

**Charakterisierung des Nitritoxidanten  
*Nitrospira* in unterschiedlichen  
Ökosystemen**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doctor rerum naturalium**  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

von

Myriam Kruse  
aus Bremen

Osnabrück, Mai 2011

Dissertation vorgelegt dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität  
Osnabrück.

Gutachter der Dissertation:

**Erstgutachter:** Prof. Dr. André Lipski

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Evert P. Bakker

Gerade wenn du schon fast aufgeben willst, gerade wenn du glaubst,  
dass das Leben zu hart mit dir umspringt, dann denk daran, wer du bist.  
Denk an deinen Traum.

**Sergio Bambaren**



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1. Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der biologische Stickstoffkreislauf.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Organismen der Nitrifikation .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Nitrifizierende Organismen .....	2
1.2.2 Lebensweise nitrifizierender Organismen .....	4
<b>1.3 Nitrit-oxidierende Bakterien .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Gattungen der Nitrit-oxidierenden Bakterien .....	5
1.3.2 Stoffwechsel und Zellmorphologie Nitrit-oxidierender Bakterien.....	7
1.3.3 Gattung <i>Nitrospira</i> .....	11
<b>1.4 Untersuchungsgebiete .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Kläranlage des Klärwerkverbundes in Hamburg .....	13
1.4.1.1 Abwasserbehandlungen im kommunalen Klärwerk .....	13
1.4.1.2 Belebtschlammverfahren.....	14
1.4.2 Aquakulturanlagen in Büsum und Strande .....	15
1.4.2.1 Aquakulturanlage Büsum .....	18
1.4.2.2 Aquakulturanlage Strande .....	18
<b>1.5 Fettsäureanalytik.....</b>	<b>19</b>
1.5.1 Nomenklatur der Fettsäuren.....	19
1.5.2 Fettsäuretypen in der Zellmembran bei unterschiedlichen Temperaturen.....	19
1.5.3 Fettsäuren und stabile Isotope als Marker in Ökosystemen .....	20
<b>1.6 Charakterisierung autotropher Organismen .....</b>	<b>22</b>
1.6.1 Charakterisierung über Gesamtfettsäureprofile und FAME-SIP .....	23
1.6.2 Charakterisierung über 16S rRNA-Analysen.....	25
<b>1.7 Dominierende Nitritoxidanten in Biofiltersystemen .....</b>	<b>25</b>
1.7.1 Ziel dieser Arbeit.....	25

<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Herkunft und Kultivierung der Mikroorganismen .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Herkunft und Probenahmestandorte .....	27
2.1.2 Kultivierung von autotrophen Mikroorganismen .....	29
<b>2.2 Fettsäureanalysen.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Gesamtzell-Fettsäurepräparation der Reinkulturen und Anreicherungen.....	31
2.2.2 Markierungsexperimente von Biofiltermaterial über FAME-SIP .....	32
2.2.2.1 Inkubationsbedingungen der Biofilterproben.....	32
2.2.2.1.1 Inkubationsbedingungen der Proben aus dem Klärwerkverbund Hamburg .....	32
2.2.2.1.2 Inkubationsbedingungen der Proben aus marinen Aquakulturanlagen .....	33
2.2.2.2 Extraktion der Phospholipidfettsäuren aus Biofiltermaterial .....	34
2.2.2.3 Parameter der Gaschromatographen für die Fettsäureanalysen.....	34
2.2.2.4 Auswertungen der Fettsäureprofile .....	35
2.2.2.4.1 Identifizierung der FAMEs .....	35
2.2.2.4.2 Berechnung der <sup>13</sup> C-Inkorporation in Fettsäuren .....	36
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>38</b>
2.3.1 Entwicklung von Primern und Sonden.....	38
2.3.2 DNA-Extraktion und Amplifikation der 16S rRNA.....	40
2.3.3 Analysen der Umweltproben über Klonierung.....	44
2.3.4 Identifizierung über Sequenzierung und Sequenzanalysen.....	45
2.3.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Gesamtzell-Fettsäureanalysen der Reinkulturen und Anreicherungen .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Vorbereitende Analysen für die Markierung von Umweltproben.....</b>	<b>55</b>
3.2.1 Einbau von <sup>13</sup> C-Bicarbonat in die Fettsäuren von <i>Nitrospira</i> .....	55
3.2.2 Markierungen einer Umweltprobe mit <sup>12</sup> C- und <sup>13</sup> C-Bicarbonat .....	56
<b>3.3 Ergebnisse zum Ökosystem Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage ....</b>	<b>57</b>
3.3.1 FAME-SIP mit Proben aus Belebtschlamm.....	57
3.3.2 Anreicherungen aus Belebtschlamm.....	66
3.3.3 Sequenzanalysen der 16S rRNA aus Belebtschlamm.....	68
3.3.4 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung für Anreicherungen aus Belebtschlamm .....	69
<b>3.4 Ergebnisse zum Biofiltermaterial aus marinen Fischfarmen .....</b>	<b>76</b>
3.4.1 FAME-SIP Analysen mit Proben aus Büsum und Strande.....	77
3.4.2 FAME-SIP und 16S rRNA Sequenzanalysen der Biofilter aus Strande.....	79

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Gesamtzell-Fettsäureanalysen der Reinkulturen und Anreicherungen .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2 Vorbereitende Analysen für die Markierung von Umweltproben.....</b>	<b>92</b>
<b>4.3 Analysen zum Ökosystem Belebtschlamm aus einer Kläranlage .....</b>	<b>94</b>
<b>4.4 Analysen zum Biofiltermaterial aus Fischfarmen .....</b>	<b>104</b>
<b>5. Ausblick .....</b>	<b>111</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>112</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>125</b>
<b>7.1 Markierungen Belebtschlamm .....</b>	<b>125</b>
7.1.1 Markierung Juni 2008 .....	126
7.1.2 Markierung Oktober 2008.....	129
7.1.3 Markierung Januar 2009.....	130
7.1.4 Markierung Mai 2009 .....	132
7.1.5 Markierung August 2009 .....	134
<b>7.2 Markierungen Biofilter Fischfarm .....</b>	<b>137</b>
7.2.1 Markierung Biofiltersystem Modul II (Büsum).....	137
7.2.2 Markierung Biofiltersystem der marinen Fischfarm (Strande).....	138
<b>7.3 Statistische Analysen zur Markierung von Fettsäuren.....</b>	<b>143</b>
<b>7.4 Statistische Analysen zur Signifikanz von Gesamtzellfettsäuren .....</b>	<b>144</b>

