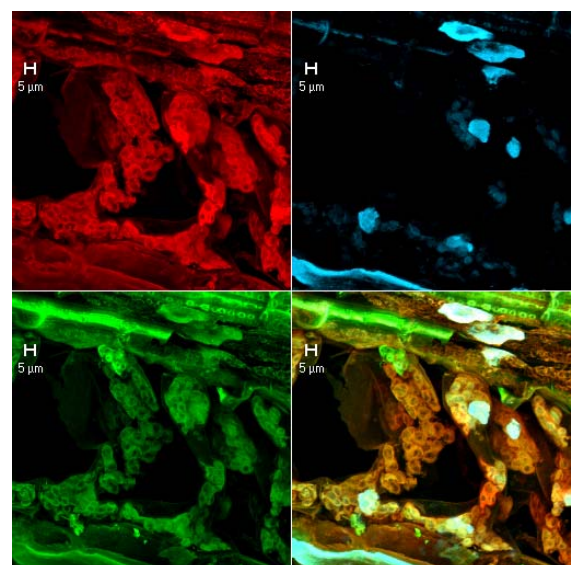
c 2. Probe Versuchsreihe 2001 begast



d Kanalauftrennung vom Bild links



e 2. Probe Versuchsreihe 2001 unbegast



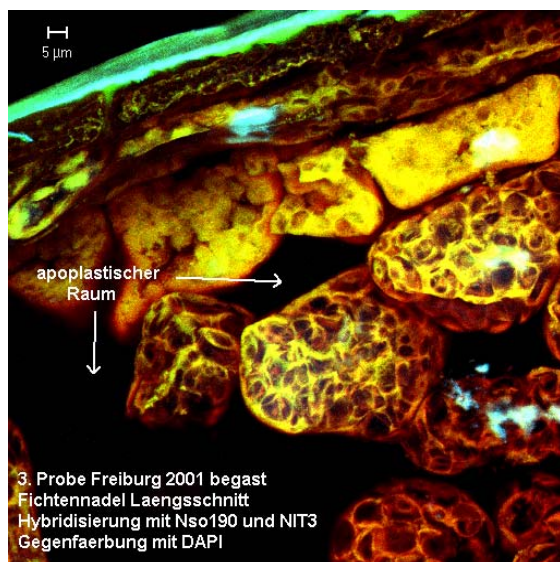
f Kanalauftrennung vom Bild links

**Abb. 3.85: Fichtennadelpräparate Versuchsreihe 2001 erste und zweite Probe; a:** Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 1. Probenahme im Mai, 68 Einzelbilder, Dicke

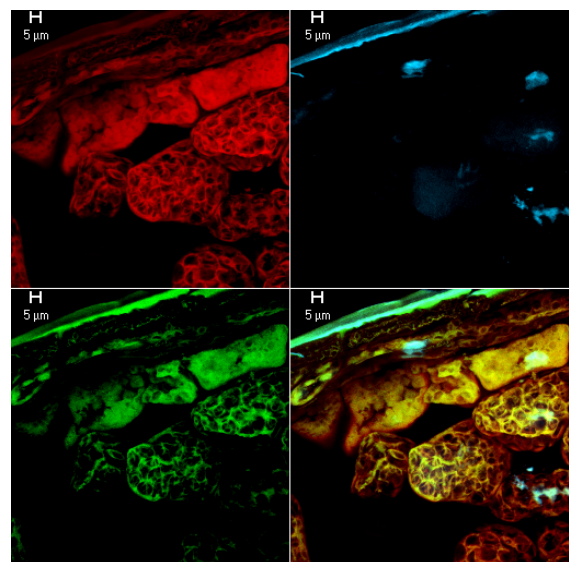
46,9  $\mu\text{m}$ ; **c**: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 2. Probenahme im Juni, mit Ammoniak begast, 50 Einzelbilder, Dicke 27  $\mu\text{m}$ ; **e**: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 2. Probenahme im Juni, unbegast, 61 Einzelbilder, Dicke 42  $\mu\text{m}$ ; **b**, **d** und **f**: Auftrennung der linken Abbildungen in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektionskanäle; die für die autotrophen Nitrifizierer bzw. für Mikroorganismen spezifischen Fluoreszenzsignale fehlen in den Fichtennadelpräparaten; die einzelnen Kanäle zeigen keine spezifischen Signale; Bild **a** zeigt ein repräsentatives Präparat für Fichtennadeln von mit Ammoniak begastem Keimlinge, derselbe Befund war auch bei den Fichtennadelproben der unbegasteten Keimlinge gegeben

kanäle und Begutachtung der Präparate der ersten Probenahme (s. Abb. 3.85 b) konnte keine Hinweise auf das Vorhandensein der Bakterien liefern. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in den Nadelpräparaten der unbegasteten Fichtenkeimlingen festgestellt. Nach der zweiten Inokulation im Juni 2001 wurden Fichtennadelpräparate angefertigt, von denen Abbildung 3.85 repräsentativ in Abbildung 3.85 c ein Nadelpräparat von mit Ammoniak begastem Keimlingen zeigt. In Abbildung 3.85 e ist ein Nadelpräparat der 2. Probenahme von unbegasteten Fichtenkeimlingen zu sehen. In beiden Präparaten waren weder in der Gesamtabbildung (Abb. 3.85 c und e) noch in der Kanalauftrennung (Abb. 3.85 d und f) in die jeweiligen Detektionskanäle die für die autotrophen Nitrifizierer spezifischen Fluoreszenzsignale zu erkennen. Die letzte Probenahme der Versuchsreihen im Jahr 2001 erfolgte im Monat September 2001 ohne vorherige Inokulation der Fichtenkeimlinge. Die Fichtennadeln wurden getrennt nach begastem und unbegastem Proben entsprechend präpariert und hybridisiert. Für die Untersuchungen der Nadellängsschnitte der mit Ammoniak begasteten Fichtenkeimlinge zeigt repräsentativ Abbildung 3.86 a die Ergebnisse der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop. In der Gesamtabbildung waren keine spezifischen Fluoreszenzsignale für die autotrophen Nitrifizierer zu erkennen. Auch nach der Auftrennung der Gesamtabbildung in die einzelnen Detektionskanäle in der Abbildung 3.86 b waren keine charakteristischen Signale zu entdecken. Dieser Befund traf für alle untersuchten Fichtennadelpräparate der mit Ammoniak begasteten Keimlinge zu. Die sich anschließende Überprüfung der Fichtennadeln der unbegasteten Keimlinge (Abb. 3.86 c und d) ergab dasselbe Ergebnis, wie jenes aus den Untersuchungen der Fichtennadeln der mit Ammoniak begasteten Keimlinge. Auch nach der dritten Probenahme und der sich unmittelbar anschließenden Untersuchung der Fichtennadelproben konnten trotz zweimaliger Inokulation der Fichtenkeimlinge in der Versuchsreihe vom Jahr 2001 keine Zellen des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* im Nadelblatt-Apoplasten der Fichtenkeimlinge über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop detektiert werden. Die Zellen des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* waren nicht im Nadelblatt-Apoplasten anzutreffen.

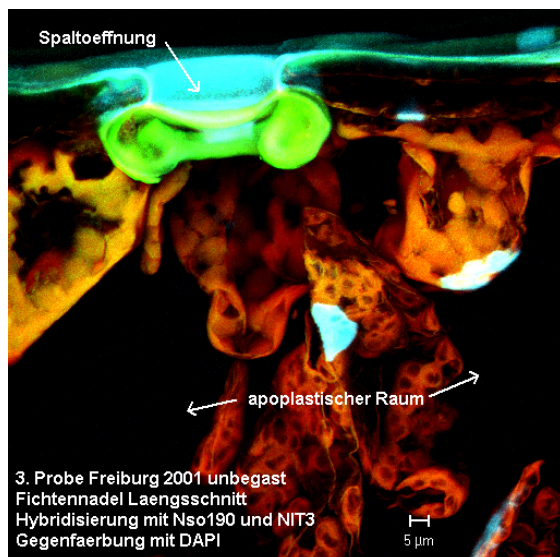




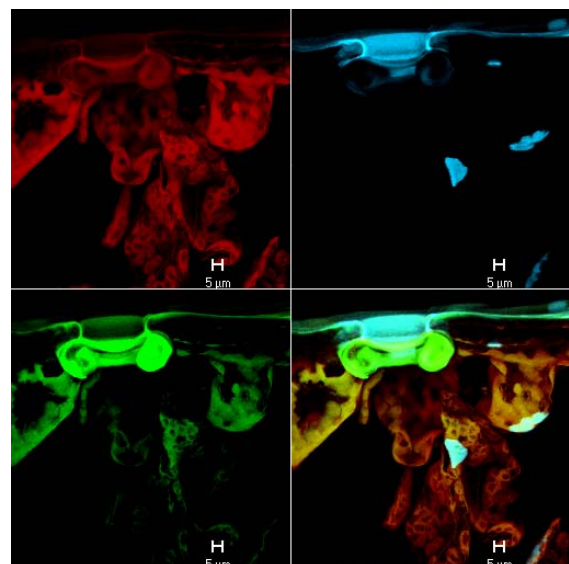
a 3. Probe Versuchsreihe 2001 begast



b Kanalauftrennung vom Bild links



c 3. Probe Versuchsreihe 2001 unbegast

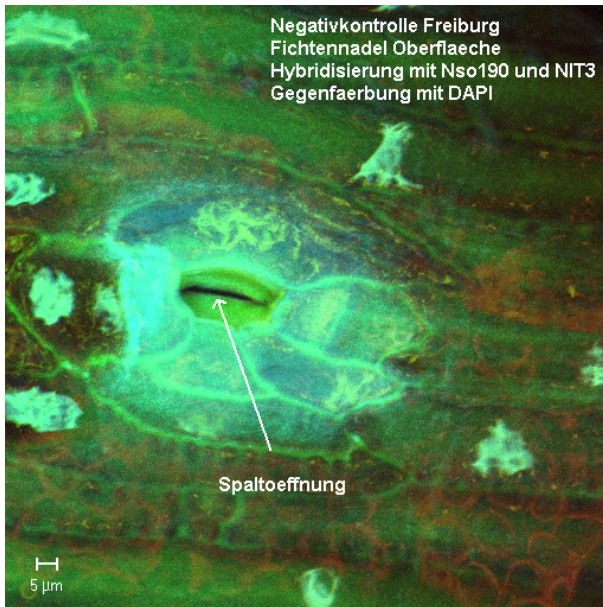


d Kanalauftrennung vom Bild links

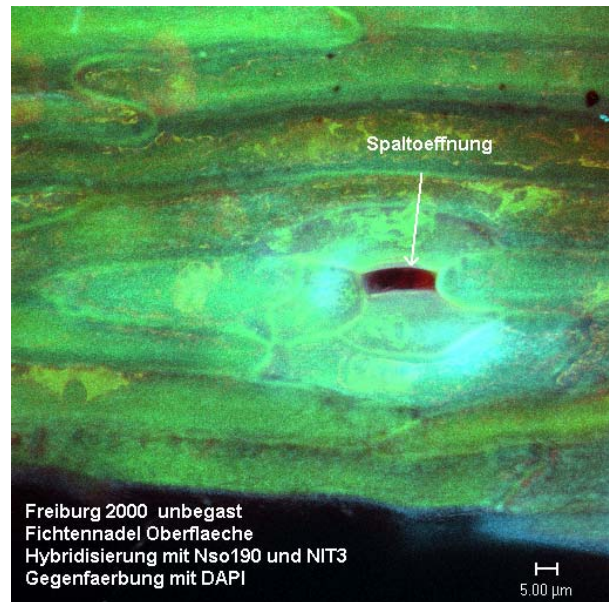
**Abb. 3.86: Fichtennadelpräparate Versuchsreihe 2001 dritte Probe;** a: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 3. Probenahme im September von mit Ammoniak begasten Keimlingen, 59 Einzelbilder, Dicke 40,6 µm; c: Gesamtansicht eines Fichtennadelpräparates der 3. Probenahme im September von unbegasten Keimlingen, 68 Einzelbilder, Dicke 46,9 µm; b und d: Auftrennung der linken Abbildungen in die für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Detektionskanäle; die für die autotrophen Nitrifizierer bzw. für Mikroorganismen spezifischen Fluoreszenzsignale fehlen in den Fichtennadelpräparaten; die einzelnen Kanälen zeigen keine spezifischen Signale

Nachdem die autotrophen Nitrifizierer mikroskopisch nicht im Fichtennadel-Apoplasten nachgewiesen werden konnte, bestand die Möglichkeit, daß sie aufgrund des kurzen Zeitraumes von einem halben Jahr und der Beschaffenheit der Fichtennadeln der Keimlinge (s. Abb. 3.6 und 3.7) – die Spaltöffnungen waren mit Wachskappen abgedeckt – noch nicht die Gelegenheit hatten, den Nadelblatt-Apoplasten zu besiedeln und somit auf der Nadelblattoberfläche zu finden wären. Daher wurde zusätzlich zum Nadelblatt-Apoplasten auch die Nadelblatt-Oberfläche der

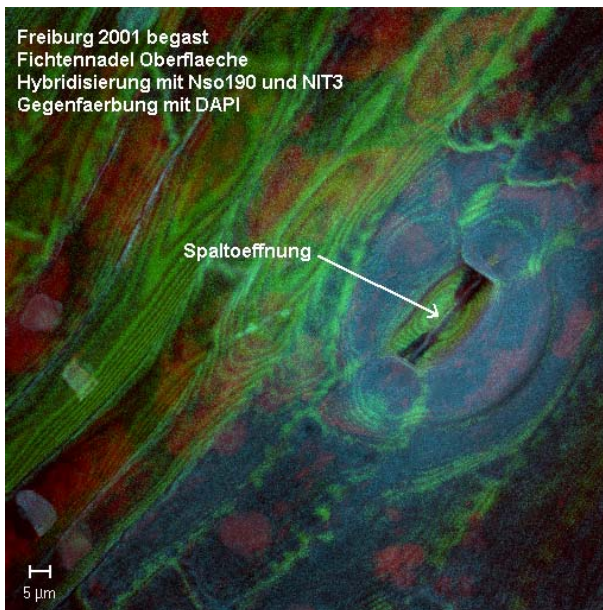
Fichtennadeln aller Versuchsreihen über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf die Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierer hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind repräsentativ in Abbildung 3.87 zu sehen. Neben den Fichtennadeln der als Negativkontrolle getesteten, nicht mit Bakterien inokulierten Fichtenkeimlingen wurden die Nadeln der Versuchsreihen der Jahre 2000 und 2001 näher untersucht.



a Fichtennadel Negativkontrolle



b Fichtennadel Versuchsreihe 2000 unbegast



c Fichtennadel Versuchsreihe 2001 begast

**Abb. 3.87: Nadelblattoberflächen der Fichtennadel der im Labor herangezogenen Fichtenkeimlinge; a:** oben links Fichtennadel der Negativkontrolle (39 Einzelbilder, Dicke: 24,7 µm); **b:** oben rechts: mit autotrophen Nitrifizierer vom Höglwald inokulierten, unbegaste Fichtennadel des Jahres 2000 (24 Einzelbilder, Dicke: 10,4 µm); **c:** unten links: mit *N. europaea* inokulierten, begaste Fichtennadel des Jahres 2001 (37 Einzelbilder, Dicke: 23,4 µm); in keinem der untersuchten Präparate konnten autotrophe Nitrifizierer auf den Oberflächen gefunden werden

In allen Fällen der untersuchten Nadelblattoberflächen (s. Abb. 3.87) der Fichtennadelpräparate konnten keine autotrophe Nitrifizierer, Zellen des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* bzw. Mikroorganismen über den Nachweis mit charakteristischen Fluoreszenzsignalen aufgefunden werden. Die Bakterien ließen sich nach der Inokulation und im weiteren Kultivierungsverlauf



nicht auf der Nadelblattoberfläche der Fichtennadeln der Keimlinge ansiedeln. Autotrophe Nitrifizierer konnten mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs-Technik in Kombination mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop in den bzw. auf den Fichtennadeln der mit autotrophen Nitrifizierern künstlich inokulierten Fichtenkeimlingen weder in den Versuchsreihen des Jahres 2000 noch des Jahres 2001 bei den Keimlingen, die zur Annäherung an den durch hohe atmogene Stickstoffeinträge charakterisierten Standort Höglwald mit Ammoniak begast wurden, noch bei den Keimlingen, die zur Kontrolle unbegast blieben, nachgewiesen werden.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Besiedlungsvorgangs autotropher Nitrifizierer in der Phyllosphäre der unter weitgehendst sterilen Bedingungen herangezogenen Fichtenkeimlingen hatte zum einen ergeben, daß in den als Negativkontrollen eingesetzten Fichtennadelproben über die MPN-Technik sowohl bei den unbegasteten als auch begasteten Keimlingen Nitrit-Oxidierer nachzuweisen waren. Bei den Proben der begasteten Keimlingen erfolgte der Nachweis zusätzlich über die PCR-Kontrolle. Eine Lokalisation und Detektion mithilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und dem konfokalen Laserrastermikroskop waren hingegen nicht möglich. Im weiteren Verlauf wurden die Fichtennadelproben der Versuchsreihen des Jahres 2001 mit den autotrophen Nitrifizierern aus der organischen Auflage des Standortes Höglwaldes einmalig inokuliert und anschließend auf die Anwesenheit der Bakterien untersucht. Zu allen drei Probenahmen konnten über die MPN-Technik Nitrit-Oxidierer entdeckt werden. Die PCR-Kontrolle hingegen ergab, daß einzig zur ersten Probenahme unmittelbar nach der Inokulation der Fichtenkeimlinge autotrophe Nitrifizierer nachzuweisen waren. Dabei handelte es sich um Ammoniak-Oxidierer. Im weiteren Verlauf der Probenahmen konnten die Nitrifizierer mit der PCR-Technik nicht mehr nachgewiesen werden. Auch der mikroskopische Nachweis gelang bei keinen Fichtennadeln der drei Probenahmen. Da eine Inokulation als nicht ausreichend erschien, wurde in den Versuchsreihen des Jahres 2001 die Inokulation 2 Monate nach der ersten Inokulation wiederholt. Für den Nachweis der Besiedlung wurden Zellen des Ammoniak-Oxidierers *N. europaea* verwendet, der ein schnelleres Wachstum als die Nitrifizierer vom Höglwald aufwies. Nach der ersten Inokulation und Probenahme konnten über die drei Nachweismethoden - MPN-, PCR- und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs-Technik - keine *N. europaea*-Zellen aufgefunden werden. Nach der zweiten Inokulation konnte der Ammoniak-Oxidierer über die MPN-Technik sowohl in den unbegasteten als auch mit Ammoniak begasteten Fichtennadelproben wieder entdeckt werden. Auch der Nachweis über die PCR-Technik verlief bei den begasteten Proben positiv. Die genaue Lokalisation mit dem Mikroskop hingegen war nicht möglich. Nach der dritten Probenahme waren die Zellen von *N. europaea* über die MPN-Technik nur noch bei den unbegasteten Fichtennadelproben nachzuweisen. Der Nachweis über die PCR-Technik oder die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs-Technik verlief dagegen bei allen untersuchten Fichtennadelpräparaten negativ.