## **Danksagung**

**Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen  
Leistung und etwaige frühere Promotionsverfahren**

## **Lebenslauf**

## **Beiträge und Publikationen**

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemolithoautotrophe, Nitrit-oxidierende Bakteriengemeinschaft im Belebungsbecken einer kommunalen Kläranlage und im Biofiltersystem mariner Aquakulturanlagen untersucht. Die Inkubationen der einzelnen Proben erfolgten bei unterschiedlichen Inkubationsparametern. Die Zellaktivität der autotrophen Gemeinschaft wurde über die Assimilation von  $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ , welches den Kulturen in Form von stabilen Isotopen zugefügt wurde, ermittelt. Hier zeigte sich, dass das Phylum *Nitrospira* in den untersuchten Ökosystemen eine tragende Rolle übernimmt. Um diese führende Rolle von *Nitrospira* in den verschiedenen Habitaten zu bestätigen, erfolgte die weitere Identifizierung, Charakterisierung und Differenzierung der Nitrit-oxidierenden Organismen dieser Gattung durch eine Kombination aus chemotaxonomischen Analysen und molekularbiologischen Untersuchungen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Hauptfettsäurekomponenten der autotrophen, Nitrit-oxidierenden Bakteriengemeinschaften bei unterschiedlichen Temperaturen nur quantitativ, nicht aber qualitativ verändern. Weiter ist, durch die Analyse verschiedener Anreicherungen, das ubiquitäre Vorkommen der Gattung *Nitrospira* demonstriert worden. Die spezifischen Hauptfettsäuren dieser Gattung wurden in Anreicherungen aus diversen Ökosystemen identifiziert. Die Originalproben der analysierten Anreicherungen stammten aus Ökosystemen mit unterschiedlichen Umweltbedingungen für Temperatur, Salinität und pH-Wert. Es zeigte sich, dass Organismen der Gattung *Nitrospira* eindeutig von anderen Nitritoxidanten über die spezifischen Fettsäurekomponenten abgrenzbar sind. Weiter konnte demonstriert werden, dass die Assimilation von  $^{13}\text{C}$  in die Zellbestandteile autotropher Nitrit-oxidierender Bakteriengemeinschaften über die Fettsäureanalytik mittels FAME-SIP detektierbar ist und über den Markierungsgrad dargestellt werden kann. Über diese Einbauraten ist es möglich Rückschlüsse auf die metabolische Zellaktivität der Nitritoxidanten zu führen, um über diese Hinweise die Rolle der einzelnen Gattungen der Nitrit-oxidierenden Bakterien nachweisen zu können. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden mit

neu entwickelten spezifischen Primern und Sonden für die Gattung *Nitrospira* durchgeführt. Die Primer wurden für die spezifische Amplifikation der 16S rRNA eingesetzt, der direkte Nachweis der Organismen erfolgte über die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mittels Oligonukleotidsonden.

Das Belebungsbecken der kommunalen Kläranlage wurde zu unterschiedlichen Jahreszeiten beprobt. Die Inkubationen erfolgten bei verschiedenen Temperaturen und Nitritkonzentrationen. Die Untersuchungen der Proben aus Belebtschlamm wiesen darauf hin, dass *Nitrospira* und andere Vertreter der Nitrit-oxidierenden Bakteriengemeinschaft die unterschiedlichen ökologischen Nischen des Ökosystems besetzen können. Die Hauptkomponenten, welche unter den gewählten Bedingungen <sup>13</sup>C-Assimilierung aufwiesen, waren die Hauptfettsäuren 16:1 *cis* 7, 16:1 *cis* 9 und 16:1 *cis* 11. Die Fettsäure 16:1 *cis* 11 ist für den Organismus *Candidatus Nitrospira defluvii* als Hauptkomponente bekannt (SPIECK et al., 2006). Die hohen Einbauraten in diese Fettsäure, die über das gesamte Temperaturspektrum, jedoch vor allem bei einer Nitritkonzentration von 3 mM nachgewiesen werden konnte, deuten auf die hohe Abundanz von *Candidatus Nitrospira defluvii* im untersuchten Habitat hin. Des Weiteren konnte erstmals in dieser Arbeit die *Nitrospira*-spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 7 als eine Hauptkomponente in diesem Ökosystem identifiziert werden. Diese neue Variante von *Nitrospira*, zeigte ein enges Temperaturspektrum, mit einer hohen <sup>13</sup>C-Inkorporation bei Temperaturen von 17°C und 22°C. Bei diesen Temperaturen bevorzugte dieser unbekannte *Nitrospira* eine Nitritkonzentration von 0,3 mM. Durch die Verwendung verschiedener spezifischer Primer für die Gattung *Nitrospira* konnten 16S rRNA Sequenzen detektiert werden, welche auffällige Basenunterschiede zu *Candidatus Nitrospira defluvii*, dem bekannten *Nitrospira* aus Belebtschlamm, aufwiesen. Weiter wurden spezifische Oligonukleotidsonden eingesetzt, durch die unterschiedliche Zellmorphologien für Spezies der Gattung *Nitrospira* über die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung gezeigt werden konnten. Eine weitere nicht spezifische Hauptkomponente, welche in den Proben autotrophe <sup>13</sup>C-Assimilierung aufwies ist die Fettsäure 16:1 *cis* 9. Bei dieser Fettsäure handelt es sich um die Hauptkomponente des autotrophen Betaproteobakteriums *Nitrotoga*. Die Einbauraten in die Fettsäure 16:1 *cis* 9

könnte auf eine Zellaktivität von *Nitrotoga* hinweisen. Legt man als Maßstab für eine Zellaktivität die bekannten Wachstumsparameter (ALAWI et al., 2007; 2009) von *Nitrotoga* zugrunde, so ist eine hohe Zellaktivität bei niedrigen Temperaturen mit niedrigen Nitritkonzentrationen zu erwarten. Sehr hohe Einbauraten in die Fettsäure 16:1 *cis* 9 wurden allerdings bei Temperaturen von 28°C und 32°C mit hohen Nitritkonzentrationen von 30 mM ermittelt. Diese Inkubationsparameter gaben Anhaltspunkte auf einen bisher unbekanntem autotrophen Organismus im Belebtschlamm, welcher eine hohe Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von Nitrit aufweist. Einige analysierte Proben zeigten hohe <sup>13</sup>C-Einbauraten in unterschiedliche Hauptkomponenten. Dies könnten Anzeichen für Schnittpunkte im Habitat sein, in denen Konkurrenzsituationen der unterschiedlichen Nitritoxidanten entstehen können. Hier müssten sich die Nitritoxidanten die zur Verfügung stehenden Ressourcen, wie das Angebot des Substrates Nitrit, teilen.

Bei den untersuchten marinen Aquakulturanlagen handelte es sich um Meerwasser-Rezirkulationsanlagen, deren Abwasserreinigung über verschiedene Biofilter-Module erfolgte. Analysiert wurde der Biofilm auf den Füllkörpern der unterschiedlichen Moduleinheiten dieser Systeme. Die Proben der Anlagen sind mit unterschiedlichen Temperaturen und Nitritkonzentrationen belegt worden. Die Markierung mit <sup>13</sup>C-Bicarbonat zeigte, dass *Nitrospira* die dominierende Gattung in den untersuchten Systemen darstellt. Die spezifischen Hauptkomponenten, welche detektiert wurden sind die Fettsäuren 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11. Diese spezifischen Komponenten der Gattung *Nitrospira* wiesen bei den gewählten Temperaturen eine Substratabhängigkeit an sehr hohe Nitritkonzentrationen auf. Diese Abhängigkeit wurde über höhere <sup>13</sup>C-Assimilierungen bei steigender Nitritkonzentration ermittelt, was die hohe Leistungsfähigkeit dieser Nitritoxidierenden Organismen im Biofilm auf den Biofiltern demonstriert. In den Sequenzanalysen der 16S rRNA konnten vier unterschiedliche Cluster für die Organismen der Gattung *Nitrospira* aus den Biofilter-Systemen abgegrenzt werden. Diese Analysen geben Anhaltspunkte auf unterschiedliche Varianten von *Nitrospira* in den untersuchten Biofilmen aus den Biofilteranlagen der marinen Aquakulturanlagen.

## Abkürzungsverzeichnis

Acc. Nr.	Accession Nummer
AOA	Ammoniak-oxidierende Archaeen
AOB	Ammoniak-oxidierende Bakterien
ATP	Adenosintriphosphat
Bb	Proben aus dem Biofiltersystem für Barramundi Aquakulturen mit schwarze Füllkörpern
BS	Proben aus Belebtschlamm
BSA	bovine serum albumin
bp	Basenpaar(e)
Bw	Proben aus dem Biofiltersystem für Barramundi Aquakulturen mit weißen Füllkörpern
Cy3	Carboxymethylindocyanin-succinimidylester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMDS	Dimethyldisulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Equivalent Chain Length
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FAME	Fettsäuremethylester
SIP	Markierung mit stabilen Isotopen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FK	Füllkörper
GC-FID	Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor
GC-C-IRMS	Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnismassenspektrometrie
GC-MSD	Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor

## Abkürzungsverzeichnis

---

HDPE	High Density Polyethylen
ICMs	intracytoplasmatische Membranen
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
NAD(P)	Nicotinamidadenindinucleotid (Phosphat)
NOB	Nitrit-oxidierende Bakterien
Ns.	Nitrospira
NXR	Nitritoxidoreduktase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PLFA	Phospholipidfettsäuren
RAS	Meerwasser-Rezirkulationsanlage
rpm	revolutions per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sh	Proben aus dem Biofiltersystem für Shrimps Aquakulturen
SIM	Selected-Ion-Monitoring
spec.	Spezies
TKN	Total Kjehldahl Nitrogen

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Hauptfettsäuren in (%) der bekannten Nitrit-oxidierenden Bakterien .....	23
Tab. 2: Herkunft der Stämme und Anreicherungen .....	28
Tab. 3: Dauerkulturen und Anreicherungen aus Umweltproben.....	29
Tab. 4: Mineralmedium für Nitritoxidanten.....	30
Tab. 5: Liste der Primer .....	41
Tab. 6: Parameter für die Amplifikation der 16S rRNA .....	43
Tab. 7: Liste der Sonden .....	47
Tab. 8: 10 x PBS-Puffer .....	47
Tab. 9: Hauptkomponenten der Stämme und Anreicherungen .....	50
Tab. 10: Gesamtzellfettsäuren von <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> .....	51
Tab. 11: Gesamtzellfettsäuren von <i>Nitrobacter vulgaris</i> AB1 .....	52
Tab. 12: Gesamtzellfettsäuren aus der Anreicherung „Ecomares 2.1“ .....	52
Tab. 13: Gesamtzellfettsäureprofile aus heißen Quellen.....	53
Tab. 14: Gesamtzellfettsäureprofile der Anreicherung „Ham-1“ & „MAK 207-5“... 55	
Tab. 15: Markierung einer Anreicherungskultur von <i>Candidatus</i> Ns. defluvii .....	56
Tab. 16: Nitritgabe der Inkubationen in Hamburg (HH) und Osnabrück (OS) .....	82

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des biologischen Stickstoffkreislaufes.....	1
Abb. 2: Belebungsbecken des Klärwerkverbundes Hamburg .....	14
Abb. 3: Probenahme Belebtschlamm .....	15
Abb. 4: Weiße HDPE-Füllkörper mit Biofilmbildung.....	16
Abb. 5: Schwarze und weiße HDPE-Füllkörper.....	17
Abb. 6: Das Nitrospira-Cluster.....	39
Abb. 7: Gradienten PCR der entwickelten Primer mit Testorganismen .....	42
Abb. 8: Markierung Belebtschlammproben (Parallelen für $^{12}\text{C}$ & $^{13}\text{C}$ ) .....	57
Abb. 9: Mittelwerte der Temperaturen im Original-Belebtschlamm .....	59
Abb. 10: Markierung Belebtschlammproben $10^{\circ}\text{C}$ .....	60
Abb. 11: Markierung Belebtschlammproben $17^{\circ}\text{C}$ .....	61
Abb. 12: Markierung Belebtschlammproben $22^{\circ}\text{C}$ .....	63
Abb. 13: Markierung Belebtschlammproben $28^{\circ}\text{C}$ .....	64
Abb. 14: Markierung Belebtschlammproben $32^{\circ}\text{C}$ .....	65
Abb. 15: Anreicherungsversuche der neuen autotrophen Bakterien .....	67
Abb. 16: Ausschnitt aus Alignment der Sequenzen aus Belebtschlamm .....	69
Abb. 17: Sonde EUB338 mit <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> .....	71
Abb. 18: Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 mit <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> .....	71
Abb. 19: Sonde NS177A mit <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> .....	72
Abb. 20: Sonde EUB338 mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“) .....	73
Abb. 21: Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“). 73	
Abb. 22: Sonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“) .....	74
Abb. 23: Sonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“) .....	74
Abb. 24: Sonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“) .....	75