## 4 Diskussion

Der oxidative Umsetzungsprozeß der reduzierten Stickstoffverbindungen Ammonium bzw. Ammoniak über Nitrit zu Nitrat - auch Nitrifikation genannt - nimmt im natürlichen Stickstoffkreislauf eine zentrale Position ein (VOYTEK & WARD, 1995). Neben dem Verlust von Stickstoff aus Ökosystemen über die Auswaschung von Nitrat in Gewässer (NORTON et al., 2002) bzw. die Freisetzung von klimarelevanten Spurengasen (BOLLMANN & CONRAD, 1997) trägt die Nitrifikation zugleich durch die Bereitstellung des Substrates Nitrat für die Denitrifikation zur Reduzierung der Stickstoffbelastung in Abwässern in Kläranlagen bei (PURKHOLD et al., 2000). Daher ist es nicht weiter verwunderlich, daß chemolithoautotrophe Nitrifizierer eine weite Verbreitung in der Natur besitzen (PRINČIČ et al., 1998). PAPEN et al. (2002) konnten erste Hinweise auf die Anwesenheit autotropher Nitrifizierer in der Fichtenphyllosphäre erarbeiten. Der direkte Nachweis und die genaue Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer in der Phyllosphäre der Fichte standen dagegen noch aus. Dieser Nachweis und die genaue Lokalisation wurden mit der vorliegenden Arbeit erbracht. Ferner wurden die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer in der Fichtenphyllosphäre bestimmt. Neben der Untersuchung über einen potentiellen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Stickstoffbelastungen der Probenstandorte und der Besiedlung der Phyllosphäre wurde in dieser Arbeit die saisonale Entwicklung der Besiedlung näher betrachtet. Um den Besiedlungsvorgang charakterisieren zu können, wurden erste Hinweise hierzu an unter kontrollierten Laborbedingungen herangezogenen Fichtenkeimlingen, die künstlich mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert wurden, erarbeitet.

### 4.1 Anforderungen der autotrophen Nitrifizierer an ihre Umwelt

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand in einer sorgfältigen Auswahl der Untersuchungsgebiete, in der Bestimmung des Probenmaterials und in der Festlegung eines Intervalls für die Probenahmen. Mit den Standorten Höglwald und Villingen wurden zwei Untersuchungsgebiete (s. 2.1) ausgewählt, die sich beide im Baumbestand und Alter der Fichten, in den Boden-pH-Werten und im Klima annähernd gleichen (BUTTERBACH-BAHL et al., 2002; FEGER, 1992). Bei beiden Standorten wurden im Boden keine autotrophen Ammoniak-Oxidierer und nur vereinzelt Nitrit-Oxidierer nachgewiesen (PAPEN & VON BERG, 1998; DAUM, 1999). Im Gegensatz zu Villingen umgeben den Standort Höglwald landwirtschaftlich intensiv genutzte Felder, die direkt an den Waldrand heranreichen (BUTTERBACH-BAHL et al., 2002; RASPE, et al., 1998). Durch die intensive Landwirtschaft in der unmittelbaren Nachbarschaft des Standortes Höglwald ist eine kontinuierliche und ausreichende Versorgung der autotrophen Nitrifizierer mit dem Ausgangssubstrat Ammoniak (HYMAN & ARP, 1995; BRUNS et al., 1998), welches so-

wohl in gasförmiger als auch in wässriger Form in den Kronenraum der Fichten gelangen kann, gewährleistet (HUBER, 1997). Vor allem die Ammoniak-Ausbringung in Form einer Düngung der Felder durch Gülleausbringung tritt am Standort Villingen zurück. Die Stickstoffbelastung des Standortes Villingen fällt daher u.a. um die Hälfte bis ein Drittel geringer aus (FEGGER et al., 1992). Für die Probenahmen und Untersuchungen stehen damit zwei Standorte zur Verfügung, die sich besonders in der Versorgung durch Stickstoff unterscheiden. Es wurde daher die Arbeitshypothese verfolgt, daß am Standort Höglwald autotrophe Nitrifizierer im Kronenbereich der Fichten zu finden sein könnten, während am Standort Villingen aufgrund der schwachen atmosphärischen Stickstoffbelastung (FEGGER et al., 1992), keine Nitrifizierer im Kronenraum zu erwarten wären. Diese Hypothese ergab sich auch durch den bisherigen Nachweis der autotrophen Nitrifizierer in der Phyllosphäre der Fichten aus dem Höglwald durch PAPEN et al. (2002). Mit der Auswahl der Standorte Höglwald und Villingen konnte der Zusammenhang zwischen der Besiedlung der Phyllosphäre von Fichten und der Stickstoffbelastung des Standortes herausgearbeitet werden. Für den Nachweis autotropher Nitrifizierer in der Phyllosphäre stellte sich zunächst die Frage, ob eine Besiedlung der Phyllosphäre durch Mikroorganismen überhaupt möglich ist. Wenn man sich die Forschungsergebnisse von BARTHLOTT & NEINHUIS (1997) über die schmutzabweisenden Eigenschaften von pflanzlichen Oberflächen - besonders Blätter, auch „Lotuseffekt“ genannt, betrachtet, ist man geneigt, diese Frage zunächst zu verneinen. Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, daß Mikroorganismen als z.B. pathogene Keime zahlreiche Krankheiten bei Pflanzen auslösen (JOHNSON & STOCKWELL; 1998). Jahrzehntelange Forschung auf dem Gebiet „Wechselwirkung Pflanze – Mikroorganismen“ (DOMMERMUES, 1977; KINKEL, 1997; HIRANO & UPPER, 2000) haben gezeigt, daß sich Mikroorganismen äußerst erfolgreich an ein Leben in der Phyllosphäre angepaßt haben. Die entscheidende Frage für die Besiedlung der Phyllosphäre ist, ob das Blatt als Ökosystem die Anforderungen der jeweiligen Mikroorganismen zum Überleben erfüllen kann (HIRANO & UPPER, 2000). Ist dies möglich, steht einer Besiedlung des Blattes und der Phyllosphäre grundsätzlich nichts im Wege. Wie bereits in der Einleitung unter 1.3 ausgeführt, erfüllen Fichtennadeln durchaus die Anforderungen für ein Überleben autotropher Nitrifizierer. Als besonders geeignet erweist sich dabei der Nadelblatt-Apoplast. Die Experimente von PAPEN et al. (2002) mit Fichtennadeln haben ergeben, daß im aufgeschlossenem Nadelmaterial deutlich mehr autotrophe Nitrifizierer über die MPN-Technik registriert werden konnten, als mit intakten Nadeln, d.h. auf der Nadelblatt-Oberfläche waren weniger Zellen autotropher Nitrifizierer nachzuweisen, als im Nadelblattgewebe. Daher wurden Fichtennadelblätter als Untersuchungsmaterial ausgewählt, weil hier mit hoher Wahrscheinlichkeit die autotrophen Nitrifizierer eindeutig nachgewiesen und lokalisiert werden konnten. Kleine Zweige und Ästchen, deren Rinden und evtl. Flechtenaufwuchs wurden nicht berücksichtigt und aus den Fichtennadelproben sorgfältig entfernt. Um die Vergleichbarkeit der Fichtennadeln zu gewährleisten und evtl. Unterschiede aufzudecken, welche die Besiedlung mit autotrophen Nitri-

fizierern ermöglichen bzw. verhindern konnten, wurden die Fichtennadeln vermessen und mikroskopisch begutachtet (s. 2.4). Der Vergleich der Meßdaten (s. 3.1) zwischen den Fichtennadeln aus dem oberen und unteren Kronenbereich ergab, daß die Nadeln aus dem oberen Kronenbereiche zwar nicht länger und breiter, aber schwerer waren und eine z.T. größere Blattfläche aufwiesen. Auch die Anzahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche war bei den Nadeln aus dem oberen Kronenbereich erhöht. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht festgestellt werden. Der Vergleich der Maße zwischen beiden Standorten zeigte weitgehende Übereinstimmung, so daß sich die Nadeln aus dem Höglwald bzw. Villingen in ihrer Größe, ihrem Gewicht, der Blattfläche und Spaltöffnungsanzahl  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche fast vollständig glichen (s. Tab. 3.1 und 3.2). Diese Tatsache wird auch durch das äußere Erscheinungsbild der Nadeln bestätigt, wie man den Abbildungen 3.1 a und b entnehmen kann. Die ermittelten Maße der Nadeln stimmen mit den Werten aus der Literatur überein. BREHMER (1981) gibt in ihrer Arbeit die Daten von Sonnen- und Schattennadeln wieder. Im Vergleich zu diesen Literaturwerten bewegen sich die ermittelten Maße zwischen den niedrigen Werten der Schattennadeln und den deutlich höheren Werten der Sonnennadeln. Für weitere Vergleiche wird an dieser Stelle für die Länge der Nadeln auf PFAUCH (1963) und RIEDERER et al. (1988), für die Anzahl der Spaltöffnungen  $\text{mm}^{-2}$  Blattfläche auf COLLEAU (1966) und BREHMER (1981) und für das Nadelgewicht auf FRÖHLICH (1969) verwiesen. Im Anschluß wurde die Blattoberfläche der Fichtennadeln mikroskopisch näher betrachtet. Dabei stellte sich heraus, daß die Blattoberflächen der Nadeln aus Villingen frei von Ablagerungen und Bewuchs waren (s. Abb. 3.2), und die Stomatareihen an den weißen Wachskappen, welche die Spaltöffnungen bedeckten, eindeutig zu erkennen sind (s. Abb. 3.3). Dieser Verschuß der äußeren Atemhöhle ist nicht nur auf Fichten beschränkt, sondern bei einer Vielzahl von Gymnospermen zu finden (NAPP-ZINN, 1966). Die Abdeckung dient u.a. zur Verlangsamung des Austausches von Wasserdampf (FINK, 1996). Eine Charakterisierung dieser Wachskappen mit entsprechenden rasterelektronischen Abbildungen ist u.a. in der Arbeit von BREHMER (1981) zu finden. Im Gegensatz hierzu weisen die Oberflächen der Fichtennadeln aus dem Höglwald sowohl aus dem unteren als auch dem oberen Kronenbereich deutlich Ablagerungen und einen Bewuchs auf, der z.T. sehr dicht ist (s. Abb. 3.4) und über weite Strecken die Stomatareihen überdeckt. Dieser Befund ist nicht ungewöhnlich. Bereits MISHRA & DAS haben 1981 beschrieben, daß eine Besiedlung von Koniferennadeln mit Pilzen möglich ist und auch SCHREIBER & SCHÖNHERR (1992) haben Bewuchs feststellen können. Eine genauere Untersuchung über den Zusammenhang der Nadeloberflächenparameter Wachsqualität, Staub- und Epibiontenbelegung von Fichtennadeln in Abhängigkeit zu Luftschadstoffen und feinen Stäuben zeigen TRIMBACHER & WEISS (2000). Daher ist es nicht weiter ungewöhnlich, daß die Fichtennadeln des Standortes Höglwald, der durch seine Lage einer erhöhten Staub- und Stickstoffdeposition ausgesetzt ist, einen solchen Belag aufweisen. Daneben sind auf zahlreichen Nadeln Stomata zu finden, deren weiße Wachskappen vollständig fehlen. Die Spaltöffnungen

liegen ungeschützt offen (s. Abb. 3.5, Pfeile). Heiss (1979) konnte mit Untersuchungen zeigen, daß im Laufe der Zeit die Wachse der Kappen verschmelzen, und durch die Bewegungen der Schließzellen die Möglichkeit besteht, daß die Kappen bei Schattennadeln erodieren und völlig verschwinden (BREHMER, 1981). Der Verlust und die Erosion der Wachskappen erscheint daher im Zusammenhang mit der Umweltsituation am Standort Höglwald nicht ungewöhnlich. Die Spaltöffnungen der Nadeln aus Villingen sind verschlossen (s. Abb. 3.3). Die Spaltöffnungen besitzen nach FRÖHLICH (1969) eine durchschnittliche Breite von 30  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 45  $\mu\text{m}$ . Vergleicht man diese Werte mit der Zellgröße der autotrophen Nitrifizierer, die eine Länge bis zu 2  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 1  $\mu\text{m}$  aufweisen und sich zudem durch ihre Begeißelung aktiv fortbewegen können (WATSON et al., 1989), ist eine Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten durch die Spaltöffnung über einen Feuchtigkeitsfilm durchaus wahrscheinlich, wenn die Wachskappen entsprechend fehlen (WILSON et al., 1999). Einer Besiedlung des Apoplasten und die Etablierung von autotrophen Nitrifizierern steht somit nichts im Wege. Ein mikroskopischer Längsschnitt durch die Fichtennadeln der beiden Standorte zeigt, daß die Struktur der Fichtennadel-Apoplasten sehr ausdifferenziert und kleinräumig gegliedert ist und sich nicht weiter unterscheidet (s. Abb. 3.8 und 3.9). Zusammenfassend kann man also festhalten, daß sich die Fichtennadeln der beiden Standorte und im Kronenraum in ihren Maßen, dem äußeren Erscheinungsbild und der Struktur des Apoplasten nicht weiter unterscheiden. Dagegen zeigte die Untersuchung der Blattoberflächen, daß die Nadeln aus dem Höglwald im Gegensatz zu Villingen deutlich mit Ablagerungen und Bewuchs bedeckt waren, und die Spaltöffnungen der Stomata an vielen Bereichen ohne die weißen Wachskappen offen dalagen, so daß eine Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten möglich war. So spielt nicht nur die Stickstoffversorgung eine entscheidende Rolle bei der Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten, sondern auch die offene Exposition der Spaltöffnungen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Besiedlung des Apoplasten.

Im letzten Schritt wurden die Intervalle für die Probenahmen (s. 2.3) bestimmt. Unter Berücksichtigung der Generationszeiten von 8 h bis zu mehreren Tagen der autotrophen Nitrifizierer (ROTHAUWE et al., 1997) und der sicherlich nicht optimalen Wachstumsbedingungen an den Standorten kommt man unweigerlich zu dem Schluß, daß sich die Kolonien der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten nur sehr langsam vermehren (LAANBROEK & WOLDENDROP, 1995). Um dennoch einen Überblick über eine mögliche Abhängigkeit der Kolonien von Umweltbedingungen und die zeitlichen Entwicklung der Population zu erhalten, wurden für ein Jahr zwei Probenahmen angesetzt. Die erste Probenahme fand im Frühjahr statt. Dabei war zu erwarten, daß die autotrophen Nitrifizierer durch die Gülleausbringung im Frühjahr auf die umliegenden Felder und des damit verbundenen Anstiegs der Ammoniak-Konzentration in der Atmosphäre zunächst ihre Stoffwechselaktivität steigerten. Die zweite Probenahme fand im Herbst desselben Jahres statt. Im Herbst sollte die Nitrifizierer-Population ihre maximale

Größe erreicht haben, d.h. die autotrophen Nitrifizierer sollten in größeren Zellzahlen als im Vergleich zu den Frühjahrsproben nachzuweisen sein.

### **4.2 Existenz autotropher Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten**

Die bisherigen Ausführungen machen deutlich, daß eine Besiedlung der Phyllosphäre mit autotrophen Nitrifizierern nicht außergewöhnlich ist (PAPEN et al., 2002; HEUSER, 2002). Die entscheidende Frage ist, ob sich die autotrophen Nitrifizierer in dem Ökosystem Phyllosphäre über längere Zeit hinweg etablieren können. Zu diesem Zweck benötigen die Nitrifizierer einen Ort im Ökosystem Phyllosphäre, der ihren Anforderungen (WATSON et al., 1989) gerecht wird. Die oben ausgeführten Betrachtungen zeigen deutlich, daß mit dem Apoplasten in den Fichtennadeln ein solcher Ort zur Verfügung steht, der geradezu in idealer Weise diesen Ansprüchen Rechnung trägt. Daher konzentrierten sich die Untersuchungen für den Nachweis, die Lokalisation und die Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer im Kronenraum der Fichte auf diesen speziellen Bereich der Fichtennadeln. Zunächst wurde über die klassische MPN-Technik der Nachweis auf die Anwesenheit der autotrophen Nitrifizierer in den entsprechenden Fichtennadelproben geführt. Nach dem Aufspüren der Bakterien in den Nadelproben wurde über die molekularbiologische PCR-Technik der direkte genetische Beweis erbracht, daß es sich bei den über die MPN-Technik aufgefundenen Nitrifizierer auch tatsächlich um autotrophe Nitrifizierer handelte. Die Sequenzierung der über die PCR-Technik vervielfältigten Gensequenzen ergab eine erste Bestimmung der Gattungszugehörigkeit der Nitrifizierer. Im weiteren Verlauf erfolgte die genaue Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer im Fichtennadel-Apoplasten über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop. Im abschließenden Schritt wurden die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblattgewebe ermittelt.

#### **4.2.1 Nachweis der autotrophen Nitrifizierer**

Die ersten Untersuchungen der Fichtennadeln auf Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierern erfolgte mit Hilfe der klassischen MPN-Technik (s. 2.7) in unmittelbarem Anschluß an die Probenahmen. Damit konnte ein erster, indirekter Nachweis der autotrophen Nitrifizierer anhand ihrer Stoffwechselfähigkeit geführt werden und ermittelt werden, ob die Zellen überlebensfähig sind (BAST, 1999). Zum anderen diente die Untersuchung als Vergleichsgrundlage zu den Ergebnissen, die PAPEN et al. (2002) erarbeitet hatten. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der MPN-Ansätze (s. 3.3.1.1) ergibt, daß in allen Fichtennadelproben von Herbst 2000 bis Herbst 2002 des Standortes Höglwald sowohl Ammoniak-Oxidierer als auch Nitrit-Oxidierer über ihre



Stoffwechselprodukte Nitrit bzw. Nitrat nachzuweisen waren. Die Ergebnisse aus dem Waldgebiet Villingen zeigen, daß in den Fichtennadelproben von Herbst 2000 bis Herbst 2002 übereinstimmend keine Ammoniak-Oxidierer über ihre Nitrit-Produktion nachzuweisen waren. Allerdings konnten über denselben Zeitraum hinweg Nitrit-Oxidierer über ihre Nitrat-Produktion aufgespürt werden. Ob die Proben aus dem unteren Kronenbereich der Fichten oder aus dem oberen Kronenraum kamen, hatte auf die Ergebnisse keine Auswirkungen und es zeigten sich weder bei den Proben aus dem Höglwald noch aus Villingen Unterschiede. Die Nachweise der Stoffwechselprodukte Nitrit bzw. Nitrat ergaben in den MPN-Ansätzen nur schwache Farbsignale in den entsprechenden Nachweistests (s. 2.7.3.1). Diese schwachen Signale waren jedoch so eindeutig, daß eine klare und einwandfreie Zuordnung möglich war und eine sichere Auswertung durchgeführt werden konnte.