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 25: Sonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS_17“) .....	75
Abb. 26: Markierungen der Biofilterproben aus Büsum (Modul II) .....	78
Abb. 27: Markierungen der Biofilterproben aus Strande (26°C) .....	78
Abb. 28: Markierungen der Biofilterproben aus Strande (17°C) .....	79
Abb. 29: Markierungen der Biofilterproben aus Strande (28°C) .....	80
Abb. 30: Stammbaum der 16S rRNA Gensequenzen aus Strande .....	84
Abb. 31: Ausschnitt aus dem Alignment der Sequenzen aus Strande .....	85
Abb. 32: PLFA-Analyse aus Belebtschlamm-Original (Jahr 2008) .....	125
Abb. 33: PLFA-Analyse aus Belebtschlamm-Original (Jahr 2009) .....	125
Abb. 34: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (32°C).....	126
Abb. 35: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (28°C).....	127
Abb. 36: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (22°C).....	127
Abb. 37: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (17°C).....	128
Abb. 38: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (10°C).....	128
Abb. 39: Belebtschlamm-Markierung Juni 2008 (4°C).....	129
Abb. 40: Belebtschlamm-Markierung Oktober 2008 (22°C & 28°C) .....	130
Abb. 41: Belebtschlamm-Markierung Januar 2009 (22°C) .....	131
Abb. 42: Belebtschlamm-Markierung Januar 2009 (17°C).....	131
Abb. 43: Belebtschlamm-Markierung Januar 2009 (10°C) .....	132
Abb. 44: Belebtschlamm-Markierung Mai 2009 (28°C) .....	133
Abb. 45: Belebtschlamm-Markierung Mai 2009 (22°C) .....	133
Abb. 46: Belebtschlamm-Markierung Mai 2009 (17°C) .....	134
Abb. 47: Belebtschlamm-Markierung August 2009 (32°C).....	135
Abb. 48: Belebtschlamm-Markierung August 2009 (28°C).....	135
Abb. 49: Belebtschlamm-Markierung August 2009 (22°C).....	136
Abb. 50: Belebtschlamm-Markierung August 2009 (17°C).....	136

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 51: Belebtschlamm-Markierung August 2009 (10°C).....	137
Abb. 52: PLFA-Analyse des Original-Biofiltermaterials vom Modul II (Büsum) ..	137
Abb. 53: Biofilter-Markierung Modul II (Büsum).....	138
Abb. 54: PLFA-Analysen des Original-Biofiltermaterials aus Strande .....	139
Abb. 55: Biofilter-Markierung 26°C (Strande).....	140
Abb. 56: Biofilter-Markierung Barramundi (schwarze FK) 28°C (Strande).....	140
Abb. 57: Biofilter-Markierung Barramundi (schwarze FK) 17°C (Strande).....	141
Abb. 58: Biofilter-Markierung Barramundi (weiße FK) 28°C (Strande) .....	141
Abb. 59: Biofilter-Markierung Barramundi (weiße FK) 17°C (Strande) .....	142
Abb. 60: Biofilter-Markierung Shrimp (gemischte FK) 28°C (Strande).....	142
Abb. 61: Biofilter-Markierung Shrimp (gemischte FK) 17°C (Strande).....	143



ersten Stufe wird Ammoniak zu Nitrit oxidiert, dies geschieht durch Ammoniak-oxidierende Bakteriengemeinschaften (AOB). In der zweiten Stufe wird das Nitrit durch Nitrit-oxidierende Bakteriengemeinschaften (NOB) zu Nitrat oxidiert (BOCK und KOOPS, 1992). Am Prozess der Nitrifikation sind auch Ammoniak-oxidierende Archaeen (AOA) beteiligt, welche Ammoniak zu Nitrit oxidieren können (KÖNNEKE et al., 2005; DE LA TORRE et al., 2007; HATZENPICHLER et al., 2008). Ein weiterer mikrobieller Prozess konnte in anoxischen Zonen nachgewiesen werden. Hier wird durch Planctomyceten die anaerobe Oxidation von Ammonium, der so genannte Anammox-Prozess, vollzogen. Die Anammoxreaktionen beinhalten die Oxidation von Ammonium mit Nitrit als Elektronenakzeptor, wobei Stickstoff gebildet wird (STROUS et al., 1999; JETTEN et al., 2001; FREITAG & PROSSER, 2003; KUENEN, 2008). Die Oxidationen durch Nitrifikanten verhindert nicht nur die Akkumulation, des für Lebewesen toxischen Nitrits, sondern sie beeinflussen auch die Aktivität der Mikroorganismen, welche für die Denitrifikation verantwortlich sind. Während der Denitrifikation werden Nitrit oder Nitrat zu Stickoxiden sowie elementarem Stickstoff reduziert und der Kreislauf somit geschlossen (KNOWLES, 1982; 2000).

### **1.2 Organismen der Nitrifikation**

Die Nitrifikation ist ein Prozess in zwei Stufen und beinhaltet die biologische Oxidation von Ammoniak zu Nitrit, gefolgt von der Oxidation von Nitrit zu Nitrat (BOCK und KOOPS, 1992).

#### **1.2.1 Nitrifizierende Organismen**

Die meisten nitrifizierenden Organismen sind obligat chemolithoautotroph. Ursprünglich wurden die nitrifizierenden Organismen in die Familie der *Nitrobacteriaceae* eingeordnet. Diese Familie ist in die Gruppe der Ammoniak-oxidierenden Bakterien und in die Gruppe der Nitrit-oxidierenden Bakterien unterteilt. Diese Unterteilung erfolgte durch zellmorphologische Gesichtspunkte, wie Zellgröße, Zellform und über das Arrangement der intracytoplasmatischen Membranen (WATSON, 1971a; WATSON et al., 1989). Jedoch konnte diese Einteilung durch phylogenetische Analysen mittels molekularbiologischer Techniken erweitert werden. Die Daten zeigen eine weiterführende Untergliederung zwischen den Ammoniak- und Nitrit-oxidierenden Bakterien,

sowie innerhalb der einzelnen Gruppen auf (HEAD et al., 1993; EHRICH et al., 1995; PURKHOLD et al., 2000). Die Einteilung der nitrifizierenden Organismen erfolgt seit dem aufgrund der phylogenetischen Datenbasis aus molekularbiologischen Analysen. Ammoniak- und Nitrit-oxidierende Bakterien werden auf Gattungsebene durch unterschiedliche Präfixe voneinander abgegrenzt. Ammoniak-oxidierende Bakterien beginnen mit der Vorsilbe Nitroso-, Nitrit-oxidierende Bakterien tragen die Vorsilbe Nitro- in ihrem Gattungsnamen. Nitrifizierer werden mittels 16S rRNA Sequenzanalysen sechs verschiedenen phylogenetischen Hauptgruppen zugeordnet. Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB) lassen sich den Klassen der Beta- und der Gammaproteobakterien zuordnen. Zu den Betaproteobakterien gehören die Ammoniakoxidanten *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* (HEAD et al., 1993; WOESE et al., 1984 a/b; TESKE et al., 1994; UTAKER et al., 1994; POMMERENING-RÖSER et al., 1996; PURKHOLD et al., 2000). In die Klasse der Gammaproteobakterien wurden weitere Organismen der Gattung *Nitrosococcus* (WOESE et al., 1985; HEAD et al., 1993; PURKHOLD et al., 2000) eingeordnet, unter anderem gehören die Spezies *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus* (HEAD et al., 1993; PURKHOLD et al., 2000) in diese Klasse. Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB) lassen sich in die Klassen der Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien einordnen. In der Klasse der Alphaproteobakterien befindet sich die Gattung *Nitrobacter*, in die Klasse der Betaproteobakterien wurden Organismen des Taxons *Nitrotoga* eingeordnet und die Gattung *Nitrococcus* gehört zu den Gammaproteobakterien (ORSO et al., 1994; ALAWI et al., 2007; TESKE et al., 1994). Die Gattung *Nitrospina* wurde in die Klasse der Deltaproteobakterien (TESKE et al., 1994) eingegliedert. Neue Berechnungen von MAIXNER (2009) weisen dieser Gattung einen eigenen phylogenetischen Zweig außerhalb der Proteobakterien im 16S rRNA Stammbaum zu. Die Gattung *Nitrospira* beschreibt das Phylum *Nitrospirae*, dieses Phylum liegt außerhalb der Proteobakterien (Ehrich et al., 1995). Die Ammoniak-oxidierenden Archaeen (AOA) gehören zu den *Crenarchaeota* (KÖNNEKE et al., 2005; SCHLEPER et al., 2005). Zu dieser Klasse der Ammoniak-oxidierenden *Crenarchaeota* gehören unter anderem die Spezies *Nitrosopumilus maritimus*, *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* und *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (KÖNNEKE et al., 2005; DE

LA TORRE et al. 2007; HATZENPICHLER et al. 2008). Nitrifizierende Mikroorganismen können zudem über die Mechanismen ihrer Energiegewinnung unterschieden werden. Ammoniak- und Nitritoxidanten weisen unterschiedliche Schlüsselenzyme für die Ammoniak- bzw. Nitritoxidation auf. Die Ammoniak-oxidierenden Organismen erhalten ihre Energie durch die Oxidation von Ammoniak zu Nitrit. Dieser Prozess läuft in zwei Stufen ab und es entsteht das Zwischenprodukt Hydroxylamin. Die Ammoniakmonooxygenase und Hydroxylaminoxidoreduktase sind die Schlüsselenzyme für diesen Prozess (HOLLOCHER et al., 1981; OLSON & HOOPER, 1983). Die Schlüsselenzyme der Nitrit-oxidierenden Bakterien sind die Nitritoxidoreduktase und die Nitritreduktase (ALEEM et al., 1965; AHLERS et al., 1990), auf die Energiegewinnung der Nitritoxidanten wird im Kapitel 1.3.2 näher eingegangen.

### 1.2.2 Lebensweise nitrifizierender Organismen

Nitrifizierende Organismen sind zu großen Anteilen an Partikel oder Sedimente angeheftet. Nach dem bisherigen Kenntnisstand beruht die Anheftung nitrifizierender Bakterien auf der Ausbildung einer EPS-Hülle (extrazelluläre polymere Substanzen). Die Zusammensetzung der EPS ist für nitrifizierende Bakterien noch nicht geklärt worden. In ROHWERDER et al. (2003 part A) und RODRÍGUEZ et al. (2003) konnte für eisenoxidierende Mikroorganismen gezeigt werden, dass hier die EPS aus einer Mischung von Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und Eisenionen besteht. Extrazelluläre polymere Substanzen verbinden Bakterienkolonien untereinander, sowie mit dem Substrat. Bei nitrifizierenden Mikroorganismen wird für die Verbindung mit dem Substrat keine chemische, sondern vermutlich eine physikalische Verankerung genutzt. Bevorzugte Substrate für die Anheftung sind Betonit, Montmorillonit, Kalkstein,  $\text{CaCO}_3$  und Cellulose (DIAB und SHILO, 1988; Kim et al., 1997; TEIXERA et al., 1998a). Weitere Untersuchungen von TEIXERA und OLIVEIRA (1998b) wurden mit *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* auf Substraten wie Kalkstein, Bimsstein und porösem Glas durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Bimsstein am geringsten ausgebildet war, dies wird auf die Wechselwirkung der positiv geladenen Kalziumionen des Substrates mit den negativ geladenen Molekülen des EPS-Systems zurückgeführt. LARSEN et al. (2008a) konnten ausschließen,

dass es sich bei dem EPS-System um extrazelluläre Ausstülpungen oder extrazelluläre Strukturen (z. B. Fibrillen) handelt. Es wurde ein amorpher Schleim detektiert, der Bakterien, wie *Nitrosomonas oligotropha* und *Nitrospira spec.* umhüllt und mit dem Substrat verbindet. Zudem konnten LARSEN et al. (2008b) zeigen, dass Mikrokolonien von *Nitrosomonas* und *Nitrospira* sehr fest auf Klärschlammflocken haften. Auch bei hohen Scherkräften, welche durch Rotation von 2200 U/s im Klärschlamm erzeugt werden, hafteten die nitrifizierenden Organismen auf dem Substrat. Es wurde nur 1 – 3 % der Mikrokolonien abgelöst. Diese hohen Adhäsionskräfte der nitrifizierenden Organismen lassen den Schluss zu, dass Nitrifikanten in Habitaten mit hohen Scherkräften durchaus zur Anheftung an Substrate befähigt sind. Es kommt zu einer Anreicherung von nitrifizierenden Organismen in diesen Habitaten, da sie fest mit dem Substrat verbunden sind und zusätzlich durch das EPS-System vor den Scherkräften geschützt werden. Weiter scheint die Ausbildung der EPS temperaturabhängig zu sein. So zeigten AL-HALBOUNI et al. (2008), dass die Ausbildung von EPS bei niedrigen Temperaturen größer ist als bei hohen Temperaturen. MARSHALL et al. (1996) stellen die Vermutung auf, dass es sich bei den Ammoniak-oxidierenden Organismen um die Erstbesiedler handelt, welche durch ihr Ausscheidungsprodukt, dem Nitrit, die Nitrit-oxidierenden Bakterien zur Anheftung stimulieren, was zur Biofilmbildung durch Nitrifikanten auf den Substraten führt.

### 1.3 Nitrit-oxidierende Bakterien

Nitrit-oxidierende Bakterien katalysieren den zweiten Schritt der Nitrifikation, indem Nitrit zu Nitrat oxidiert wird. Die bekannten Nitrit-oxidierenden Bakterien gehören zu den Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrotoga* und *Nitrospira*.