Zunächst galt es abzuklären, ob es sich bei den Farbsignalen tatsächlich um die erwarteten Ergebnisse der Nachweisreaktionen handelte oder um Artefakte, die aufgrund anderweitiger Störfaktoren wie z.B. durch die Inhaltsstoffe der Fichtennadeln verursacht wurden (s. 3.2.2.2). Daher wurde die MPN-Technik zu Beginn ohne Fichtennadeln mit den Bakterienreinkulturen *N. europaea* für die Ammoniak-Oxidierer und *N. winogradskyi* für die Nitrit-Oxidierer, sowie mit der Nitrifizierermischkultur aus dem Höglwald (s. 2.6.1) angesetzt, inkubiert und ausgewertet (s. 3.2.1.4). Festzuhalten bleibt hier nur, daß diese Validierung der MPN-Technik die erwarteten Ergebnisse lieferte. Die Nachweise zeigten aufgrund der hohen Mengen an Nitrit und Nitrat in allen Fällen die erwarteten tief roten Farbsignale. Im folgenden Validierungsansatz (s. 3.2.2.2) wurde überprüft, ob die durch den Aufschluß der Fichtennadeln freigesetzten Inhaltsstoffe, wie z.B. Harze etc. die Nachweistests für die autotrophen Nitrifizierer störten. Auch in diesem Fall verlief die Auswertung der MPN-Ansätze wie erwartet. Die Farbsignale waren ebenfalls tief rot gefärbt. Die Inhaltsstoffe der aufgeschlossenen Fichtennadeln beeinflussten die Nachweistests in keiner Weise. Daher handelte es sich bei den Signalen der MPN-Ansätze aus dem Höglwald und aus Villingen nicht um Artefakte. Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Validierungen mit den Ergebnissen aus den MPN-Ansätzen aus dem Höglwald und Villingen fiel auf, daß die Signale aus den Proben im Gegensatz zu den Signalen aus den Validierungen nur schwach rot gefärbt waren. Das läßt vermuten, daß nur wenig Nitrit bzw. Nitrat in den Ansätzen aus dem Höglwald und Villingen gebildet wurde. Aus der geringen Konzentration der Stoffwechselprodukte ist zu entnehmen, daß entweder nur wenige Zellen der autotropen Nitrifizierer vorhanden waren, oder die Kulturbedingungen in den MPN-Ansätzen nicht optimal waren, so daß wenige Zellen stoffwechselaktiv wurden. Die tief roten Signale der Nachweistests der Validierungen sind damit zu erklären, daß in den Validierungsversuchen zum einen höhere Zellzahlen der Nitrifizierer eingesetzt wurden, zum anderen wurden die Nitrifizierer der Bakterienkulturen während der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet, in der die Stoffwechselaktivität ihr Maximum erreicht hatte. In den MPN-Ansätzen mit den Fichtenproben aus dem Höglwald und Villingen war zudem nach

1 - 2 Tagen Kultivierung die Entwicklung einer Begleitflora zu beobachten, die sich z.T. aus Pilzen als auch Bakterien zusammensetzte. Bei näherer Betrachtung ist dieser Umstand nicht weiter verwunderlich, da organische Stoffe aus dem aufgeschlossenen Nadelmaterial stammten, so daß diese Begleitflora sehr schnell hochwachsen konnte. Diese Beeinflussung von MPN-Ansätzen zum Nachweis autotropher Bakterien über anorganische Selektivnährmedien wurde bereits von HEUSER (2002) beobachtet und näher untersucht, der klar den Nachweis von Zuckerstoffen nach dem Blattaufschluß im anorganischen Nährmedium führen konnte. Diese organischen Nährstoffe waren auch in den Validierungsansätzen der MPN-Technik vorhanden. Dort entwickelte sich jedoch keine Begleitflora. Der einzige Unterschied lag in den eingesetzten Fichtennadeln für die MPN-Ansätze. Während die Ansätze mit den Umweltproben die unsterilen Fichtennadeln aus dem Höglwald bzw. Villingen enthielten (s. Abb. 3.4), wurden für die Validierungsansätze die sterilen Fichtennadeln der in Freiburg unter sterilen Bedingungen herangezogenen Fichtenkeimlinge (s. 2.2), die noch nicht mit Bakterien inokuliert waren, verwendet. Diese Fichtennadeln zeigten keinen Bewuchs (s. Abb. 3.6) und waren steril. Da alle Nadelproben unter sterilen Bedingungen geerntet und aufgearbeitet wurden, stammte die Begleitflora in den MPN-Röhrchen aus dem Bewuchs der unsterilen Nadelproben. Aus welchen Mikroorganismen sich diese Begleitflora zusammensetzte, wurde nicht weiter untersucht, jedoch ist zu vermuten, daß diese Begleitflora die Nachweistests auf Nitrit und Nitrat beeinflusste (BAST, 1999) und somit das Ergebnis aus den MPN-Ansätzen verfälschte. So bilden Pilze bzw. heterotrophe Nitrifizierer Nitrit und Nitrat (DAUM et al., 1998; WRAGE et al., 2001), welches dann in den MPN-Ansätzen für die autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen wird, obwohl keine autotrophen Nitrit-Oxidierer vorhanden sind (BAST, 1999). Daher ist es denkbar, daß die schwachen Farbsignale in den MPN-Ansätzen aus dem Höglwald bzw. Villingen nicht nur von den autotrophen, sondern auch heterotrophen Nitrifizierer gebildet wurden.

Um dieser Fehldeutung aus dem Wege zu gehen und letztendlich einen einwandfreien Beweis der autotrophen Nitrifizierer in den MPN-Kulturröhrchen zu erbringen, wurde beschlossen, die Zellen der Nitrifizierer über die molekularbiologische PCR-Technik (s. 2.8) auf genetischer Ebene anhand des Gens für das 16S rRNA-Molekül direkt nachzuweisen. Nachweise ähnlicher Art wurden bereits von DEGRANGE et al. (1998) und FÉRAY et al. (1999) durchgeführt. Desweiteren versprach der Nachweis auf genetischer Ebene zusätzliche Informationen, wie z.B. die Abgrenzung der Arten und eine phylogenetische Zuordnung (HEAD et al., 1993; SMITH et al., 2001; ORSO et al., 1994), die das erwartete Gesamtbild der autotrophen Nitrifizierer im Kronenraum der Fichte abrunden konnten. Die Verwendung der 16S rRNA-Gene bietet den Vorteil, daß für genaue Recherchen ein großer Datenbestand an 16S rRNA-Gensequenzen in den entsprechenden Gendatenbanken (s. 2.8.2.1) vorhanden ist, der eine sichere Auswahl, Überprüfung und Einsatz der für die PCR-Technik notwendigen Oligodesoxynukleotide möglich macht (PACE et al., 1986; WARD et al., 1992; MACRAE, 2000; ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Zu-

sätzlich lagen sowohl für den Einsatz bei den Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierern zahlreiche Untersuchungen weiterer Forschergruppen vor, so daß eine Auswahl der Oligodesoxynukleotide und eine phylogenetisch nähere Bestimmung der Nitrifizierer über eine Sequenzierung und einem Datenbankabgleich möglich war (HEAD et al., 1993; ORSO et al., 1994; STEPHEN et al., 1996; KOWALCHUK et al., 1998, 2000). Der Nachweis über Strukturgene erfolgte nicht, da zum einen Oligodesoxynukleotide für einen genauen Nachweis der Ammoniak-Oxidierer in der Gruppe der  $\beta$ -*Proteobacteria* sowohl für das Gen *amoA* des Enzym Ammoniakmonooxygenase als auch zugleich für das Gen *pmoA* des Enzyms der partikulären Methanmonooxygenase, welches auch bei Methan-oxidierende Bakterien zu finden ist, spezifisch sind (NORTON et al., 2002). Zum anderen ist bisher bei den Nitrit-Oxidierern kein Strukturgen bekannt, welches die nötige Spezifität aufweist (KRISTEIN & BOCK, 1993). Neben dem für das 16S rRNA-Gen von *Nitrobacter* aus der Literatur ausgewählte Oligodesoxynukleotid-Paar (s. Tab. 2.2; DEGRANGE & BARDIN, 1995) wurde ein neues Oligodesoxynukleotid-Paar, Nw f und Nw r, durch Gensequenzvergleiche (s. 3.2.1.1 und Abb. 3.11) ausgewählt. Beide neu gewählten Oligodesoxynukleotide wiesen eine hohe Spezifität für die Gattung *Nitrobacter* auf (s. Abb. 3.12), während bei dem Oligodesoxynukleotid-Paar aus der Literatur nur das Oligodesoxynukleotid FGPS1269' eine Spezifität für *Nitrobacter* zeigte. Um die Reaktionsbedingungen der PCR-Technik zu optimieren und die korrekte Wirkungsweise der Oligodesoxynukleotide zu überprüfen, fand zunächst eine Validierung der Oligodesoxynukleotide und der PCR-Reaktionsbedingungen statt (s. 3.2.1.2). Die Validierung anhand der Bakterienkulturen (s. 2.6.1) lieferte die erwarteten Ergebnisse, wie aus den Agarose-Gel-Bildern (s. Abb. 3.15 – 3.17) zu entnehmen ist. Zugleich konnte erstmals direkt nachgewiesen werden, daß es sich bei den aus der Nadelstreu des Höglwaldes angereicherten Nitrifizierern tatsächlich um autotrophe Nitrifizierer handelt. Bei der in Abb. 3.16 im Agarose-Gel enthaltenen zweiten Bande, die unter dem eigentlich richtigen PCR-Amplifikat der Nitrit-Oxidierer in Spur 4 und 10 zu erkennen ist, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Amplifikat, dessen Reaktionsbedingungen nicht perfekt waren. Ein Grund für das Auftreten könnte in einer zu hohen Anzahl von Reaktionszyklen oder in einer noch nicht richtig angepaßten Hybridisierungstemperatur während der PCR-Reaktion liegen (NEWTON & GRAHAM, 1994). Aus den Agarose-Gel-Bildern geht hervor, daß die PCR-Reaktion erfolgreich abgelaufen ist und daß die Amplifikate die richtige Länge aufweisen. Man kann jedoch nicht entnehmen, ob diese PCR-Amplifikate auch tatsächlich die Basensequenz aufweisen, wie sie aus den Gendatenbanken zu entnehmen sind. Um diese Fehlermöglichkeit auszuschließen, wurden die PCR-Amplifikate sequenziert, um die exakte Basensequenz zu ermitteln und eindeutige Aussagen über den erfolgreichen Ablauf der PCR-Reaktionen machen zu können (s. 3.2.1.3). Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist (s. Abb. 3.18 – 3.20), sind die PCR-Reaktionen und der Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über das 16S rRNA-Gen bei den Reinkulturen absolut richtig abgelaufen. Der Vergleich der durch die Sequenzierung erhaltenen 16S rRNA-DNA-

Sequenzen der bisher unbekanntem autotrophen Nitrifizierer aus dem Höglwald über die Genbank GenBank hat ergeben, dass es sich bei dem Ammoniak-Oxidierer mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um einen Vertreter der Gattung *Nitrosospira* und nicht um *Nitrosomonas* handelt (s. Tab. 3.4). Dieser Befund wird durch KOWALCHUK et al. (1997) bestätigt, der mit einem Verweis auf BELSER (1979) und weitere Autoren darauf hinweist, daß in terrestrischen Habitaten gewöhnlich die Gattung *Nitrosospira* anzutreffen ist. Der Vergleich der Sequenzen des Nitrit-Oxidierers über die Genbank GenBank hat ergeben (s. Tab. 3.5), dass es sich tatsächlich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um einen Vertreter der Gattung *Nitrobacter* handelt. *Nitrobacter* ist bisher die einzige Gattung, die auf dem Land anzutreffen ist (WATSON et al., 1989), so daß auch dieses Ergebnis als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Damit wurden mit dieser Arbeit erstmals Hinweise der Gattungszugehörigkeit und der phylogenetischen Zuordnung auf die im Höglwald aufzufindenden autotrophen Nitrifizierer erbracht. Wie bei der Validierung der MPN-Ansätze mit den Fichtennadeln (s.o., s. 3.2.2.2) schloß sich auch bei der Validierung der PCR-Technik eine Testreihe an, bei der die PCR-Ansätze künstlich mit Fichtennadeln versetzt wurden, um zu testen, ob die Fichtennadel-DNA die PCR-Nachweise stören würde. Wie die Ergebnisse zeigen (s. 3.2.2.1), verlief hierbei die PCR-Reaktion zum Nachweis der Ammoniak-Oxidierer (s. Abb. 3.37) und der Nitrit-Oxidierer anhand der neu ausgewählten Oligodesoxynukleotide fehlerfrei (s. Abb. 3.38). Der Einsatz der aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotiden zum Nachweis der Nitrit-Oxidierer (s. Abb. 3.39) zeigt zahlreiche weitere starke Banden, die auf eine Amplifikation von unspezifischen, aus der Fichten-DNA stammenden Gensequenzen schließen lassen, da die Signale auch bei den Negativkontrollen auftraten, die anstatt Bakterien-DNA Wasser als Ausgangsmaterial enthielten. Da die Banden eine Länge von 500 bis 600 Basen aufweisen und damit sehr eng an den erwarteten Banden lagen, wurde für die weiteren Versuche dieses Oligodesoxynukleotid-Paar zunächst nicht verwendet. Der Zusatz einer 10%igen Magermilch-Lösung zur PCR-Anwendung mit dem Ziel, unerwünschte Inhaltsstoffe aus dem Pflanzenmaterial zu binden, und somit die PCR-Reaktionen ungestört ablaufen zu lassen (<http://www.biologie.uni-ulm.de/bio2/knoop/met.html>), schlug gänzlich fehl. Wie aus den Agarose-Gel-Bildern zu entnehmen ist, sind die erwarteten Banden überhaupt nicht zu finden oder es sind zahlreiche unspezifische Banden zu erkennen. Daher wurde von einem weiteren Einsatz dieser PCR-Modifikation abgesehen.

Nach der erfolgreichen Optimierung und Validierung der Oligodesoxynukleotide und der PCR-Technik erfolgte nun die Anwendung der PCR-Technik für den Nachweis der autotrophen Nitrifizierer im MPN-Ansatz. Zu diesem Zweck wurde auf die MPN-Ansätze aus der Validierung (s. 3.2.1.4 und 3.2.2.2) zurückgegriffen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die PCR-Technik für eine Anwendung zur nachträglichen Kontrolle der Bakterienzellen in den MPN-Kulturröhrchen geeignet ist. Nach Abschluß aller Validierungstest für die PCR-Technik wurden im nächsten Schritt alle MPN-Ansätze mit den Proben aus dem Höglwald und Villingen einer

Kontrolle auf die Anwesenheit von Zellen autotropher Nitrifizierer hin untersucht (s. 3.3.1.1). Die Auswertung der MPN-Ansätze aus dem Höglwald anhand der Stoffwechselprodukte hat ergeben, daß in allen Proben sowohl Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierer vorhanden waren (s.o.). Die Kontrollen der MPN-Kulturröhrchen über die PCR-Technik zum direkten genetischen Nachweis der Bakterienzellen der autotrophen Nitrifizierer zeigen allerdings ein anderes Bild. Nur in den Proben Herbst 2000 und Herbst 2001 konnten in den MPN-Kulturröhrchen der Höglwald-Proben zum Nachweis der Ammoniak-Oxidierer tatsächlich PCR-Amplifikate in den Agarose-Gelen (s. Abb. 3.46 b und 3.48 b, Pfeile) entdeckt werden. Es waren also Ammoniak-Oxidierer in diesen Proben direkt nachzuweisen. In allen übrigen Fällen verlief der Nachweis der Bakterienzellen über die PCR-Technik negativ. Da die Validierung einwandfreie und klare Ergebnisse erbracht hatte (s.o.), wurde eine fehlerhafte Durchführung der PCR-Technik ausgeschlossen. Eine mögliche Ursache für den negativen Nachweis der autotrophen Nitrifizierer über die PCR-Technik lag mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, daß zu wenig Bakterienzellen in den MPN-Kulturröhrchen vorhanden waren, aus denen die bakterienspezifische Gesamt-DNA isoliert werden konnte (NEWTON & GRAHAM, 1994). Das würde auch die schwachen Farbsignale des Nachweises der Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat (s.o.) erklären. Die Kontrolle der MPN-Ansätze mit den Proben aus Villingen verlief ebenfalls negativ. Aufgrund der nicht erfolgreich verlaufenen PCR-Reaktionen konnte letztlich über die Anwendung der PCR-Technik nicht einwandfrei geklärt werden, ob es sich bei den Nitrit- bzw. Nitrat-Nachweisen aus den MPN-Röhrchen um Stoffwechselprodukte von autotrophen oder heterotrophen Nitrifizierern handelte. Nachdem mit allen bisherigen angewandten Nachweisverfahren nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes und aus Villingen nun tatsächlich autotrophe Nitrifizierer vorhanden sind, wurde dazu übergegangen, die PCR-Technik auf die Fichtennadel-Proben direkt anzuwenden, ohne die autotrophen Nitrifizierer erst über die MPN-Technik anzureichern. Damit wurde nicht nur ein Verlust an Zellmaterial durch zahlreiche Überführungsschritte und die Kontaminationsgefahr verringert, sondern die Bakterienzellen direkt in den Nadelproben nachgewiesen. Aus den Ergebnissen (s. 3.3.1.2) der aus den Nadelproben direkt durchgeführten PCR-Anwendungen kann man zunächst entnehmen, daß in den Höglwald-Proben bis auf die Probe des Herbstes 2001 Ammoniak-Oxidierer klar im Agarose-Gel-Bild nachzuweisen waren (s. Abb. 3.53, Pfeile). Daß Ammoniak-Oxidierer auch in der Probe Herbst 2001 vorhanden waren, zeigte der MPN-Ansatz und die PCR-Anwendung aus diesem MPN-Ansatz, die positiv verlaufen war (s. Abb. 3.48 b). Die PCR-Amplifikate sind nur schwach zu erkennen, was darauf schließen läßt, daß die Ammoniak-Oxidierer tatsächlich nur in geringer Zellzahl vorkommen. Die Überprüfung der Nadel-Proben aus Villingen auf die Anwesenheit von Ammoniak-Oxidierer hingegen zeigte überhaupt keine PCR-Amplifikate, auch keine schwachen (s. Abb. 3.54). Der Nachweis der Nitrit-Oxidierer verlief bei der Überprüfung der Höglwald-Proben mit den neu ausgewählten Oligodesoxynukleotiden hingegen nur in einem Fall, in der Probe

Frühling 2001, wenn auch schwach, so doch eindeutig positiv (s. Abb. 3.55). In allen anderen Fällen waren die Signale zu undeutlich, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Die Nadel-Proben aus Villingen sind eindeutig als negativ auf die Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer zu bewerten (s. Abb. 3.56). Aufgrund der schwachen Banden-Signale bei den Fichtennadel-Proben aus dem Höglwald in bezug auf die Nitrit-Oxidierer war nicht auszuschließen, daß die Reaktionsbedingungen für die PCR-Anwendung nicht optimal waren, wenngleich die Validierungsergebnisse (s.o.) diesbezüglich gegenteilige Ergebnisse zeigten. Es war zudem nicht ganz geklärt, ob überhaupt ausreichend genetisches Material der Nitrit-Oxidierer vorhanden war, so daß die neu ausgewählten Oligodesoxynukleotide möglicherweise nicht völlig korrekt in den PCR-Ansätzen reagieren konnten. Um diese Fragen eindeutig klären zu können, wurden die PCR-Ansätze auf die Überprüfung der Nitrit-Oxidierer aus den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes und aus Villingen wiederholt. Zu diesem Zweck wurden nun die aus der Literatur ausgewählten Oligodesoxynukleotide verwendet, deren korrekte Einsatzweise bereits vorher durch andere Arbeitsgruppen langjährig getestet war (DEGRANGE & BARDIN, 1995; DENI & PENNINCKX, 1999). Dieses Mal konnten in den Höglwald-Probe in allen Fällen deutlich DNA-Banden, und damit die Anwesenheit von Nitrit-Oxidierer, nachgewiesen werden, d.h. sie sind in den Höglwald-Proben eindeutig vorhanden (s. Abb. 3.57). Die PCR-Anwendung auf die Proben von Villingen zeigt dagegen nur in der letzten Probe, d.h. Herbst 2002 ein positives Signal (s. Abb. 3.58, Pfeil). Dieses Signal ist jedoch nicht weiter verwunderlich, denn im Sommer 2002 wurde das entsprechende Waldgebiet in Villingen einer Kalkung unterzogen, so daß es durchaus wahrscheinlich scheint, daß durch den Kalk Nitrit-Oxidierer in das Gebiet eingebracht wurden.

Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate der Ammoniak-Oxidierer aus den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes ergab, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Ammoniak-Oxidierer der  $\beta$ -*Proteobacteria* handelt (s. Abb. 3.59). Es konnte jedoch nicht endgültig geklärt werden, ob die Ammoniak-Oxidierer der Gattung *Nitrosomonas* oder *Nitrospira* zuzuordnen sind. Der Datenbankabgleich ließ keine eindeutigen Aussagen zu. Da die aus der Nadelstreu des Höglwaldes angereicherten Ammoniak-Oxidierer mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit der Gattung *Nitrospira* zuzuordnen sind, dürfte es sich auch bei den Ammoniak-Oxidierern direkt aus dem Nadelmaterial um Bakterien der Gattung *Nitrospira* handeln. Zukünftige Untersuchungen werden diesen Punkt klären müssen. Für den Nachweis der Nitrit-Oxidierer wurde auf die Sequenzierung aus Zeitgründen verzichtet. Ferner ist die Gattung *Nitrobacter* die einzige der Nitrit-Oxidierer, die bisher auf dem Land nachgewiesen wurde, alle anderen Gattungen sind ausschließlich in Gewässern nachgewiesen worden und zeigen zudem deutliche Abweichungen in der 16S rRNA-Gen-Basensequenz. So wird mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, daß es sich bei den im Nadelmaterial entdeckten Nitrit-Oxidierern um Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* handelt. Letztendlich bleibt festzuhalten, daß über die MPN-Technik die autotrophen Nitrifizierer tatsächlich in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes nachgewiesen werden konnten

und damit die Ergebnisse von PAPEN et al. (2002) nicht nur wiederholt, sondern eindeutig bestätigt werden konnten. Wie aber die widersprüchlichen Daten aus den Fichtennadel-Proben aus Villingen zeigen, stammte das in den MPN-Ansätzen nachgewiesene Nitrit bzw. Nitrat nicht nur von autotrophen Nitrifizierern, sondern es besteht durchaus die Möglichkeit, daß heterotrophe Nitrifizierer, die aufgrund des Zuckeranteils, der durch den Nadelaufschluß in das MPN-Medium gelangte, heranwachsen und während des Wachstums Nitrit bzw. Nitrat bilden. Daß die Fichtennadeln nicht steril sind und eine z.T. starke Begleitflora auf der Oberfläche aufweisen, zeigen zudem die Bilder der Nadelblatt-Oberflächen (s. Abb. 3.4). Daher steht fest, daß die Signale für Nitrit bzw. Nitrat sowohl von autotrophen als auch heterotrophen Nitrifizierern stammen können. Erst die molekularbiologische Überprüfung auf Anwesenheit der Zellen von autotrophen Nitrifizierern über die PCR-Technik anhand der 16S rRNA-Gensequenzen zeigte eindeutig, daß wirklich nur in den Fichten-Proben aus dem Höglwald autotrophe Nitrifizierer vorhanden sind, die mit hoher Wahrscheinlichkeit den Ammoniak-Oxidierern der  $\beta$ -*Proteobacteria* und den Nitrit-Oxidierern der Gattung *Nitrobacter* zugeordnet werden können. Die schwachen Signale des Nitritnachweises der Ammoniak-Oxidierer bei der MPN-Ansatz-Auswertung, die nicht erfolgreich verlaufene PCR-Anwendung zum Nachweis der Ammoniak-Oxidierer direkt aus den MPN-Kulturröhrchen, als auch die sehr schwachen DNA-Banden der Ammoniak-Oxidierer bei der PCR-Anwendung im Fichtennadelmaterial direkt lassen vermuten, daß sich wenige Zellen eines Ammoniak-Oxidierers in den Fichtennadel-Proben befinden, der im Vergleich zu *N. europaea*, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, deutlich langsamer wächst. Nach BELSER (1979) zeigt die Gattung *Nitrosomonas* gegenüber *Nitrosospira* ein deutlich besseres und schnelleres Wachstum. Dies und die Ergebnisse aus den Sequenzierungen lassen sehr stark vermuten, daß es sich bei den Ammoniak-Oxidierern um Vertreter der Gattung *Nitrosospira* handeln muß. Der alleinige Nachweis auf Anwesenheit von autotrophen Nitrifizierern in Fichtennadel-Proben über die MPN-Technik ist nicht zweifelsfrei. Erst der Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen, die auf genetischer Ebene über die PCR-Technik ermittelt wurden, zeigt ein wahres Gesamtbild.

## 4.2.2 Exakte Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer

Nach dem indirekten und direkten Nachweis autotropher Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes stellt sich die entscheidende Frage, wo genau sich die autotrophen Nitrifizierer im Fichtennadelblatt angesiedelt haben. Mit den bisherigen Nachweismethoden konnte die Frage der genauen Lokalisation nicht geklärt werden. Die autotrophen Nitrifizierer können sowohl auf der Nadelblatt-Oberfläche als auch im Nadelblatt-Gewebe selbst zu finden sein.

Zur exakte Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben wurde die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit der Auswertung über ein konfokales Laserrastermikroskop eingesetzt (s. 2.9; AMANN et al., 1995; CALDWELL et al., 1992). Das konfokale Laserrastermikroskop wurde als Lichtmikroskop unter Verwendung von Laserlicht dazu konstruiert, um im Gegensatz zu herkömmlichen Lichtmikroskopen oder Elektronenmikroskopen dicke, lichtdurchlässige Gewebe untersuchen zu können (SHEPPARD, 1993). Dünne Gewebeschnitte können zum einen kein optimales Abbild der Lage der autotrophen Nitrifizierer im Gewebe wiedergeben, da keine räumliche Darstellung in einem Abbild möglich ist, zum anderen besteht die große Gefahr, daß durch die große Anzahl der Schnitte, die notwendig werden, um eine Fichtennadel in ihrer Gesamtheit in Längsschnitten zu untersuchen, die Lage der Bakterienzellen im Gewebe bei der Präparation verändert wird, so daß die Bakterien aus ihrer ursprünglichen Lage entfernt werden, was zu Fehlinterpretationen und falschen Schlußfolgerungen führen könnte. Zum Dritten besteht das Risiko, daß sich Kontaminationen auf den dünnen Schnitten während der Präparation ablagern könnten, und damit keine Unterscheidung mehr möglich wird, ob es sich bei den Bakterienzellen um Nitrifizierer aus dem Gewebe oder um die Kontaminanten handelt. Um diesen Schwachpunkten entgegenzuwirken, wurden statt der in der Mikroskopie üblichen, dünnen Gewebeschnitte von ca. 10 µm Gewebeschnitte mit einer Dicke von ca. 100 µm über die Gefrierschnitt-Technik angefertigt (LEITCH et al., 1994). Ein herkömmliches Lichtmikroskop war für die Begutachtung dieser dicken Schnitt-Präparate nicht mehr geeignet. Durch die Ausstattung des konfokalen Laserrastermikroskops mit Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlänge (s. 2.9.7.1) wurde es möglich, durch den Einsatz der molekularbiologischen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungstechnik die autotrophen Nitrifizierer über mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligodesoxynukleotid-Sonden (s. 2.9.1) auf der genetischen Basis der 16S rRNA-Gene im Nadelblattgewebe zu markieren und nachzuweisen (AMANN et al., 1995; AMANN & LUDWIG, 2000). Neben dem Einsatz der Oligodesoxynukleotide zur Markierung der autotrophen Nitrifizierer direkt im Gewebe konnte so ein Bezug zu den Ergebnissen aus der PCR-Technik hergestellt werden. Ein Einsatz von Antikörpern anstelle von Oligodesoxynukleotide, der eine spezifischere Zuordnung der aufgefundenen Bakterien bis auf die Art möglich macht, setzt zunächst voraus, daß die autotrophen Nitrifizierer aus dem Nadelblattgewebe in Reinkultur isoliert werden (ASSMUS et al., 1997). Dieser Ansatz war aus Zeitgrün-



den im Rahmen dieser Arbeit nicht zu verwirklichen. Anfänglich stand die Validierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung anhand der Bakterienkulturen an (s. 3.2.1.5). Diese diente vor allem dazu, den Hybridisierungsablauf zu optimieren, die Spezifität der eingesetzten Oligodesoxynukleotid-Sonden zu überprüfen und die Konfiguration am konfokalen Laserrastermikroskop genau abzustimmen. Durch die enzymatische Entfernung der Ribosomen-Moleküle konnte klar nachgewiesen werden, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden wirklich an die Ribosomen binden (s. Abb. 3.29). Zum Nachweis der Spezifität der jeweiligen Oligodesoxynukleotid-Sonden für die entsprechend ausgewählte Bakteriengattung wurden Bakterienzellen der verschiedenen Gattungen miteinander gemischt, und diese Zellgemische mit den entsprechenden Oligodesoxynukleotid-Sonden hybridisiert. Dabei konnte eindeutig bewiesen werden, daß die Oligodesoxynukleotid-Sonden wirklich nur spezifisch für die jeweilige Bakteriengattung reagierten (s. Abb. 3.34 bis 3.36). Die Überprüfung der gleichzeitigen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI und des an die spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte über die Aufnahme eines Intensitätsprofils (s. Abb. 3.31 und 3.33), an dem abzulesen war, ob beide Fluoreszenzfarbstoffe an derselben Stelle im Präparat, nämlich in der Bakterienzelle, gebunden hatten. Über die Intensitätseinheiten konnte außerdem kontrolliert werden, welcher Farbstoff in größerer Konzentration gebunden hatte. Zusammenfassend kann man festhalten, daß alle Validierungstests wie erwartet erfolgreich verliefen. Im folgenden Versuchsabschnitt wurde die Validierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung anhand von Fichtennadel-Längsschnitten, die künstlich mit den Bakterienkulturen versetzt waren, durchgeführt (s. 3.2.2.3). Dies diente zum einen dazu, die Nachweisteknik auf die Gegebenheiten des Fichtennadelmaterials auszurichten, zum anderen die so gewonnen Ergebnisse und mikroskopisch erstellten Darstellungen für einen Vergleich mit den in den Fichtennadeln des Höglwaldes bzw. aus Villingen aufzufindenden autotrophen Nitrifizierer heranzuziehen, da bis zum Abschluß dieser Arbeit keine derartigen Vergleichsmöglichkeiten von anderen Arbeitsgruppen oder aus der Literatur bekannt waren. Wie aus den Abbildungen 3.44 und 3.45 (Pfeile) deutlich zu entnehmen ist, verliefen die Hybridisierungen im Fichtennadelgewebe erfolgreich. Die künstlich auf die Fichtennadel-Längsschnitte inokulierten Bakterienreinkulturen konnten mit den Oligodesoxynukleotid-Sonden spezifisch detektiert werden. Die Anwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit dem konfokalem Laserrastermikroskop verlief bei der Erstellung und Auswertung der Fichtennadel-Proben aus dem Höglwald und aus Villingen problemlos. Bei der Auswertung des erstellten Bildmaterials (s. 3.3.1.3) konnten in den Abbildungen mit den Proben aus dem Höglwald eindeutig Fluoreszenzsignale entdeckt werden, die darauf schließen ließen, daß es sich hierbei um Bakterienzellen, genauer um Zellen autotropher Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten handeln könnte (s. Abb. 3.60, 3.65, 3.67 und 3.69, weißer Kreis). Wie schon bei den Nachweisen durch die MPN-Technik stellte sich auch in diesem Fall sofort die Frage, ob es sich hierbei um echte Fluoreszenzsignale von Bakterienzellen, speziell den Zellen

der autotrophen Nitrifizierer handelte, oder ob Artefakte oder fehlerhafte Markierungen vorlagen. Im ersten Schritt wurden über eine Kanalauftrennung die Detektionskanäle für die Aufzeichnung der jeweiligen Emissionswellenlängen der Fluoreszenzsignale dargestellt (s. Abb. 3.61). Die Zellen der autotrophen Nitrifizierer wurden mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt, die eine unterschiedliche Emissionswellenlänge aufwiesen und somit durch die Auftrennung der Detektionskanäle sowohl getrennt voneinander als auch über das integrierte Gesamtbild in Kombination dargestellt werden konnten. Mit dem ersten Fluoreszenzfarbstoff, DAPI, wurden unspezifisch alle DNA-Moleküle angefärbt. Da Bakterienzellen DNA enthalten, konnten somit zunächst alle Bakterienzellen im Fichtennadelpräparat angefärbt werden (PORTER, 1980). Auch die pflanzliche DNA in den Zellkernen wurde angefärbt, konnte jedoch aufgrund der spezifischen Größenordnung von den Signalen der Bakterien-DNA deutlich unterschieden werden. Der zweite, spezifische Fluoreszenzfarbstoff wurde in Kombination mit der genspezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonde auf das Fichtennadelpräparat aufgebracht und konnte nur detektiert werden, wenn die für die autotrophen Nitrifizierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden an den entsprechenden Ribosomen-Molekülen in den Zellen der anwesenden autotrophen Nitrifizierer hybridisiert und gebunden werden konnten. Diese Fluoreszenzfarbstoffe besaßen eine andere Emissionswellenlänge als das DAPI (s. Tab. 2.7) und sind daher in anderen Detektionskanälen nachzuweisen. Durch die Kanalauftrennung konnte eine bereits erste Auswertung auf Anwesenheit der autotrophen Nitrifizierer erfolgen. Wie aus Abbildung 3.64 klar hervorgeht, liegen die Fluoreszenzsignale des DAPI's sowie die spezifischen Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonden für die autotrophen Nitrifizierer alle im Kreis an derselben Stelle im Präparat. Aufgrund der Größe der DAPI-Signale (vgl. Maßstab) kann man davon ausgehen, daß es sich dabei um Bakterienzellen handelt. Das gleichzeitige Auftreten der spezifischen Fluoreszenzsignale der Oligodesoxynukleotid-Sonden für die autotrophen Nitrifizierer an derselben Stelle zeigt klar und deutlich, daß es sich dabei um die Zellen autotropher Nitrifizierer handeln muß. Da beide spezifischen Fluoreszenzsignale im Rot- als auch Grün-Kanal zu erkennen sind, sind sowohl Ammoniak- als auch Nitrit-Oxidierer im Präparat vorhanden. Dieser Befund wird zusätzlich durch die Aufnahme des Profils und der Intensitätsstärke der Fluoreszenzsignale (s. Abb. 3.62) bestätigt. Dabei ist zu erkennen, daß die Intensitätskurven einen deutlichen Anstieg in dem Bereich des Präparates aufweisen, in dem die Profillinie durch die als Kolonie autotropher Nitrifizierer detektierten Struktur läuft. Der Vergleich der beiden Nachweise mit den entsprechenden Nachweisen aus den Validierungen (s. z.B. Abb. 3.31 und Abb. 3.44) bestätigt diesen Sachverhalt. Daß es sich dabei um autotrophe Nitrifizierer aus der Mitte des Präparates handelt, wird ersichtlich, wenn man das aus einem Bilderstapel von 50 Einzelbildern integrierte Gesamtbild in seine Einzelbilder auflöst und die Bilder wie in Abbildung 3.63 einzeln darstellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, daß die Fluoreszenzsignale der autotrophen Nitrifizierer erst in der Mitte, d. h. in Bild 24 beginnen und be-

reits in Bild 46 wieder enden. Somit kann eine Kontamination mit fremden Nitrifiziererzellen, die sich auf oder unter dem Präparat befinden, ausgeschlossen werden. Die Zellen der autotrophen Nitrifizierer befinden sich eindeutig mitten im Fichtennadelgewebe. Auch die Lage der Kolonie auf der Außenseite der Pflanzenzelle zeigt deutlich, daß die Bakterienkolonie dort angeheftet ist und nicht nachträglich in das Gewebe eingebracht worden ist. Um völlig auszuschließen, daß es sich bei den Fluoreszenzsignalen um Signale der Autofluoreszenz des Pflanzengewebes handelt, wurde durch das Einzelbild Nr. 25 ebenfalls eine Profillinie zur Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten gelegt. Die Intensitätskurven geben dabei dieselbe Verteilung wie bei den Intensitätskurven aus dem integrierten Gesamtbild wieder. Somit kann auch ausgeschlossen werden, daß die Fluoreszenzsignale durch die Autofluoreszenz des Pflanzengewebes durch die Bildintegration entstanden sind. Zusammenfassend kann man daher festhalten, daß es sich bei den in den Fichtennadel-Längsschnitten aufgefundenen Fluoreszenzsignalen eindeutig und ohne jeden Zweifel um die emittierten Fluoreszenzsignale der Farbstoffe handelt, die an die für die autotrophen Nitrifizierer spezifischen Oligodesoxynukleotid-Sonden gebunden sind. Über diese Sonden, die – entsprechend der Validierung - auch tatsächlich an die Ribosomen-Moleküle in den Zellen der autotrophen Nitrifizierer binden, sind die Zellen der autotrophen Nitrifizierer im Apoplasten der Fichtennadeln aus den Fichtennadelproben des Höglwaldes klar und deutlich lokalisiert worden. Diese spezifischen Fluoreszenzsignale und damit die autotrophen Nitrifizierer konnten in allen Fichtennadel-Proben des Höglwaldes bis auf die Proben des Frühjahres 2001 gefunden und detektiert werden. Trotz der zahlreichen untersuchten Fichtennadeln des Frühjahrs 2001 konnten keine autotrophen Nitrifizierer gefunden werden, was darauf schließen läßt, daß nicht in allen Fichtennadel-Proben die Zellen der autotrophen Nitrifizierer zu lokalisieren sind, wengleich sie über die MPN-Technik in Kombination mit der PCR-Technik aufgefunden werden können. Es scheint daher wichtig zu sein, aus welchen Kronenbereichen der Fichte man die Proben nimmt. Eine detailliertere Probenahme aus dem Kronenraum der Fichte war aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht möglich. Wie man ferner aus den repräsentativen Abbildungen 3.60 und 3.69 erkennen kann, liegen die Kolonien der autotrophen Nitrifizierer nicht nur mitten im Apoplasten, sondern konnten unter den Spaltöffnungen der Fichtennadeln lokalisiert werden, was dafür spricht, daß die autotrophen Nitrifizierer durch offene Spaltöffnungen, wie sie in Abb. 3.5 zu sehen sind, in den Nadelblatt-Apoplasten gelangen. In den Fichtennadel-Längsschnitten der Proben aus Villingen konnten bis zum Abschluß dieser Arbeit zu keinem Zeitpunkt entsprechende Fluoreszenzsignale, auch nicht ansatzweise, entdeckt werden. Der Versuch, die Fichtennadeln in Harz einzubetten und entsprechend zu präparieren, um durch den Harzverschluß der Zellzwischenräume evtl. Zellverlust an autotrophen Nitrifizierern zu verhindern, wurde nicht weiter verfolgt, da über diese Methode nur dünne, maximal bis zu 20 µm dicke Schnitte angefertigt werden konnten, die aus den oben genannten Gründen als zu dünn ange-

sehen wurden. In diesen Präparaten konnten, wie aus den Abbildungen 3.73 und 3.74 erkennbar ist, keine autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen werden.