#### 1.3.1 Gattungen der Nitrit-oxidierenden Bakterien

Chemolithoautotrophes Wachstum und in diesem Zuge auch Vertreter der Gattung *Nitrobacter* wurden zum ersten Mal durch WINOGRADSKY (1890) beschrieben. Diese Gattung, welche zu den Alphaproteobakterien klassifiziert wird, enthält vier beschriebene Arten: *Nitrobacter winogradskyi* (WATSON, 1971b; WINSLOW et al., 1917), *Nitrobacter hamburgensis* (BOCK et al., 1983), *Nitrobacter vulgaris* (BOCK et

al., 1990) und *Nitrobacter alkalicus* (SOROKIN et al., 1998). Die Organismen der Gattung *Nitrobacter* konnten in sehr unterschiedlichen terrestrischen und aquatischen Systemen identifiziert werden. Diese Spezies wurde in Bodenproben landwirtschaftlich genutzter Flächen (DERANGE & BARDIN, 1995) und im Ästuar der Seine nachgewiesen (CÉBRON & GARNIER, 2005). Des Weiteren war *Nitrobacter* in Proben des Abwassers einer Tierkörperbeseitigungsanlage nachweisbar (WAGNER et al., 1996), sowie in marinen Systemen (WARD & CARLUCCI, 1985). Zudem konnte die Anwesenheit von Organismen der Gattung *Nitrobacter* in Biofilmen auf Sandsteinen bei Untersuchungen von Erosionen an historischen Gebäuden (BOCK & SAND, 1993; MANSCH & BOCK, 1998) belegt werden.

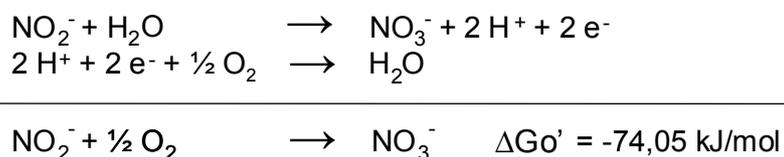
Die Organismen der Gattungen *Nitrococcus* und *Nitrospina* sind weitestgehend noch nicht charakterisiert worden. Die Gattung *Nitrococcus* enthält eine beschriebene Art, *Nitrococcus mobilis*, welche den Gammaproteobakterien zugeordnet werden konnte (WATSON & WATERBURY, 1971b). Die Gattung *Nitrospina* enthält ebenfalls eine beschriebene Art, *Nitrospina gracilis*, welche von TESKE et al. (1994) in die Deltaproteobakterien eingeordnet wurde. Neue Sequenzanalysen auf 16S rRNA-Ebene weisen der Gattung *Nitrospina* eine eigene Hauptgruppe im phylogenetischen Stammbaum zu (MAIXNER, 2009). Hinweise hierauf sind schon durch LIPSKI et al. (2001) aufgrund einer Clusteranalyse der Fettsäureprofile nitrifizierender Organismen beschrieben worden. Beide Gattungen, *Nitrococcus* und *Nitrospina*, konnten aus Seewasser isoliert werden und wurden bis heute nicht außerhalb mariner Habitate nachgewiesen (WARD & CARLUCCI, 1985; LABRENZ et al., 2007; ZAIKOVA et al., 2010).

Organismen der Spezies *Nitrotoga* wurden erstmals durch ALAWI et al. (2007) beschrieben. Dieser Nitritoxidant konnte erstmals in einer Anreicherung aus Eiskeil Polygonen der sibirischen Arktis nachgewiesen werden. Phylogenetisch ist *Nitrotoga* den Betaproteobakterien zugeordnet worden. Weitere Hinweise auf das Taxon *Nitrotoga* zeigten sich in Proben aus Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage (ALAWI et al., 2009).

Das Phylum *Nitrospirae* ist in die Klasse *Nitrospira*, mit der Ordnung *Nitrospirales* in die Familie *Nitrospiraceae* untergliedert. Zu diesem Phylum gehören metabolisch sehr unterschiedliche Gattungen die sich in *Nitrospira*, *Leptospirillum*, *Magnetobacterium* und *Thermodesulfovibrio* unterteilen lassen (EHRICH et al., 1995). Die Gattung *Nitrospira* repräsentiert eine Gruppe mit drei beschriebenen Spezies und zwei weiteren Taxa welche bis zu diesem Zeitpunkt mit dem Status „*Candidatus*“ veröffentlicht worden sind. Die erste beschriebene Art ist *Nitrospira marina* (WATSON et al., 1986). Diese Spezies wurde aus Oberflächenwasser vom atlantischen Ozean im Golf von Maine (USA) angereichert. Die zweite beschriebene Art ist *Nitrospira moscoviensis* (EHRICH et al., 1995), dieser Organismus stammt aus dem Heizungssystem in Moskau (Russland). Bei der dritten beschriebenen Art handelt es sich um *Nitrospira calida* (LEBEDEVA et al., 2011), welcher durch Anreicherungen aus der heißen Quelle in der Nähe von Gorjachinsk (Baikal Zone (Russland)) erhalten wurde. Zu den Anreicherungen gehört *Candidatus Nitrospira defluvii* (SPIECK et al., 2006), aus dem Belebtschlamm-Areal des Klärwerkverbundes Köhlbrandhöft/Dradenau (Hamburg (Deutschland)) und *Candidatus Nitrospira bockiana* (LEBEDEVA et al., 2008), welcher aus dem Heizungssystem in Moskau (Russland) angereichert worden ist.

### 1.3.2 Stoffwechsel und Zellmorphologie Nitrit-oxidierender Bakterien

Nitrit-oxidierende Bakterien sind Gram-negativ und besitzen überwiegend eine chemolithoautotrophe Lebensweise. Sie gewinnen ihre Energie aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat, die chemische Grundlage hierfür wird in nachfolgender Formel beschrieben (BOCK & WAGNER, 2006).



Die Energieausbeuten der nitrifizierenden Bakterien sind bei der Oxidation von Ammoniak zu Nitrit ( $\Delta G_o' = -275 \text{ kJ/mol N}$ ) und der Oxidation von Nitrit zu Nitrat ( $\Delta G_o' = -74 \text{ kJ/mol N}$ ) sehr gering (THAUER et al., 1977).

Bei den meisten aeroben Bakterien läuft die CO<sub>2</sub>-Fixierung über den Calvin-Benson-Zyklus ab (HARMS et al., 1981), welche als Energiequelle das gebildete ATP verwenden. Alternativ können einige autotrophe Mikroorganismen das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase zur Fixierung von CO<sub>2</sub> nutzen (TAKAHASHI et al., 1993). Für Organismen der Gattung *Nitrobacter* wurde die genetische Codierung des Calvin-Benson-Zyklus nachgewiesen (STRECKER et al., 1994; BOCK & WAGNER, 2006), ob dies auch für andere NOB gilt, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Die Elektronen werden für die Nitritoxidation in die Elektronentransportkette eingeschleust und der Elektronenfluss baut eine protonenmotorische Kraft auf, die zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Hierbei liegen die Redoxpotentiale mit +420 mV auf einem relativ hohen Niveau, was dazu führt, dass die nitrifizierenden Bakterien erst in einem späten Schritt die Elektronen in ihre Elektronentransportkette einschleusen können. Dies begrenzt die nutzbare Energie, also die ATP-Menge, die durch die Elektronenpaare erzeugt werden kann. Für die autotrophe CO<sub>2</sub> Fixierung benötigen chemolithoautotrophe Organismen NAD(P)H, welches nur über einen rückläufigen Elektronentransport aus reduzierten Chinonen oder Cytochromen unter Beteiligung der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase und des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplexes gewonnen werden kann. Dieser energieaufwendige Prozess ist mit verantwortlich für die geringen Zellzahlen und das langsame Wachstum. Hinzu kommt, dass für die CO<sub>2</sub> Fixierung pro CO<sub>2</sub> nicht nur 2 NAD(P)H, sondern zusätzlich 3 ATP benötigt werden. Die Potentiale der anorganischen Elektronendonatoren (z. B. Nitrit) sind viel positiver als das von NAD(P)H. Deshalb werden die Elektronen aus diesen Verbindungen erst auf der Ebene der Chinone oder des Cytochroms c in die Atmungskette eingeschleust. Die Versorgung mit NAD(P)H für Biosynthesen stellt bei diesen Organismen ein energetisches Problem dar, welches durch den Prozess des rückläufigen Elektronentransportes gelöst wird. Die Übertragung der Elektronen erfolgt vom Cytochrom c auf den Chinonpool, bzw. wird vom Chinol auf NAD(P)<sup>+</sup> katalysiert, was durch das Einströmen von Protonen über die Membran angetrieben wird. Der dafür notwendige Protonengradient stammt aus der Oxidation des anorganischen Elektronendonators. Bei nitrifizierenden

Bakterien wird pro Reaktionszyklus weniger Energie konserviert als für den rückläufigen Elektronentransport zum NAD(P)H benötigt wird. Daher setzen die chemolithoautotrophen Organismen viel Substrat um, damit das notwendige Membranpotential aufrechterhalten werden kann. Die Wachstumsraten sind allerdings wegen des hohen Energieaufwandes für den rückläufigen Elektronentransport gering. Es werden ca. 80 % der gebildeten Energie für die Fixierung des CO<sub>2</sub> verbraucht (SPIECK & BOCK, 2005). Für Spezies der Gattung *Nitrobacter* konnten Generationszeiten für von 8 - 10 Stunden ermittelt werden, während diese für *Nitrospira moscoviensis* 12 Stunden betragen und für *Nitrospira marina* wurden Generationszeiten von 90 Stunden beschrieben (BOCK et al., 1990; BOCK et al., 1991; EHRICH et al., 1995; WATSON et al., 1986).

Die Oxidation von Nitrit zu Nitrat verläuft bei Nitrit-oxidierenden Bakterien über das Schlüsselenzym Nitritoxidoreduktase (NXR) (ALEEM et al., 1965; KUMAR et al., 1983). Für die Gattung *Nitrobacter* wurde beschrieben, dass über Molybdopterin, dem Cofaktor der NXR, die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen in die Atmungskette eingeschleust werden (FUKUOKA et al., 1987; MEINCKE et al., 1992). Die Elektronenübertragung erfolgt über die Cytochrome a<sub>1</sub>, c<sub>550</sub> und aa<sub>3</sub> auf molekularen Sauerstoff. Die Reaktion ist thermodynamisch ungünstig, da der Transport der Elektronen bis zum Cytochrom c<sub>550</sub> entgegen des Redoxgefälles verläuft. Unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen katalysiert die NXR die Reduktion von Nitrat, welches dann alternativ zum Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor der Atmung dient (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984). Des Weiteren ist eine dissimilatorische Nitritreduktase nachgewiesen worden, welche unter diesen Sauerstofflimitierenden Bedingungen Nitrit zu Stickoxid reduziert (AHLERS et al., 1990). So können Energieäquivalente auch unter anaeroben Bedingungen entstehen. Derzeit ist noch nicht bekannt, ob auch andere NOB die Fähigkeit zur Nitratreduktion besitzen.

Beim Organismus *Nitrobacter* handelt sich um pleomorphe Kurzstäbchen mit polar angeordneten intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) (WATSON et al., 1989). Der Organismus *Nitrococcus* hat kokkoide Zellstrukturen, mit einem charakteristischen tubulären ICMs (WATSON und WATERBURY, 1971b). Die Zellmorphologie der Gattung *Nitrospina* weist lange Stäbchen auf, in denen keine

ICMs nachgewiesen wurden (TESKE et al., 1994). Beim Taxon *Nitrotoga* handelt sich um Kurzstäbchen mit stark vergrößertem Periplasma, ICMs waren nicht nachweisbar (ALAWI et al., 2007). Zellmorphologisch handelt es sich bei *Nitrospira* um spiralförmige Zellen, welche kein ICMs aufweisen (EHRICH et al., 1995). Somit können nach heutigen Kenntnissen Nitrit-oxidierende Bakterien in zwei Gruppen eingeteilt werden, die erste Gruppe beschreibt *Nitrobacter* und *Nitrococcus*, welche ICMs aufweisen. Das Schlüsselenzym für die Nitritoxidation, die Nitritoxidoreduktase (NXR), befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Hierzu ist durch STARKENBURG et al. (2008b) ein mutmaßliches Nitrit/Nitrat Antiport System im *Nitrobacter*-Genom nachgewiesen worden. In die zweite Gruppe gehören *Nitrospina*, *Nitrotoga* und *Nitrospira*, welche keine ICMs aufweisen. Die NXR ist hier auf der periplasmatischen Seite der Membran lokalisiert (SPIECK und BOCK, 2005) und es sind keine Transportmechanismen notwendig (LÜCKER et al., 2010). Weiter können Gattungen wie *Nitrospira* und *Nitrobacter* physiologisch und biochemisch in verschiedene Klassen eingeteilt werden. SCHRAMM et al. (1999) wies *Nitrospira* und *Nitrobacter* nach der r/K-Hypothese verschiedene Strategien zu. Während *Nitrobacter* aufgrund seiner Fähigkeit des schnellen Wachstums und seiner hohen Toleranz gegenüber hohen Nitrit- und Sauerstoffkonzentrationen als r-Strategie klassifiziert wurde, ordnete diese Studie der Gattung *Nitrospira*, mit geringen Wachstumsraten und einer größeren Affinität zu geringen Sauerstoff- und Nitritkonzentrationen, die K-Strategie zu. Die r/K-Hypothese ist in weiteren Studien durch Analysen verschiedener Bioreaktoren getestet und bestätigt worden (KIM & KIM, 2006; NOGUEIRA & MELO, 2006). In Biofiltersystemen von Aquarien und marinen Aquakulturanlagen konnte die Hypothese der r/K-Strategien der Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* nicht bestätigt werden. In diesen Biofiltersystemen, die teilweise hohe Sauerstoff- und Nitritkonzentrationen aufweisen, wurde *Nitrospira* als dominierende Gattung identifiziert (HOVANEC et al., 1998; TAL et al., 2003; SUGITA et al., 2005; FOESEL et al., 2007; ITOI et al., 2007; KEUTER et al., eingereicht).