### 4.2.3 Quantifizierung

Nach den sehr erfolgreich verlaufenen qualitativen Nachweisen der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichtennadeln aus dem Höglwald (s.o.) erfolgte die quantitative Auswertung der Nitrifizierer. Die quantitative Bestimmung der Bakteriendichte spielt in der umweltbezogenen Mikrobiologie eine wichtige Rolle (HERMANSSON & LINDGREN, 2001). Über die Quantifizierung werden Aussagen über die Entwicklung einer Bakterienpopulation getroffen, die Rückschlüsse darauf zulassen, welche Stoffwechselaktivität die Population aufweist, in welchen Konzentrationen Stoffwechselendprodukte freigesetzt werden, welchen Einfluß diese auf die Umwelt nehmen, ob damit die Bakterienpopulation eine wichtige Rolle in der Umwelt einnimmt und wie diese Population evtl. durch den Menschen beeinflusst wird (HUGHES et al., 2001). Da sich autotrophe Nitrifizierer aufgrund ihres Wachstums nur äußerst schwer auf Agar-Platten heranziehen lassen (WATSON et al., 1974), durch den Nadelaufschluß die Proben z.T. stark getrübt und ferner zahlreich Begleitorganismen vorhanden waren, bot sich zunächst eine Quantifizierung der Nitrifizierer über die MPN-Technik an (BAST, 1999). Die MPN-Technik ist eine seit langem etablierte gängige Methode zur Quantifizierung autotropher Nitrifizierer, so daß die Ergebnisse mit den bisherigen Ergebnissen weiterer Forschungsgruppen verglichen werden können (BOTH et al., 1990; PHILLIPS et al., 2000). Die Ergebnisse aus den MPN-Ansätzen sind aus 3.3.1 und 3.3.1.4 zu entnehmen. Einen Überblick gibt Tabelle 3.6. Dabei ist zu erkennen, daß bei den Proben des Höglwaldes aus dem unteren Kronenbereich (Herbst 2000 bis Herbst 2001) die Zellzahlen der Ammoniak-Oxidierer gleich denen der Nitrit-Oxidierer sind. Die Zellzahlen der jeweiligen Probenahmezeitpunkte zueinander unterscheiden sich dabei nicht signifikant. Die Zellzahlen bewegen sich zwischen  $8,28 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht (Frühling 2001) und  $1,19 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht (Herbst 2000). Dagegen setzen sich die Zellzahlen der Ammoniak-Oxidierer aus dem oberen Kronenbereich signifikant mit bis zu  $2,42 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht (Herbst 2002) von den Zahlen der Ammoniak-Oxidierer aus dem unteren Kronenbereich ab. Bei den Nitrit-Oxidierern aus dem oberen Kronenbereich ist ebenfalls eine deutliche Tendenz zur Zunahme zu erkennen, allerdings weisen sie nur eine Zellzahl von  $4,16 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht (Herbst 2002) auf. Diese Zellzahl unterscheidet sich zu den Zellzahlen der Nitrit-Oxidierer aus dem unteren Kronenbereich nicht signifikant. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß im oberen Kronenbereich die autotrophen Nitrifizierer im Gegensatz zum unteren Kronenbereich deutlich besser mit Substrat wie z.B. Ammoniak versorgt werden und somit die Ammoniak-Oxidierer deutlich stärker vertreten sind, während die Sub-

stratversorgung im unteren Kronenbereich nicht mehr optimal scheint und daher sich die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer auf ein Niveau von etwa  $1 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht einzupendeln scheinen. Zusätzlich wäre eine kontinuierliche Neuinokulation der im oberen Kronenraum siedelnden Nitrifizierer über Staubpartikel aus der Umgebungsluft durch den „Auskämmeffekt“ der Fichtennadeln gegeben, so daß Verluste der Nitrifizierer stetig ausgeglichen würden, während im unteren Kronenbereich dieser Ausgleich fehlt. In den Proben aus Villingen konnten zu keinem Zeitpunkt Ammoniak-Oxidierer nachgewiesen werden. Nitrit-Oxidierer wurden jedoch in Zellzahlen im unteren Kronenbereich von etwa  $9 \times 10^3$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht gefunden. Im oberen Kronenbereich (Jahr 2002) wurden mit etwa  $4 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht mehr, aber nicht signifikant mehr, Nitrit-Oxidierer registriert. Diese Zahlen aus den Villingen-Proben unterscheiden sich nicht von den Zellzahlen der Nitrit-Oxidierern aus dem Höglwald. Zu klären bleibt jedoch, ob es sich bei den Zellen aus Villingen tatsächlich um autotrophe Nitrit-Oxidierer handelt oder ob heterotrophe Nitrifizierer die MPN-Ergebnisse beeinflussen. Wie oben bereits erwähnt, liegt aufgrund des fehlenden genetischen Nachweises die Vermutung nahe, daß es sich tatsächlich um heterotrophe Nitrifizierer handelt. Während der Validierung der MPN-Technik (s. 3.2.1.4 und 3.2.2.2) wurde zugleich die Wiederfindung der eingesetzten Bakterienkonzentrationen überprüft. Der Vergleich der eingesetzten Bakterienkonzentration und der über die MPN-Technik wiedergefundenen Konzentration bei den Bakterienkulturen zeigte, daß die wiedergefundene Zellkonzentration im Durchschnitt wieder ermittelt werden konnten. Allerdings waren auch deutlich Abweichungen nach oben bzw. unten sowohl bei den Ammoniak- als auch den Nitrit-Oxidierern festzustellen. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß wegen der fehlenden Klärung des Einflusses der heterotrophen Nitrifizierern die ermittelten Zellzahlen sich möglicherweise als zu hoch herausstellen (BAST, 1999). Der Vergleich der erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen von PAPEN et al. (2002) zeigt, daß mit letztlich  $10^{5,9}$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelrockengewicht bei den Ammoniak-Oxidierern und  $10^6$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelrockengewicht bei den Nitrit-Oxidierern die Zellzahl bei PAPEN et al. (2002) höher liegen. Die Nadelproben stammten bei PAPEN et al. (2002) ebenfalls aus dem oberen Kronenraum der Fichten, so daß die höheren Zellzahlen durchaus den in dieser Arbeit ermittelten Zellzahlen aus der oberen Kronenraum entsprechen. Damit wird bestätigt, daß die autotrophen Nitrifizierer in der oberen Krone der Fichten stärker vertreten sind, als im unteren Kronenraum. Wenn man nun berücksichtigt, daß die Zahlen von PAPEN et al. (2002) auf das Nadelrockengewicht bezogen sind, während in dieser Arbeit auf das Nadelfrischgewicht abgestellt wird, sind die etwas höheren Zellzahlen bei PAPEN et al. (2002) ebenfalls zu erklären, da bei PAPEN et al. (2002) mehr Nadelmaterial eingesetzt worden ist. Somit ist deutlich zu erkennen, daß die Zellzahlen der autotrophen Nitrifizierer aus dieser Arbeit die Zellzahlen bei PAPEN et al. (2002) bestätigen. Allerdings muß bemerkt werden, daß auch bei PAPEN et al. (2002) der evtl. Einfluß heterotropher Nitrifizierer nicht berücksichtigt worden ist. Dies könnte u.a. auch erklären, warum

bei PAPEN et al. (2002) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit mehr Nitrit-Oxidierer ermittelt wurden. Auch die bei PAPEN et al. (2002) gezeigten Zellzahlen aus der MPN-Anwendung dürften daher zu hoch liegen. Um eine exakte Quantifizierung zu erreichen, wurde der Versuche unternommen, die Zellen der autotrophen Nitrifizierer über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit dem konfokalen Laserrastermikroskop quantitativ zu bestimmen. Entsprechende Quantifizierungen wurden bereits von CHRISTENSEN et al. (1999), BINNERUP et al. (2001) und HAUSNER & WUERTZ (1999) vorgenommen. Aus den unter 3.3.1.4 beschriebenen Gründen konnte jedoch in dieser Arbeit keine Quantifizierung durchgeführt werden. Neben einer nicht ausreichenden Vergrößerung, um die einzelnen Zellen deutlicher vergrößern zu können, lag das Hauptproblem in der Koloniebildung der autotrophen Nitrifizierer im Pflanzengewebe, die eine saubere und eindeutige Anfärbung über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nicht möglich machte. Neben einer Optimierung der Hybridisierungs-Technik für eine zweifelsfreie und perfekte Anwendung im Pflanzengewebe, speziell im Fichtennadel-Apoplasten, stellte besonders die Autofluoreszenz des Pflanzengewebes das entscheidende Hindernis für eine eindeutige Markierung und Auswertung mithilfe des konfokalen Laserrastermikroskops dar. Bisherige Quantifizierungen über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit dem konfokalen Laserrastermikroskop wurden entweder an aquatischen Biofilmen vorgenommen, bei denen sich das Problem der Autofluoreszenz nur äußerst gering zeigte (SCHRAMM et al., 1999; KUEHN et al., 1998), oder bei Bodenproben, wobei die Präparate z.T. sehr dünn waren, um sie entsprechend auswerten zu können (NUNAN et al., 2001). Diese Möglichkeit scheidet aus den bereits weiter oben diskutierten Gründen (s. 4.2.2) bei Pflanzenproben aus. Weitere Quantifizierungen wurden vorgenommen, nachdem die Bakterien mehr oder weniger aus den Proben entfernt und abfiltriert wurden (CHRISTENSEN et al., 1999; RAVENSCHLAG et al., 2001). Auch diese Möglichkeit schied aufgrund der präparativen Schwierigkeiten aus. Einen sehr interessanten Ansatz zur Lösung des Problems zeigen SHUXIAN LI et al. (1997) auf, die den mikrobiellen Bewuchs auf Apfelblättern untersuchten und quantifizierten. Über die aufgezeichneten Intensitätskurven, die in dieser Arbeit u.a. in Abbildung 3.62 und 3.64 zu sehen sind, legten SHUXIAN LI et al. (1997) eine Basislinie zwischen den allgemein niedrigen Fluoreszenz-Intensitäten und werteten nur die über diese Schwellen- oder Basislinie reichenden spezifischen Fluoreszenzsignale aus. Um diesen Ansatz jedoch auf die Anforderungen dieser Arbeit zu übertragen, müssen zuerst die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung für eine fehlerlose Anwendung im Nadelblatt-Apoplasten perfektioniert, die Autofluoreszenz des Nadelgewebes weiter reduziert und eine höhere optische Vergrößerung zum Erkennen der einzelnen Zellen installiert werden, was aus Zeitgründen innerhalb dieser Arbeit nicht mehr zu verwirklichen war. Dieser Ansatz dürfte in der Zukunft eine Quantifizierung im Pflanzengewebe ermöglichen. Ein weiterer sehr vielversprechender Ansatz ist die Quantifizierung der autotrophen Nitrifizierer auf genetischer Ebene mithilfe der neu entwickel-

ten „Real Time“-PCR-Technik, wie sie bereits von HERMANSSON & LINDGREN (2001) für die Ammoniak-Oxidierer durchgeführt worden ist.

## 4.3 Ökologische Betrachtungen

### 4.3.1 Auswirkungen unterschiedlicher Stickstoffbelastungen

Die Auswahl der beiden Standorte Höglwald und Villingen erfolgte auf der Grundlage der unterschiedlichen Stickstoffbelastung (s.o.). Bisher ist es noch völlig ungeklärt, ob es sich bei der Besiedlung des Fichtennadel-Apoplasten mit autotrophen Nitrifizierern um ein allgemeines, weit verbreitetes Phänomen handelt oder ob sich die Besiedlung an der Stickstoffbelastung der Standorte orientiert. Da Ammoniak das wichtigste Ausgangssubstrat ist (HYMAN & ARP, 1995; BRUNS et al., 1998), welches die Ammoniak-Oxidierer zu Nitrit verstoffwechseln und davon wiederum die Nitrit-Oxidierer abhängig sind, spielt besonders die Versorgung der autotrophen Nitrifizierer mit Ammoniak eine wichtige Rolle. Wie schon erwähnt, weist der Standort Höglwald aufgrund der intensiven Landwirtschaft in unmittelbarer Nähe eine kontinuierliche Ammoniak-Versorgung auf, die durch die Gülleausbringung erheblich gesteigert wird (HUBER, 1997). Eine Ammoniakversorgung über intensive Landwirtschaft ist am Standort Villingen nicht gegeben (FEGER, 1992). Aus den bisherigen Ergebnissen kann man deutlich entnehmen, daß die autotrophen Nitrifizierer im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich in den Proben des Höglwaldes zu finden waren. Über die MPN-Technik waren sowohl die Ammoniak- als auch die Nitrit-Oxidierer zu allen Probenahmezeitpunkte nachzuweisen (s. 3.3.1.1). Auch die Nachweise über die PCR-Technik (s. 3.3.1.2) und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (s. 3.3.1.3) wiesen bis auf wenige Ausnahmen in fast allen Probenahmezeitpunkten autotrophe Nitrifizierer auf. In den Fichtennadel-Proben aus Villingen hingegen waren bis zum Abschluß dieser Arbeit keine autotrophen Nitrifizierer nachzuweisen.

Dieser Befund in Kombination mit der Standortauswahl spricht dafür, daß die Stickstoffdeposition bei der Ansiedlung und der Etablierung der Bakterien im Nadelblatt-Apoplasten eine wichtige Rolle spielt. Am durch hohe atmogene Stickstoffeinträge gekennzeichneten Standort Höglwald sind die autotrophen Nitrifizierer nachzuweisen, am Standort Villingen, der sich durch eine Stickstofflimitierung auszeichnet, waren im Rahmen dieser Arbeit die Nitrifizierer nicht zu finden. Auch PAPEN et al. (2002) konnten in ihrer Untersuchung die autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes nachweisen. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß sich die Verbreitung der autotrophen Nitrifizierer in der Fichtenphyllosphäre an der Stickstoffbelastung der jeweiligen Waldgebiete orientiert. Desweiteren kann man daraus ableiten, daß es sich bei der Besiedlung der Fichtennadeln mit autotrophen Nitrifizierern um ein Phänomen handelt,

welches nicht nur auf einen Standort, sondern auf vielen Standorte einer dem Höglwald entsprechenden Stickstoffbelastung einhergehen könnte. Zur endgültigen Klärung dieser Fragestellung sollten weitere Untersuchungen an entsprechenden Standorten vorgenommen werden. Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der atmosphärischen Stickstoffbelastung und der Besiedlung mit autotrophen Nitrifizierern haben MANSCH et al. (1999) in ihrem Abschlußbericht „Schädigungsbeiträge auf und in Bauwerksgestein durch biogene Nitrit- und Nitratbelastung sowie nitritkatalysierte Sulfatbildung aufgrund von Umweltbelastung durch Emission und Immission von Schwefel- und speziell Stickstoffverbindungen“ aufgezeigt. Durch die Deposition von Gebäuden mit Stickstoffverbindungen wird auch in diesem Fall die Besiedlung der Gebäudeoberflächen mit Nitrifizierern klar gefördert. Ferner sind, wie unter 4.1 gezeigt, auch offene Spaltöffnungen in den Nadelblättern vom Standort Höglwald eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Ansiedlung der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten. Die Besiedlung hängt somit von zwei entscheidenden Faktoren ab. Zum einen müssen die Spaltöffnungen offen exponiert sein, damit die Bakterien in den Apoplasten gelangen können. Erst nachdem diese Besiedlung erfolgt ist, kommt die Stickstoffversorgung in Form von gasförmigem oder im Feuchtfilm gelösten Ammoniak aus der Umwelt als Substrat für den Energiestoffwechsel zum Tragen. Ein Vergleich mit den Bedingungen am Standort Villingen zeigt deutlich, daß hier weder die Spaltöffnungen offen exponiert waren, noch daß eine für eine weitere Etablierung ausreichende Stickstoffversorgung in Form von Gas oder als Flüssigkeit in Frage kamen. Damit kann man festhalten, daß die Stickstoffversorgung über die Atmosphäre eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten zu sein scheint.

### 4.3.2 Saisonale Entwicklung

Zur Ermittlung der saisonalen Schwankungen war es neben dem Nachweis der autotrophen Nitrifizierer zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten notwendig, die Zellzahlen zu ermitteln, um die Populationsdichte und die Entwicklung der Populationen über den Sommer bzw. Winter hinweg zu beobachten (HERMANSSON & LINDGREN, 2001). Insbesondere im Zusammenhang mit Umweltveränderungen ist eine Entwicklung der Populationen von besonderem Interesse, da dies Auswirkungen z.B. auf die Spurengasfreisetzung haben könnte (HUGHES et al., 2001). Daneben läßt sich auch klären, ob es sich bei der Besiedlung der Fichtennadeln um ein kurzzeitiges Phänomen oder um eine längerwährende Ansiedlung über z.T. mehrere Jahre hinweg handelt. Die autotrophen Nitrifizierer konnten nur am Standort Höglwald eindeutig nachgewiesen werden (s.o.). Von Herbst 2000 bis Herbst 2002 konnten die Nitrifizierer dabei über die MPN-Technik in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes zu allen 5 Probenahmezeitpunkten lückenlos nachgewiesen werden. Nicht ganz so lückenlos, aber ebenso erfolgreich



verlief auch der Nachweis über die PCR-Technik aus den Fichtennadel-Proben. In der Fichtennadel-Probe aus dem Herbst 2001 konnten über die PCR-Technik keine Ammoniak-Oxidierer entdeckt werden. Da jedoch gleichzeitig der MPN-Nachweis sowie die PCR-Kontrolle der MPN-Kulturröhrchen auf die Anwesenheit von Ammoniak-Oxidierern positiv waren, wurde davon ausgegangen, daß bei dem direkten PCR-Nachweis Fichtennadelmaterial verwendet wurden, in welchem zu geringe Zellzahlen der Ammoniak-Oxidierer enthalten waren. Ein ähnlicher Befund war auch über den mikroskopischen Nachweis anhand der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu registrieren. In diesem Fall konnten in der Nadelprobe des Frühlings 2001 keine Nitrifizierer entdeckt werden. Dieses Erscheinungsbild läßt darauf schließen, daß die autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben aus dem Höglwald zu allen Probenahmezeitpunkten nachzuweisen sind, jedoch hängt es sehr von der Nachweis-Technik ab, ob auch wirklich die Nitrifizierer aufzufinden sind. Je feiner und detaillierter die Nachweis-Technik wird, desto wichtiger wird die richtige Auswahl des Probenmaterials. Bei der Betrachtung der Zellzahlen, die über die MPN-Technik ermittelt wurden (s.o.), ist deutlich zu erkennen, daß sich die Zellzahlen im Bereich von etwa  $1 \times 10^4$  Zellen  $g^{-1}$  Nadelfrischgewicht im unteren Kronenbereich einpendeln. Eine signifikante saisonale Schwankung konnte nicht festgestellt werden. Auch bei den Zellzahlen aus dem oberen Kronenbereich der Fichten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Probe aus dem Frühjahr und dem Herbst zu erkennen. Bei der Ansiedlung im Nadelblatt-Apoplasten handelt es damit nicht um ein kurzzeitiges Phänomen, sondern um eine stabile Population.

#### **4.4 Erste Anhaltspunkte zum Besiedlungsvorgang des Fichtennadel-Apoplasten**

Um unter kontrollierten Laborbedingungen Versuche wie z.B. Gaswechsellmessungen mit den im Nadelblatt-Apoplasten lebenden autotrophen Nitrifizierern vornehmen zu können, wurde versucht, eine künstliche Besiedlung des Nadelblatt-Apoplasten von Jungfichten mit autotrophen Nitrifizierern zu etablieren. Daneben bestand die Vermutung, daß autotrophe Nitrifizierer während des Keimens von Fichtensamen aus dem Bodenbereich in die ersten Fichtennadeln gelangen, da Nitrifizierer besonders oft im Boden anzutreffen sind (WATSON et al., 1989). Um klare Ergebnisse zu erhalten und eindeutige Aussagen treffen zu können, sollte durch eine sterile Anzucht der benötigten Fichtenkeimlinge (s. 2.2) sichergestellt werden, daß die Fichten ausschließlich mit den für die Inokulation verwendeten autotrophen Nitrifizierer (s. 2.6.7) infiziert wurden. Zunächst wurden die steril angezogenen Fichtenkeimlinge mit Hilfe der MPN-Technik in Kombination mit der PCR-Technik auf das Nichtvorhandensein von autotrophen Nitrifizierer überprüft. Wie aus den Ergebnissen (s. 3.3.2.1) zu entnehmen ist, waren wie erwartet keine Am-

moniak-Oxidierer in den MPN-Ansätzen und auch nicht über die PCR-Technik nachzuweisen (s. Abb. 3.75 und 3.76). Nitrit-Oxidierer waren dagegen über ihr Stoffwechselendprodukt Nitrat in allen MPN-Ansätzen (s. Abb. 3.75 a und 3.76 a) überraschend zu finden. In der sich anschließenden Kontrolle der MPN-Ansätze über die PCR-Technik konnte nur im ersten MPN-Ansatz der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlinge im Agarose-Gel eine DNA-Bande des PCR-Amplifikates des 16S rRNA-Gens der Nitrit-Oxidierer in der richtigen Größe entdeckt werden (s. Abb. 3.76 b, Pfeil). Diese Bande bewies eindeutig die Anwesenheit von autotrophen Nitrit-Oxidierern im ersten MPN-Ansatz der mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlingen, d.h. es lag in diesem Ansatz eine klare Kontamination mit Nitrit-Oxidierern vor. In allen anderen MPN-Proben konnten über die PCR-Technik keine Nitrit-Oxidierer entdeckt werden. Zudem wurde beobachtet, daß in den MPN-Röhrchen im Verlauf der Kultivierung ein Pilzbewuchs auftrat. Daher stellte sich die Frage, woher das Nitrat in den übrigen MPN-Ansätzen stammte. Da die Zellen der Nitrit-Oxidierer molekularbiologisch nicht direkt nachgewiesen werden konnten, kam die Vermutung auf, daß das nachgewiesene Nitrat von den Pilzkontaminanten, die in allen MPN-Ansätzen z.T. bereits nach 1 - 2 Tagen zu finden waren, produziert worden sein konnte. Wie WRAGE et al. (2001) berichteten, besitzen Pilze die Möglichkeit im Rahmen der heterotrophen Nitrifikation Nitrat zu bilden. Da die MPN-Ansätze im Labor unter sterilen Bedingungen hergestellt wurden, ist anzunehmen, daß sich Pilzsporen aus der Klimakammer auf den Fichtenkeimlingen festsetzten, die sich anschließend in den MPN-Ansätzen weiter entwickeln konnten. Die Tatsache, daß in nur einem Ansatz die autotrophen Nitrit-Oxidierer molekularbiologisch nachzuweisen waren, in alle anderen MPN-Ansätze der Negativkontrolle dagegen nicht, läßt darauf schließen, daß entweder bei der Probenahme der Fichtennadeln oder beim Herstellen des MPN-Ansatzes eine singuläre Kontamination stattgefunden hat. Daher wurde davon ausgegangen, daß die Fichtenkeimlinge frei von autotrophen Nitrifizierer herangezogen wurden. Diese Tatsache wurde durch die mikroskopischen Untersuchungen der Fichtennadeln über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung unterstützt. Auch über diese Nachweisteknik waren keine autotrophen Nitrifizierer, weder im Nadelblatt-Apoplasten (s. Abb. 3.83) noch auf der Nadelblatt-Oberfläche (s. Abb. 3.87 a) zu entdecken. Um weitere Kontaminationen auszuschließen, wurde bei der weiteren Versuchsplanung verstärkt auf Sterilität geachtet. Im Anschluß an diese Validierung wurde im Jahr 2000 die erste Versuchsreihe gestartet (s. 2.6.7), in der die Keimlinge mit der Nitrifizierermischkultur des Höglwaldes inokuliert wurden (s. 2.6.1). Diese Bakterienkultur wurde verwendet, um so naturnah wie möglich unter kontrollierten Laborbedingungen arbeiten zu können. Die Fichtenkeimlinge wurden einmalig zu Beginn mit den autotrophen Nitrifizierer inokuliert, da die Fichtensamen nur anfangs bei ihrer Keimung mit dem Erdboden in Kontakt kamen. Die Ergebnisse der MPN-Ansätze zeigten, daß Ammoniak-Oxidierer zu keiner Zeit weder in den mit Ammoniak begasten noch in den unbegasten Fichtennadelproben nachzuweisen waren (s. 3.3.2.1). Der molekularbiologische Nachweis über die PCR-Technik verlief ebenfalls

negativ. Hingegen waren die Nitrit-Oxidierer nach allen Probenahmen anhand der MPN-Technik in allen Proben nachzuweisen. Der direkte Nachweis der Nitrit-Oxidierer über die PCR-Technik gelang nur nach der ersten Probenahme (s. Abb. 3.78 b), die unmittelbar nach der Inokulation genommen wurde. In den Fichtennadelproben, die zu späteren Zeitpunkten genommen wurden, konnten über die PCR-Technik keine Nitrit-Oxidierer mehr aufgefunden werden. Wie bei der Negativkontrolle (s.o.) waren auch in diesen MPN-Ansätzen Pilze in den Röhren zu beobachten. Bei Vergleich der Ergebnisse der MPN-Ansätze aus der Validierung mit den Ergebnissen der MPN-Ansätze der Versuchsreihe des Jahres 2000 sind die positiven Signale der Nitrit-Oxidierer mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das durch die Pilze über eine heterotrophe Nitrifikation gebildete Nitrat zurückzuführen. Nur der direkte genetische Nachweis über die PCR-Technik aus dem MPN-Ansatz der ersten Probenahme unmittelbar nach der Inokulation zeigt zweifelsfrei, daß autotrophe Nitrit-Oxidierer tatsächlich in den Fichtennadel-Proben vorhanden waren. Die einmalige Inokulation zu Beginn war, auch wenn die Ammoniak-Oxidierer nicht nachgewiesen werden konnten, eindeutig erfolgreich. Daß die Nitrifizierer im weiteren Versuchsablauf nicht mehr nachzuweisen waren, deutet darauf hin, daß sich die Bakterien nicht in der Phyllosphäre etablieren konnten. Der mikroskopische Nachweis verlief in allen Fichtennadelproben sowohl im Apoplasten als auch auf der Nadelblatt-Oberfläche negativ (s. Abb. 3.84, s. Abb. 3.87 b). Zum Zeitpunkt der Inokulation hatten die Fichtenkeimlingen nur die Keimnadeln ausgebildet (NAPP-ZINN, 1966). Aufgrund dieser wenigen Nadeln bestand die Vermutung, daß der Hauptteil der Bakterien während des Inokulationsvorganges durch das Besprühen kaum haften blieb, besonders da die Nadelblatt-Oberfläche kaum Stellen für eine erfolgreich Anheftung wie z.B. Blattadern o. dgl. besaßen und mit einer Wachsschicht bedeckt waren, die eine Anheftung zudem erschweren mußte (FINK, 1996). Im weiteren Wachstumsverlauf nach der Inokulation bildeten die Keimlinge ihre ersten Triebe und es war zu erwarten, daß die Bakterien nicht in den neu gebildeten Fichtennadeln zu finden waren. Zudem waren die Bakterien, die sich zunächst auf der Nadelblattoberfläche befanden, einem in der Klimakammer simulierten Langtag mit einer Lichteinwirkung von 16 h ausgesetzt (s. 2.2). Da die Nitrifizierer lichtempfindlich sind (BOCK, 1965), bestand die Möglichkeit, daß die Bakterien durch die Lichteinwirkung über einen längeren Zeitraum von 2 - 4 Tagen abgetötet wurden. Die Nitrifizierermischkultur zeigte im Gegensatz zu den Bakterienreinkulturen ein deutlich verzögertes Wachstum, d.h. die Nitrifizierer wiesen eine bis zu 6 Wochen längere lag-Phase auf, als die Reinkulturen. Die Gattung *Nitrosospira*, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Nitrifizierermischkultur vorliegt (s. 3.2.1.3), weist im Vergleich zur Gattung *Nitrosomonas* aus der Reinkultur ein verlangsamtes Wachstum auf (BELSER, 1979). Dies konnte ein weiterer Grund dafür sein, daß die Bakterien, selbst wenn sie sich erfolgreich auf den Nadelblättern festsetzen konnten, in den MPN-Ansätzen aufgrund des verlangsamten Wachstums nur schwer nachweisen lassen. In der Mischkultur der Nitrifizierer waren weitere heterotrophe Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien vorhanden, die durchaus

das Wachstum der Nitrifizierer in den MPN-Ansätzen negativ beeinflussen konnten. Die unterschiedliche Begasung der Fichtenkeimlinge mit Ammoniak spielte keine Rolle. Da die einmalige Inokulation der Fichtenkeimlinge mit der Nitrifizierermischkultur aus dem Höglwald nicht erfolgreich war und sich die Bakterien nicht im Nadelblatt-Apoplasten etablieren ließen, wurde im Jahr 2001 eine weitere Versuchsreihe gestartet. Die Fichtenkeimlinge wurden nun mit der Bakterienreinkultur von *N. europaea* inokuliert. Das hatte zum einen den Vorteil, daß alle unerwünschten Begleitmikroorganismen, die in der Versuchsreihe 2000 noch die MPN-Ansätze negativ beeinflussten, wie z.B. durch den Pilzbewuchs der MPN-Röhrchen, von vornherein ausgeschlossen wurden. Ferner zeigte die Laborkultur von *N. europaea* mit einer lag-Phase von etwa 1 bis 2 Tagen ein deutlich schnelleres und stärkeres Wachstum als die Nitrifizierermischkultur. Die verstärkte Produktion des Stoffwechselendproduktes Nitrit führte zu einem leichteren und eindeutigen Nachweis der Ammoniak-Oxidierer über die MPN-Technik. *N. europaea* ist auf das Substrat Ammoniak spezialisiert (HYMAN & ARP, 1995), wodurch herausgefunden werden sollte, ob sich die Begasung der Fichtenkeimling auf das Wachstum und die Etablierung der Bakterien auswirken würde. Um eine erfolgreiche Ansiedlung auf den Fichtenkeimlingen zu erreichen, wurden diese zweimal mit *N. europaea* inokuliert. Die erste Inokulation der Fichtenkeimlinge verlief erfolglos, denn über die MPN-Technik und die PCR-Technik waren keine Zellen von *N. europaea* nachzuweisen. Dies läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückführen, daß die Keimlinge mit dem ersten Kranz der Keimnadeln noch zuwenig Anhaftfläche boten, an denen sich die Bakterien festsetzen konnten (NAPP-ZINN, 1966). Zudem perlte die Inokulationsflüssigkeit mit den Bakterien an der Wachsschicht der Keimnadeln ab (FINK, 1996). Nach 2 Monaten Inkubation wurden die Keimlinge im Alter von 4 Monaten erneut mit *N. europaea* inokuliert. Die Keimlinge hatten einen ersten Längentrieb in die Höhe und teilweise in Ansätzen die ersten Seitentriebe. Es stand nun eine größere Nadelfläche für eine Anhaftung der Bakterien zur Verfügung als bei der ersten Inokulation. Anhand der MPN-Technik konnten sowohl in der unbegasten als auch in der mit Ammoniak begasten zweiten Probenahme des Jahres 2001 Ammoniak-Oxidierer über die Nitrit-Produktion nachgewiesen werden (s. Abb. 3.80 a und 3.81 a). Auch der molekularbiologische Nachweis über die PCR-Technik verlief bei den begasten Fichtenkeimlingen positiv (s. Abb. 3.80 b, Pfeile). Nach der dritten Probenahme im Jahr 2001 wurde *N. europaea* bei den unbegasten Fichtenkeimlingen über die MPN-Technik nachgewiesen (s. Abb. 3.82 a). *N. europaea* konnte sich demzufolge über zwei Monate hinweg in der Phyllosphäre der Fichtenkeimlinge behaupten und bei günstigen Wachstumsbedingungen, wie sie durch das Medium in den MPN-Röhrchen gegeben waren, zu einer Kultur heranwachsen. Daß *N. europaea* in den ohne Ammoniak begasten Fichtenadelproben gefunden wurde, läßt vermuten, daß eine Versorgung mit Ammoniak nicht von primärer Bedeutung für die Ansiedlung ist, besonders da die Bakterien in den mit Ammoniak begasten Fichtenkeimlingen nicht registriert werden konnten. Daher scheinen weitere Faktoren

für eine Besiedlung der Phyllosphäre eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Verpilzung der MPN-Röhrchen in der Versuchsreihe 2001 konnte nicht festgestellt werden. Bemerkenswert ist, daß in den MPN-Ansätzen kein Nitrat gefunden werden konnte. Dies läßt darauf schließen, daß die Fichtenkeimlinge tatsächlich steril aufgezogen wurden und die Nitrat-Produktion aus den vorherigen Versuchsreihen eindeutig auf die Begleitflora in den MPN-Röhrchen zurückzuführen ist. Der Nachweis von *N. europaea* über das konfokale Laserrastermikroskop verlief negativ. Die Bakterienzellen konnten weder in noch auf den Nadelblättern gefunden werden (s. Abb. 3.85, 3.86; 3.87 c).

Aus dem Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchsreihen 2000 und 2001 läßt sich ablesen, daß die Besiedlung der Phyllosphäre mit hoher Wahrscheinlichkeit kein einmaliges Inokulationsereignis ist, sondern wiederholt stattfinden muß, damit sich die Bakterienzellen etablieren können. Die noch intakte Wachsschicht auf der Epidermis der Fichtennadelblätter und die mit Wachskappen verschlossenen Stomata (s. Abb. 3.6 und 3.7) bewirken, daß die Bakterien kaum geeignete Stellen für eine Anheftung finden. Ferner spielt auch die Anzahl und Dichte der Keimnadeln der Fichtenkeimlinge eine wichtige Rolle bei der Anheftung der Bakterien. Erst die Inokulation von Bakterienzellen auf Fichtenkeimlinge mit ausgebildeten ersten Trieben, und damit einer größeren Nadelblattfläche, machte es möglich, daß sich die Bakterienzellen in der Phyllosphäre festsetzen konnten. Einen interessanten Zusammenhang zwischen dem Alter von Nadelblättern und die abweichenden Winkel von Flüssigkeitstropfen im Zusammenhang mit einer epiphytischen Flora und damit die Beeinflussung der Verweildauer von Flüssigkeitstropfen auf Nadelblätter stellt SCHREIBER (1996) in einer Untersuchung dar. Die Versorgung mit Ammoniak scheint bei der erstmalige Besiedlung und Etablierung der Bakterien auf den Fichtennadeln zunächst keine entscheidende Rolle zu spielen. Erst nach der Festsetzung der Bakterien in der Phyllosphäre, konnten die Nitrifizierer dazu übergehen, Ammoniak als Substrat zu verstoffwechseln. Inwieweit die heterotrophe Begleitflora aus der Nitrifizierermischkultur im Jahr 2000 eine Ansiedlung der autotrophen Nitrifizierer beeinflusste, konnte nicht weiter untersucht werden, doch wirkt sich diese Begleitflora deutlich auf die Auswertung der MPN-Ergebnisse aus. Die mikroskopischen Untersuchungen des Nadelblatt-Apoplasten verliefen bei den Fichtenkeimlingen erwartungsgemäß negativ, da die Stomata mit Wachskappen verschlossen waren und daher nicht damit zu rechnen war, daß die Nitrifizierer in den Apoplasten gelangten. Die in der Abbildung 3.87 zu erkennenden, offenen Stomata sind auf die Präparations- und Schnitt-Technik zurückzuführen, bei der die Wachskappen aus den Spaltöffnungen entfernt wurden. Die mikroskopische Untersuchung der Nadelblatt-Oberflächen brachte aufgrund der intakten Wachsschicht auf der Epidermis der Fichtennadeln der Keimlinge ebenfalls kein positives Ergebnis. Abschließend kann man festhalten, daß eine Infektion der Fichten-Phyllosphäre nicht über die Keimung der Fichtensamen und den einmaligen Kontakt mit den Nitrifizierer aus dem Boden zu erfolgen scheint, zumal an beiden Versuchsstandorten im Boden keine autotrophen Nitrifizierer nachzu-

weisen waren (s. 2.1). Auch die Tatsache, daß die Nitrifizierer über Jahrzehnte hinweg von der Keimung bis in die Fichtenkrone von Altfichten in den Fichtennadeln überdauern, scheint äußerst unwahrscheinlich, da die Nitrifizierer aufgrund des Nadelverlustes den Fichtennadel-Apoplasten verlassen und in den Apoplasten von neuen Fichtennadeln einwandern müßten. Die Nitrifizierer müßten einen Lebensraum verlassen, der ihnen optimale Überlebensbedingungen mit ausreichender Substratversorgung und geschützter Lage bietet. Daher scheint die Hypothese, daß die Nitrifizierer über die Fichtenkeimung im Laufe der Jahrzehnte in den Kronenraum der Altfichten gelangen, als äußerst fragwürdig und unwahrscheinlich. Dies sollte jedoch durch weitere Untersuchungen genau abgeklärt werden. Trotzdem bleibt immer noch die Frage zu klären, wie die Nitrifizierer in den Kronenraum der Fichte gelangen können. Vieles scheint darauf hinzudeuten, daß die Bakterien durch Anheftung an Staubpartikel (UNDERHILL & PROSSER, 1987), wie sie bei trockenem Wetter von brachliegenden Feldern, besonders im Frühjahr durch den Wind aufgewirbelt werden, in den Kronenraum der Fichten verfrachtet werden und durch die kammartige Struktur der Fichtenphyllosphäre (PFAUCH, 1963) dort „ausgekämmt“ werden, wie die mikroskopischen Aufnahmen der Fichtennadeln aus dem Höglwald (s. Abb. 3.4) zeigen. Die an den Staubpartikeln anhaftenden Nitrifizierer könnten dann bei feuchter Witterung und einem entsprechenden Feuchtfilm durch aktive Fortbewegung mithilfe ihrer Geißeln sich auf der Blattoberfläche verteilen (WATSON et al., 1989). Sollten dann die Stomata von den Wachskappen befreit sein, besteht die Möglichkeit, daß die Bakterien durch die Öffnungen in den Apoplasten gelangen könnten. Aufgrund der optimalen Lebensbedingungen haben die Nitrifizierer im Apoplasten bessere Überlebenschancen (s. 1.3), während die Nitrifizierer auf der Blattoberfläche durch Trockenheit, Licht oder andere Umwelteinflüsse früher oder später absterben.

### 4.5 Ausblick

Mit dem Nachweis und der exakten Lokalisation der autotrophen Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten der Fichte in dieser Arbeit wurde dem großen Forschungsgebiet „Wechselwirkung Pflanze – Mikroorganismen“ (DOMMERGUES, 1977; KINKEL, 1997; HIRANO & UPPER, 2000) ein weiterer neuer Mosaikstein hinzugefügt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden eine Ausgangsplattform für zahlreiche weiterführende Untersuchungen.

Die Sequenzierungen bilden den Ausgangspunkt, um die Artzugehörigkeit der Nitrifizierer im Nadelblatt-Apoplasten aufzuklären und damit einen Beitrag im Rahmen der Biodiversitätsforschung zu leisten. Die exakte Bestimmung der Art stellt einen direkten Bezug zu bisherigen Forschungsergebnissen her. Zugleich wird die Zuordnung von Gensequenzen möglich, welche die Grundlage für eine exakte Quantifizierung auf genetischer Ebene mit der neu entwickelten „Real

Time“-PCR-Technik bilden. Gleichzeitig kann mit dieser modernen PCR-Technik eine eindeutige Trennung der autotrophen von den heterotrophen Nitrifizierer im Vergleich zur klassischen MPN-Technik erfolgen, was zur Präzisierung der Zellzahlen im Apoplasten beiträgt. Damit werden klare Aussagen über die Anzahl der Nitrifizierer und ihre Rolle in der Umwelt möglich. Zudem besteht Klärungsbedarf über den Einfluß der heterotrophen Nitrifizierer in der Phyllosphäre und ihre Auswirkungen auf die Umwelt. Die Inokulationsversuche der Fichtenkeimlinge zeigten, daß eine Besiedlung der Fichten über die Keimung aus dem Boden heraus unwahrscheinlich ist. Zur Aufklärung des Besiedlungsvorganges und zur Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Ausdehnung der Besiedlung sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Der Nachweis der autotrophen Nitrifizierer in der Phyllosphäre der Fichte wirft die Frage auf, ob diese Bakterien in anderen immergrünen Gewächsen aufzufinden sind, so daß zusätzliche Untersuchungen nicht nur an Fichtenstandorte, sondern auch auf Standorte mit immergrünen Gewächsen nötig sind. Ein wichtiger Aspekt ist die Versorgung der autotrophen Nitrifizierer mit Stickstoff aus der Umwelt, besonders aus anthropogenen Quellen wie z.B. Landwirtschaft oder Verkehr. Das Auftreten, die Besiedlungsdauer und das Absterben der Nitrifiziererpopulationen in entsprechenden Gebieten ist noch gänzlich ungeklärt. Neben der Berücksichtigung des bisher noch völlig unbekanntem Lebensraum der autotrophen Nitrifizierer bei der Spurengasbildung drängt sich die Frage auf, in welchem Umfang und unter welchen Bedingungen die Nitrifizierer in den Nadeln Spurengase an die Atmosphäre abgeben. Dies sollte bei Prognosen zur Klimaveränderung in der Klimamodellierung zusätzlich berücksichtigt werden und somit zu einer Neubewertung der forstlichen Waldbaumaßnahmen führen. Unter Beachtung der Stickstoffbelastung der Umwelt sind die Wechselwirkungen der Stoffwechselprodukte der autotrophen Nitrifizierer mit dem Pflanzengewebe ein Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen, besonders zur Klärung, inwieweit die gebildeten Säuren an der Schädigung des Nadelgewebes beteiligt sind oder ob und wie sich die Anwesenheit der Nitrifizierer im Apoplasten auf die Stickstoffversorgung der Fichten auswirken würde.

## 5 Zusammenfassung

1. Ein Vergleich der Fichtennadeln vom Standort Höglwald mit den Nadeln vom Standort Villingen ergab, daß die Fichtennadeln aus dem Höglwald deutlich mit einem dicken Belag an Staubpartikeln und einem Aufwuchs von Pilzen und Bakterien überzogen waren. Darüberhinaus besaßen diese Fichtennadeln klar erkennbare offene Spaltöffnungen ohne Wachskappen.
2. Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer wurden über die MPN-Technik in Fichtennadelproben des durch hohe atmogene Stickstoffeinträge belasteten Standortes Höglwald indirekt nachgewiesen. In den Nadelproben des stickstofflimitierten Standortes Villingen konnten keine Ammoniak-Oxidierer entdeckt werden. Die beobachteten Nachweissignale der Nitrit-Oxidierer in den Nadelproben vom Standort Villingen waren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf heterotrophe Nitrifizierer zurückzuführen, da autotrophe Nitrit-Oxidierer mit Hilfe der PCR-Kontrolle nicht auf genetischer Ebene nachgewiesen werden konnten.
3. Ein völlig neues Oligodesoxynukleotid-Paar Nw f und Nw r für den eindeutigen Nachweis von *Nitrobacter*-Zellen über das Gen des 16S rRNA-Moleküls mit Hilfe der molekularbiologische PCR-Technik konnte anhand von Gensequenzvergleichen ermittelt und erstmalig erfolgreich in der PCR-Technik etabliert werden.
4. Durch die Bestimmung der 16S rRNA-DNA-Sequenzen über die PCR-Technik in Kombination mit der Sequenzierung konnten zum ersten Mal die autotrophen Nitrifizierer aus der organischen Auflage vom Standort Höglwald phylogenetisch eingeordnet werden. Die Ammoniak-Oxidierer konnten der Gattung *Nitrosospira*, die Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* zugeordnet werden.
5. Durch den direkten genetischen Nachweis über die PCR-Technik konnte erstmalig gezeigt werden, daß die autotrophen Nitrifizierer im Fichtennadelmaterial vom Standort Höglwald aufzuspüren sind. Im Fichtennadelmaterial vom Standort Villingen waren keine autotrophen Nitrifizierer zu entdecken. Durch die Sequenzierung der PCR-Amplifikate konnten die Ammoniak-Oxidierern mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit der Gattung *Nitrosospira*, die Nitrit-Oxidierern der Gattung *Nitrobacter* zugeordnet werden.
6. Durch die Anwendung der molekularbiologischen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Kombination mit der Auswertung über das konfokale Laserrastermikroskop konnte weltweit erstmalig und eindeutig bewiesen werden, daß die autotrophen Nitrifizierer **im** Fichtennadel-



Apoplasten der Nadelproben vom Standort Höglwald vorkommen. Die autotrophen Nitrifizierer sind im substomatären Hohlraum zu finden. Die Bakterien sitzen als Kolonien an der Zellwandaußenseite der Pflanzenzellen auf. Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer sind vergesellschaftet. In den Fichtennadel-Proben vom Standort Villingen konnten keine autotrophen Nitrifizierer nachgewiesen werden.

7. Die Quantifizierung über die MPN-Technik ergab, daß die autotrophen Nitrifizierer aus dem unteren Kronenbereich in einer durchschnittlichen Zellzahl von ca.  $1 \times 10^4$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht vorkommen. Im oberen Kronenbereich sind die Ammoniak-Oxidierer mit ca.  $2 \times 10^5$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Nadelfrischgewicht anzutreffen und unterscheiden sich signifikant von der Zellzahl der Ammoniak-Oxidierer aus dem unteren Kronenbereich.
8. Aus der Tatsache, daß die autotrophen Nitrifizierer in den Fichtennadel-Proben des Höglwaldes, nicht jedoch in den Proben des Standortes Villingen gefunden werden konnten, kann gefolgert werden, daß autotrophe Nitrifizierer mit hoher Wahrscheinlichkeit im Kronenraum an solchen Standorten anzutreffen sind, die einer übermäßigen atmosphärischen Stickstoffbelastung ausgesetzt sind.
9. Die autotrophen Nitrifizierer wurden in den Fichtennadel-Proben vom Standort Höglwald sowohl im Frühjahr als auch im Herbst nachgewiesen. Die autotrophen Nitrifizierer, deren Zellzahlen sich im Jahresverlauf nicht signifikant verändern, bilden eine stabile Population in den Fichtennadeln.
10. Aus den Inokulationsversuchen mit den unter Laborbedingungen steril herangezogenen Fichtenkeimlingen geht klar hervor, daß eine einmalige Inokulation der Fichtenkeimlinge nicht zu einer Etablierung der autotrophen Nitrifizierer in der Fichtenphyllosphäre führt. Damit wird eine Besiedlung der Fichtenphyllosphäre während der Keimung durch einen einmaligen unmittelbaren Bodenkontakt ausgeschlossen. Die wiederholte Inokulation mit autotrophen Nitrifizierern zeigt hingegen deutlich, daß die Fichtenphyllosphäre für eine dauerhafte Besiedlung wiederholt mit autotrophen Nitrifizierern inokuliert werden muß. Dies führte zur Hypothese, daß eine fortwährende Inokulation der Fichtenkrone über Staubpartikel, an denen die autotrophen Nitrifizierer anhaften, eine mögliche Ursache für das Vorkommen der Bakterien in der Fichtenphyllosphäre sein könnte.

## 6 Literatur

- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. (1990a): Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, 172: 762 – 770.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990b): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56: 1919 – 1925.
- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995): Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59: 143 - 169.
- Amann, R., Ludwig, W. (2000): Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 555 - 565.
- Alef, A. (1991): Bestimmung der wahrscheinlichsten Zahl (MPN). In: Alef, K. (Hrsg.): *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie – Aktivitäten / Biomasse / Differenzierung*. eco-med verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/Lech, 44 – 59.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403 – 410.
- Asman, W. A. H., Sutton, M. A., Schjoerring, J. K. (1998): Ammonia: emission, atmospheric transport and deposition. *New Phytol*, 139: 27 – 48.
- Aßmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J. R., Hartmann, A. (1995): *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1013 – 1019.
- Aßmus, B., Schloter, M., Kirchhof, G., Hutzler, P., Hartmann, A. (1997): Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbial Ecol*, 33: 32 - 40.
- Atlas, R. M., Parks, L. C. (Hrsg.) (1993): *Handbook of microbiological media*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.

- Bååth, E., Olsson, S., Tunlid, A. (1988): Growth of bacteria in the rhizoplane and the rhizosphere of rape seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*, 53: 355 – 360.
- Barthlott, W., Neinhuis, C. (1997): Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*, 202: 1 – 8.
- Bast, E. (1999): *Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 339 – 344.
- Belser, L. W. (1979): Population ecology of autotrophic nitrifying bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 33: 309 – 333.
- Belser, L. W., Schmidt, E. L. (1978): Diversity of the ammonia-oxidizing population of a soil. *Appl Environ Microbiol*, 36: 584 – 588.
- Bertram, J., Dürre, P. (1989): Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol*, 152: 551 - 557.
- Binnerup, S. J., Bloem, J., Hansen, B. M., Wolters, W., Veninga, M., Hansen, M. (2001): Ribosomal RNA content in microcolony forming soil bacteria measured by quantitative 16S rRNA hybridization and image analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 37: 231 - 237.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513 - 1523.
- Bock, E. (1965): Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung sichtbaren Lichtes auf *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi*. *Arch Microbiol*, 51: 18 – 41.
- Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H. (1987): Nitrifying bacteria. In: Schlegel, H. G., Bowien, B. (Hrsg.): *Autotrophic bacteria.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. 5, 81 – 96.
- Bock, E., Koops, H.-P., Ahlers, B., Harms, H. (1992): Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In: Balows, A., Trüpers, H. G., Dworkin, M., Harder W., Schleifer, K. H. (Hrsg.): *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, 2. Aufl., Vol I, 414 – 430.
- Bollmann, A., Conrad, R. (1997): Recovery of nitrification and production of NO and N<sub>2</sub>O after exposure of soil to acetylene. *Biol Fert Soils*, 25: 41 - 46.

- Both, G. J., Gerards, S., Laanbroek, H. J. (1990): Enumeration of nitrite-oxidizing bacteria in grassland soils using a Most Probable Number technique: effect of nitrit concentration and sampling procedure. *FEMS Microbiol Ecol*, 74: 277 - 286.
- Braune, W., Leman, A., Taubert, H. (1991): *Pflanzenanatomisches Praktikum I*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 6.Aufl..
- Brehmer, U. (1981): Licht- und Schattennadeln der Fichte (*Picea abies* (L.) KARST.), Beiträge zu Anatomie, Morphologie und Wasserhaushalt. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brock, T. D. (1987): The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp Soc Gen Microbiol*, 57: 1707 – 1713.
- Bruns, M. A., Fries, M. R., Tiedje, J. M., Paul, E. A. (1998): Functional gene hybridization patterns of terrestrial ammonia-oxidizing bacteria. *Microbial Ecol*, 36: 293 - 302.
- Burchill, R. T. (1978): Powdery mildews of tree crops. In: Spencer, D. M. (Hrsg.): *The powdery mildews*. Academic Press, London, New York, San Francisco, 473 – 491.
- Butterbach-Bahl, K., Gasche, R., Willibald, G., Papen, H. (2002): Exchange of N-gases at the Höglwald Forest – A summary. *Plant Soil*, 240: 117 – 123.
- Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lawrence, J. R. (1992): Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. In: Marshall, K. C. (Hrsg.): *Advances in microbial ecology*. Plenum Press, New York, 1 - 67.
- Carl Zeiss GmbH (2003): Homepage – Liste der Fluorochrome. <http://www.zeiss.de/C12567BE00459794?Open>
- Carrol, G. C. (1988): Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2 – 9.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V.L. (1975): Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plan*, 6: 71 - 80.

- Christensen, H., Hansen, M., Sorensen, J. (1999): Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1753 - 1761.
- Colleau, C. (1968): Anatomie comparée des Feuilles de *Picea*. *La Cellule*, 67: 185 – 253.
- Conrad, R. (1996): Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O and NO). *Microbiol Rev*, 60: 609 – 640.
- Daum, M. (1999): Einfluß simulierten Stickstoffeintrags auf die N<sub>2</sub>O-Flüsse in einem Fichten-wald-Ökosystem und molekularbiologische Charakterisierung daran beteiligter, he-terotropher nitrifizierender Bakterien. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fa-kultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg..
- Daum, M., Zimmer, W., Papen, H., Kloos, K., Nawrath, K., Bothe, H. (1998): Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Curr Microbiol*, 37: 281 - 288.
- Davis, M. J., Whitcomb, R. F., Gillaspie, A. G. Jr. (1981): Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so-called rickettsia-like bacteria). In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balous, A., Schlegel, H. G. (Hrsg.): *The prokaryotes, A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2172 – 2188.
- Degrange, V., Bardin, R. (1995): Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2093 – 2098.
- Degrange, V., Couteaux, M., Anderson, J. M., Berg, M. P., Lensi, R. (1998): Nitrification and occurrence of *Nitrobacter* by MPN-PCR in low and high nitrifying coniferous forest soils. *Plant Soil*, 198: 201 - 208.
- DeLucia, E. H., Day, T. A., Vogelmann, T. C. (1992): Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant Cell Environ*, 15: 921 – 929.
- de Man, J. C. (1977): MPN tables for more than one test. *Eur J Appl Microbiol*, 4: 307 – 316.
- de Man, J. C. (1983): MPN tables, corrected. *Eur J Appl Microbiol*, 17: 301 – 305.

- Dommergues, Y. R. (1977): The Plant – Microorganism System. In: Dommergues, Y. R., Krupa, S. V. (Hrsg.): Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York, 1 – 37.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus, 12: 13 – 15.
- Feger, K. H., Brahmer, G., Zöttl, H. W. (1992): Projekt ARINUS: VI. Stickstoffumsatz und Auswirkungen der experimentellen Ammoniumsulfatgabe. KfK-PEF-Bericht, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 94: 199 – 211.
- Feger, K. H. (1992): Importance of land-use history for nutrient cycling in central european forests. In: Teller, A., Mathy, P., Jeffers, J. N. R. (Hrsg.): Responses of forest ecosystems to environmental changes. Elsevier Applied Science, 473 - 480.
- Feger, K. H. (1993): Bedeutung von ökosysteminternen Umsätzen und Nutzungseingriffen für den Stoffhaushalt von Waldlandschaften. Freib Bodenkundl Abh, Heft 31.
- Feger, K. H., Lorenz, K., Raspe, S., Armbruster, M. (2000): Mittel- und langfristige Auswirkungen von Kompensations- bzw. Bodenschutzkalkungen auf die Pedo- und Hydrosphäre. Schlußbericht, Projektträgerschaft Programm Lebensgrundlagen Umwelt und ihre Sicherung, Forschungsbericht FZKA – BWPLUS.
- Féray, C., Volat, B., Degrange, V., Clays-Josserand, A., Montuelle, B. (1999): Assessment of three methods for detection and quantification of nitrite-oxidizing bacteria and *Nitrobacter* in freshwater sediments (MPN-PCR, MPN-Griess, immunofluorescence). Microbial Ecol, 37: 208 - 217.
- Fink, S. (1996): Die Koniferennadel, Strukturelle Aspekte gesunder und geschädigter Nadelblätter. Naturwissenschaften, 83: 448 – 458.
- Firestone, M. K., Davidson, E. A. (1989): Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. In: Andreae, M. O., Schimel, D. S. (Hrsg.): Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. John Wiley-Verlag, New York, 7 – 21.
- Focht, D. D., Verstraete, W. (1977): Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Adv Microb Ecol, 1: 135 – 214.

- Fritsche, W. (1998): Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 104 – 106.
- Fröhlich, H. J. (1969): Untersuchungen über Benadelungsverhältnisse an Fichten. Theor Appl Genet, 39: 214 - 231.
- Garrity, G. M. (2001): Taxonomic outline of the procaryotic genera Bergey's Manual® of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 2. Aufl..
- Gasche, R. (1998): Ganzjährige Messungen zur Quantifizierung der NO/NO<sub>2</sub>-Flüsse in einem Stickstoff-übersättigten Waldökosystem (Höglwald) und Identifizierung der an der N-Oxid-Emission beteiligten mikrobiellen Prozesse. Dissertation, veröffentlicht in: Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts Atmosphärische Umweltforschung (IFU), 51.
- Gasche, R., Papen, H. (1999): A 3-year continuous record of nitrogen trace gas fluxes from untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany 2. NO and NO<sub>2</sub> fluxes. J Geophys Res, 104: 18.505 – 18.520.
- Geffler, A., Rennenberg, H. (1998): Atmospheric ammonia: mechanisms of uptake and impacts on N metabolism of plants. In: De Kok, L. J., Stulen, I. (Hrsg.): Responses of plant metabolism to air pollution. Backhuys Pub., Leiden, 81 – 94.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A. (2001): Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphat-removing biofilm. Appl Environ Microbiol, 67: 1351 – 1362.
- Giloh, H., Sedat, J. W. (1982): Fluorescence microscopy: Reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. Science, 217: 1252 - 1255.
- Goreau, T. J., Kaplan, W. A., Wofsy, S. C., McElroy, M. B., Valois, F. W., Watson, S. W. (1980): Production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. Appl Environ Microbiol, 40: 526 – 532.
- Hausner, M., Wuertz, S. (1999): High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. Appl Environ Microbiol, 65: 3710 - 3713.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R. (1993): The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. J Gen Microbiol, 139: 1147 - 1153.

- Heiss, G. (1979): Veränderungen der Wachsstrukturen im stomatären Bereich in Abhängigkeit vom Alter an *Picea abies*. Diplomarbeit, München.
- Heldt, H.-W. (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Heller, W., Rosemann, D., Osswald, W. F., Benz, B., Schönwitz, R., Lohwasser, K., Kloos, M., Sandermann jr., H. (1990): Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: Part I – Effects on polyphenol and monoterpene metabolism. *Environ Pollut*, 64: 353 – 366.
- Herbert, D., Phipps, P., Strange, R. (1971): Chemical analysis of microbial cells. In: Norris, D., Ribbons, D. (Hrsg.): *Methods of microbiology*. Academic Press Inc., New York, 5b: 209 – 344.
- Hermansson, A., Lindgren, P.E. (2001): Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61: 972 - 976.
- Heuser, T. (2002): Entwicklung und Anwendung von Isolierungs- und Quantifizierungsmethoden für epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.). Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (2000): Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol R*, 64: 624 – 653.
- Holtzhauer, M. (1997): Biochemische Labormethoden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Aufl., 2 – 4.
- Hooper, A. B., Terry, K. R. (1974): Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J Bacteriol*, 119: 899 – 906.
- Hovanec, T. A., DeLong, E. F. (1996): Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2888 – 2896.



- Huber, C. (1997): Untersuchungen zur Ammoniakimmission und zum Stoffhaushalt auf ungekalkten und neugekalkten Flächen in einem stickstoffübersättigten Fichtenökosystem (Höglwald). Dissertation, veröffentlicht in: Reihe Ökologie. Hieronymus-Verlag, München, 1 – 183.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., Bohannon, B. J. M. (2001): Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4399 - 4406.
- Husted, S., Schjoerring, J. K. (1995): Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L.. *Plant Physiol*, 109: 1453 – 1460.
- Hyman, M. R., Wood, P. M. (1985): Suicidal inactivation and labeling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem J*, 227: 779 – 725.
- Hyman, M. R., Arp, D. J. (1995): Effects of ammonia on the de novo synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. *J Bacteriol*, 177: 4974 - 4979.
- Hynes, R. K., Knowles, R. (1978): Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett*, 4: 319 – 321.
- Ingestad, T. (1959): Studies on the nutrition of forest tree seedlings. II. Mineral nutrition of spruce. *Physiol Plantarum*, 12: 568 – 593.
- Jacques, M.-A., Morris, C. E. (1995): A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol Ecol*, 18: 1 – 14.
- Jacques, M.-A., Kinkel, L. L., Morris, C. E. (1995): Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Appl Environ Microbiol*, 61: 899 – 906.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O. (1998): Management of fireblight: A case study in microbial ecology. *Annu Rev Phytopathol*, 36: 227 – 248.
- Kinkel, L. L. (1997): Microbial population dynamics on leaves. *Annu Rev Phytopathol*, 35: 327 – 347.

- Kirstein, K., Bock, E. (1993): Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. Arch Microbiol, 160: 447 - 453.
- Kiesow, L. A., Lindsley, B. F., Bless, J. W. (1977): Phosphoribulokinase from *Nitrobacter winogradskyi*: activation by reduced nicotinamide adenine dinucleotide and inhibition by pyridoxal phosphate. J Bacteriol, 130: 20 - 25.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., Deboer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., Woldendorp, J. W. (1997): Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl Environ Microbiol, 63: 1489 - 1497.
- Kowalchuk, G. A., Bodelier, P. L. E., Heilig, G. H. J., Stephen, J. R., Laanbroek, H. J. (1998): Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. FEMS Microbiol Ecol, 27: 339 - 350.
- Kowalchuk, G. A., Stienstra, A. W., Heilig, G. H. J., Stephen, J. R., Woldendorp, J. W. (2000): Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). FEMS Microbiol Ecol, 31: 207 - 215.
- Kreutzer, K. (1995): Effects of forest liming on soil processes. Plant Soil, 168 – 169: 447 – 470.
- Kreutzer, K., Göttlein, A., Pröbstle, P., Zuleger, M. (1991): Höglwaldforschung 1982 – 1989. Zielsetzung, Versuchskonzept, Basisdaten in „Ökosystemforschung Höglwald“. In: Kreutzer, K., Göttlein, A.: Paul Parey, Hamburg und Berlin, 174 – 186.
- Kreutzer, K., Weiss, T. (1998): The Höglwald field experiments – aims, concept and basic data. Plant Soil, 199: 1 – 10.
- Kuehn, M., Hausner, M., Bungartz, H. J., Wagner, M., Wilderer, P. A., Wuertz, S. (1998): Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms. Appl Environ Microbiol, 64: 4115 - 4127.

- Laanbroek, H. J., Woldendorp, J. W. (1995): Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural soils. In: Jones, G. (Hrsg.). *Advances in Microbial Ecology*, Plenum Press, New York, 275 - 304.
- Lange, B., Vejdělek, Z. J. (1980): *Photometrische Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim, Deerefield Beach (Florida), Basel, 362 - 371.
- Läuchli, A. (1976): Apoplasmic transport in tissues. In: Lüttge, U., Pitman, M., G. (Hrsg.): *Transport in plants II - Part B tissues and organs*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3 - 34.
- Lehninger, A. L. (1979): *Biochemie*. Verlag Chemie, Weinheim, New York, 2. Aufl..
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch, I. J. (1994): *In situ*-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265 – 275.
- Macrae, A. (2000): The use of 16S rRNA methods in soil microbial ecology. *Braz J Microbiol*, 31: 77 - 82.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr., Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. (2001): The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res*, 29: 173 – 174.
- Mansch, R., Bartosch, S., Bock, E. (1999): *Schädigungsbeiträge auf und in Bauwerksgestein durch biogene Nitrit- und Nitratbelastung sowie nitritkatalysiert Sulfatbildung aufgrund von Umweltbelastunge durch Emission und Immission von Schwefel- und speziell Stickstoffverbindungen. Abschlußbericht zum BMBF-Forschungsvorhaben Bau 5016E*.
- Mattson, M., Schjoerring, J. K. (1995): Ammonia emission from young barley plants: influence of N source, light/dark cycles and inhibition of glutamine synthetase. *J Exper Bot*, 47: 477 – 484.
- Millar, C. S. (1981): Infection processes on conifer needles. In: Blakeman J. P. (Hrsg.): *Microbial ecology of the phylloplane*. Academic Press Inc. LTD, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 185 – 209.

- Mishra, R. R., Das, P. K. (1981): Fungal succession on conifer needles. In: Blakeman, J. P. (Hrsg.): Microbial ecology of the phylloplane. Academic Press Inc. LTD, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 475 - 485.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1996): Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2156 – 2162.
- Montuelle, B., Volat, B., Torio-Fernandez, M. M., Navarro, E. (1996): Changes in *Nitrobacter* serotypes biodiversity in a river: impact of a wastewater treatment plant discharge. *Wat Res*, 30: 105 – 1064.
- Napp-Zinn, K. (1966): Anatomie des Blattes I. Blattanatomie der Gymnospermen. Hand. d. Pflanzenanatomie. Spez. Teil, Bd. VIII, Teil 1. Verlag Gebr. Borntraeger, Berlin.
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Yuichi Suwa, Klotz, M. G. (2002): Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol*, 177: 139 - 149.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 2. Aufl..
- Nunan, N., Ritz, K., Crabb, D., Harris, K., Wu, K., Crawford, J. W., Young, I. M. (2001): Quantification of the *in situ* distribution of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 37: 67 - 77.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., Stahl, D. A. (1986): Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol*, 40: 337 – 365.
- Orso, S., Gouy, M., Navarro, E., Normand, P. (1994): Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp.. *Int J Syst Bacteriol*, 44: 83 - 86.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., Olson, G. J. (1986): The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In: Marshall, K. C. (Hrsg.): Advances in microbial ecology. Plenum Press, New York, London, 1 - 55.
- Papen, H., von Berg, R. (1998): A Most Probable Number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant Soil*, 199: 123 – 130.

- Papen, H., Butterbach-Bahl, K. (1999): A 3-year continuous record of nitrogen trace gas fluxes from untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany 1. N<sub>2</sub>O emissions. *J Geophys Res*, 104: 18.487 – 18.503.
- Papen, H., Geßler, A., Zumbusch, E., Rennenberg, H. (2002): Chemolithoautotrophic nitrifiers in the phyllosphere of a spruce ecosystem receiving high atmospheric nitrogen input. *Curr Microbiol*. 44: 56 – 60.
- Parbery, I. H., Brown, J. F., Bofinger, V. J. (1981): Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In: Blakeman, J. P. (Hrsg.): *Microbial ecology of the phylloplane*. Academic Press, London, 47 – 65.
- Pellicer, A., Wiger, M., Axel, R., Silvenstein, S. (1978): The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell*, 14: 133 – 141.
- Preece, T. F., Dickinson, C. H. (1971): *Ecology of leaf surface microorganisms*. Academic Press, New York.
- Peretó, J. G., Velasco, A. M., Becerra, A., Lazcano, A. (1999): Comparative biochemistry of CO<sub>2</sub> fixation and the evolution of autotrophy. *Internat Microbiol*, 2: 3 – 10.
- Pfauch, W. (1964): Über Benadelungsunterschiede an Kamm- und Plattenfichten. *Arch Forstw*, 13: 535 - 544.
- Phillips, C. J., Harris, D., Dollhopf, S. L., Gross, K. L., Prosser, J. I., Paul, E., A. (2000): Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5410 – 5418.
- Porter, K. G., Feig, Y. S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*, 25: 943 - 948.
- Prinčič, A., Mahne, I., Megušar, F., Paul, E. A., Tiedje, J. M. (1998): Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3584 – 3590.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., Wagner, M. (2000): Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5368 - 5382.

- Raspe, S. (1992): Biomasse und Mineralstoffgehalte der Wurzeln von Fichtenbeständen (*Picea abies* Karst.) des Schwarzwaldes und Veränderungen nach Düngung. Habilitationsschrift an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.. Erschienen in der Schriftenreihe Freiburger Bodenkundliche Abhandlungen, Heft 92, Veröffentlichung im Selbstverlag des Instituts für Bodenkunde und Waldernährungslehre.
- Raspe, S., Feger, K.H., Zöttl, H.W. (Hrsg.) (1998): Ökosystemforschung im Schwarzwald – Auswirkungen von atmogenen Einträgen und Restabilisierungsmaßnahmen in Fichtenwäldern. Verbundprojekt ARINUS. – Umweltforschung in Baden-Württemberg. Ecomed-Verlag. Landsberg/Lech.
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Amann, R. (2001): Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol*, 67: 387 - 395.
- Reichelt, G. (1977): Die Landschaft und ihr naturräumliches Gefüge. In: Gutknecht, R. (Hrsg.): Der Schwarzwald-Baar-Kreis. Konrad Theiss Verlag, Stuttgart.
- Rennenberg, H., Kreutzer, K., Papen, H., Weber, P. (1998): Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. *New Phytol*, 139: 71 – 86.
- Riederer, M., Kurbasik, K., Steinbrecher, R., Voss, A. (1988): Surface areas, lengths and volumes of *Picea abies* (L.) Karst. needles: determination, biological variability and effect of environmental factors. *Trees*, 2: 165 – 172.
- Roche Diagnostics GmbH (2003): Homepage – Nonradioactive in Situ Hybridization Application Manual. [http://www.roche-applied-science.com/prod\\_inf/manuals/InSitu/InSi\\_toc.htm](http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/InSitu/InSi_toc.htm).
- Rodenkirchen, H., Forster, E. (1991): Untersuchungen zur potentiellen Stickstoffmineralisation und Nitrifikation in der organischen Auflage eines Fichtenbestandes nach Kalkung und künstlicher saurer Beregung. *Forstw Forsch*, 39: 151 – 164.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001): The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25: 39 - 67.

- Rothe, A. (1997): Einfluß des Baumartenanteils auf Durchwurzelung, Wasserhaushalt, Stoffhaushalt und Zuwachsleistung eines Fichten- und Buchen-Mischbestandes am Standort Höglwald. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig Maximilians Universität München. Veröffentlicht in der Schriftenreihe der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Universität München und der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., Liesack, W. (1997): The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4704 - 4712.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350 – 1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2. Aufl., USA.
- Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1998): *In situ* detection and identification of bacteria prior to their cultivation. *Biosci Microf*, 17: 15 – 22.
- Schlöter, M., Wiehe, W., Aßmus, B., Steindl, H., Becke, H., Höflich, G., Hartmann, A. (1997): Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium Leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2038 – 2046.
- Schmid, M. (1989): Oberirdische Biomasse- und Elementvorräte eines 100jährigen Fichtenbestandes (*Picea abies* (L.) Karst.) auf Buntsandstein-Braunerde im Stadtwald Villingen. Diplomarbeit durchgeführt am Institut für Bodenkunde und Waldernährungslehre der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg..
- Schmidt, E. L., Belser, L. W. (1982) Nitrifying bacteria. In: Page, A. L., Miller, R. H., Keeney, D. R. (Eds.): *Methods in Soil Analysis*. Agronomy 9, part 2, 2<sup>nd</sup> edn, ASA, SSSA, Madison, WI, 1027 – 1042.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S., Amann, R. (1999): Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospora* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl Environ Microbiol*, 65: 3690 - 3696.

- Schreiber, L. (1996): Wetting of the upper needle surface of *Abies grandis*: influence of pH, wax chemistry and epiphyllic microflora on contact angles. *Plant Cell Environ*, 19: 455 – 463.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (1992): Leaf surface microflora significantly may effect studies on foliar uptake of chemicals. *Botanica Acta*, 105: 345 – 347.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (1993): Determination of foliar uptake of chemicals: influence of leaf surface microflora. *Plant Cell Environ*, 16: 743 – 748.
- Sheppard, C. J. R. (1993): Confocal microscopy - principles, practice and options. In: Mason, W. T. (Hrsg.): *Fluorescent and luminescent probes for biological activity - A practical guide to technology for quantitative Real-Time analysis*. Academic Press Inc. LTD., Harcourt Brace & Company, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 229 - 236.
- Shuxian Li, Spear, R. N., Andrews, J. H. (1997): Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscop slides and leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3261 - 3267.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (Eds.) (1980): Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, 30: 225 – 420.
- Slimestad, R. (1997): Chemical studies of flavonoids from Norway Spruce, *Picea abies*. isolation, structure, elucidation and seasonal change of flavonoids and other phenolics from needles and cones. Dissertation, Department of Chemistry, University of Bergen.
- Smith, A. J., London, J., Stanier, R. Y. (1967): Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and Thiobacilli. *J Bacteriol*, 94: 972 – 983.
- Smith, R. F., Wiese, B. A., Wojzynski, M. K., Davison, D. B., Worley, K. C. (1996): BCM Search Launcher – An integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the world wide web. *Genome Res*, 6: 454 – 462.
- Smith, Z., Mccaig, A. E., Stephen, J. R., Embley, T. M., Prosser, J. I. (2001): Species diversity of uncultured and cultured populations of soil and marine ammonia oxidizing bacteria. *Microbial Ecology*, 42: 228 - 237.



- Snell, F.D., Snell, C.T. (1949): Colorimetric Methods of Analysis, Vol. 3. Van Nostrand, New York, 804 – 805.
- Stadler, B., Müller, T. (2000): Effects of aphids and moth caterpillars on epiphytic microorganisms in canopies of forest trees. *Can J For Res*, 30: 631 – 638.
- Stahl, A. D., Devereux, R., Amann, R. I., Flesher, B., Lin, C., Stromley, J. (1989): Ribosomal RNA based studies of natural microbial diversity and ecology. In: Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A. (Hrsg.): Recent advances in microbial ecology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 669 – 673.
- Stephen, J. R., Mccaig, A. E., Smith, Z., Prosser, J. I., Embley, T. M. (1996): Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 62: 4147 - 4154.
- Stenstrom, M. K., Poduska, R. A. (1980): The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res*, 14: 643 - 649.
- Strasburger, E. (Begr.), Noll, F. (Begr.), Schenck, H. (Begr.), Schimper, A. F. W. (Begr.), Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1991): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 33. Aufl.
- The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd., (1994): Catalogue of Strains. BPC-AUP Aberdeen Ltd, Aberdeen.
- Trimbacher, C., Weiss, P. (2000): Nadeloberflächenparameter und Elementgehalte von Fichtennadeln ausgewählter Industriestandorte. Projektbericht, Umweltbundesamt GmbH, Wien.
- Underhill, S. E., Prosser, J. I. (1987): Surface attachment of nitrifying bacteria and their inhibition by potassium ethyl xanthate. *Microbial Ecol*, 14: 129 - 139.
- Voytek, M. A., Ward, B. B. (1995): Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1444 - 1450.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H-P., Flood, J., Amann, R. (1996): *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Tech*, 34: 237 – 244.

- Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R., Ruff-Roberts, A. L. (1992): Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In: Marshall, K. C. (Hrsg.): Advances in microbial ecology. Plenum Press, New York, London, 219 - 286.
- Watson, S. W. (1971): Taxonomic considerations of the family *Nitrobacteraceae* Buchanan. Requests for opinions. *Int J Syst Bacteriol*, 21: 254 – 270.
- Watson, S. W., Valois, F. W., Waterbury, J. B. (1981): The Family *Nitrobacteraceae*. In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balous, A., Schlegel, H. G. (Hrsg.): The prokaryotes, A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1005 – 1022.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P., Hooper, A. B. (1989): Nitrifying bacteria. In: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., Holt, J. G. (Hrsg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume 3*. Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, 1808 – 1834.
- Weller, R., Ward, D. M. (1989): Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl Environ Microbiol*, 55: 1818 – 1822.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22: 474 – 481.
- Williams, P. J. L., Watson, S. W. (1968): Autotrophy in *Nitosocystis oceanus*. *J Bacteriol*, 96: 1640 – 1648.
- Wilson, M., Hirano, S. S., Lindow, S. E. (1999): Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl Environ Microbiol*. 65: 1435 – 1443.
- Winogradsky, S. (1891): Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann I Pasteur Paris*, 5: 577 – 616.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Neelson, K. H., Fox, G. E. (1984a): The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol*, 5: 315 – 326.

Woese, C. R., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Hahn, C. M., Tanner, R. S., Krieg, N. R., Koops, H.-P., Harms, H., Stackebrandt, E. (1984b): The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst Appl Microbiol*, 5: 327 – 336.

Wrage, N., Velthof, G. L., van Beusichem, M. L., Oenema, O. (2001): Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem*, 33: 1723 – 1732.