### 1.3.3 Gattung *Nitrospira*

Die Anreicherung und Isolierung von Arten der Gattung *Nitrospira* ist eine zeitintensive Prozedur. Daher konnte nur in wenigen bereits publizierten Arbeiten (WATSON et al., 1986; EHRICH et al., 1995; LEBEDEVA et al., 2011) eine erfolgreiche Anreicherung und Isolierung von *Nitrospira* beschrieben werden. Des Weiteren ist es nach den Regeln der Typ-Stammbeschreibungen, die voraussetzt, dass der Organismus in zwei öffentlich zugänglichen Stammsammlungen hinterlegt sein muss, nicht möglich Organismen der Gattung *Nitrospira* als solche zu klassifizieren (ICSP, 2008). Dieser Umstand verhindert die endgültige Beschreibung der Organismen dieser Gattung, obwohl diese in der Umwelt weit verbreitet sind und in den unterschiedlichsten Habitaten mit molekularbiologischen *in situ* Methoden nachgewiesen werden konnten (ABELIOVICH, 2006). *Nitrospira* wurde in sehr unterschiedlichen Ökosystemen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und über Sequenzen der 16S rRNA Organismen ermittelt (FOESEL et al., 2007; PARK & NOGUERA, 2008; WEBSTER et al., 2009). Unterschiedliche Studien in marinen und terrestrischen Habitaten bestätigten das weit verbreitete Vorkommen der Gattung *Nitrospira*. So konnte *Nitrospira* in marinen Systemen, wie zum Beispiel in Symbiose mit marinen Schwämmen (WEBSTER et al., 2009), in Tiefseeproben aus dem mittelatlantischen Rücken (LOPEZ-GARCIA et al., 2003) und in Biofilmen aus marinen Aquakulturanlagen (FOESEL et al., 2007; KEUTER et al., eingereicht) identifiziert werden. Weiter wurden Organismen, die zu dieser Gattung gehören, in Kläranlagen (MAIXNER et al. 2006; SPIECK et al. 2006) und in geothermalen Systemen (KANOKRATANA et al., 2004; HIRAYAMA et al., 2005; WEIDLER et al., 2007) detektiert. DAIMS et al. (2001) zeigte, dass sich die Gattung *Nitrospira* in mindestens vier Untergruppen einteilen lässt. Diese Studien belegen das ubiquitäre Vorkommen der Gattung *Nitrospira* in marinen und terrestrischen Ökosystemen. Zudem sind diese Organismen an sehr unterschiedliche Temperaturen angepasst, so konnte in heißen Quellen eine Temperaturtoleranz von bis zu 60°C für *Nitrospira* ermittelt werden (LEBEDEVA et al., 2005; LEBEDEVA et al., 2011). Zusätzlich ist die Toleranz gegenüber hohen Substratkonzentrationen von KEUTER et al. (eingereicht) beschrieben worden. Hierbei handelt sich um einen *Nitrospira* aus dem Biofilter einer marinen Aquakulturanlage. Dieser Vertreter

weist eine hohe Ähnlichkeit in der 16S rRNA Sequenz von 98,8 % zu *Nitrospira marina* auf und kann Substratkonzentrationen von 30 mM Nitrit, 80 mM Nitrat und 50 mM Ammonium tolerieren. Diese Ergebnisse geben Anhaltspunkte auf die zentrale Funktion von *Nitrospira* im globalen Stickstoffkreislauf.

Eine chemotaxonomische Besonderheit der Gattung *Nitrospira* sind die drei spezifische Hauptfettsäuren 16:1 *cis* 7, 16:1 *cis* 11 und 16:0 11 methyl. Diese spezifischen Hauptkomponenten konnten bei unterschiedlichen Arten, sowie in Anreicherungen dieser Gattung in verschiedenen Konstellationen detektiert werden. Für *Nitrospira marina* Nb-295 wurden die Hauptfettsäuren 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11 nachgewiesen, hingegen besitzt *Nitrospira moscoviensis* M-1 die Fettsäure 16:1 *cis* 11 in Kombination mit der Fettsäure 16:0 11 methyl (LIPSKI et al., 2001). Für *Candidatus Nitrospira defluvii* ist die Fettsäure 16:1 *cis* 11 als alleinige spezifische Hauptkomponente gezeigt worden (SPIECK et al., 2006).

Die erste Genomanalyse dieser Spezies erfolgte mit *Candidatus Nitrospira defluvii* und ist von MAIXNER et al. (2008) durchgeführt worden. In dieser Studie konnte das Gen für die Chloritdismutase nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses detoxifizierenden Enzyms wird die Chlorkomponente Chlorit ( $\text{ClO}_2^-$ ) zu  $\text{Cl}^-$  und  $\text{O}_2$  abgebaut. *Nitrospira* war somit der erste nitrifizierende Organismus, welcher eine aktive Chloritdismutase aufweist. Diese Untersuchungen implizieren die Annahme, dass *Candidatus Nitrospira defluvii* in die Abbauprozesse von Chlor-Komponenten wie Chlorit und Perchlorat involviert ist.

### 1.4 Untersuchungsgebiete

Um die natürliche Selbstreinigung von Ökosystemen nicht zu überlasten, wird die Kohlenstoff- und Stickstofffracht aus Abwässern biologisch in kommunalen Kläranlagen, oder auch in Biofiltersystemen mariner Aquakulturanlagen abgebaut. Während das Abwasser aus Fischfarmen direkt in das Biofiltersystem eingeleitet werden kann, muss bei der kommunalen Kläranlage eine mechanische und chemische Abtrennung von Störstoffen vorgeschaltet werden. Diese ist notwendig, um eine hohe Effizienz der biologischen Abbauprozesse gewährleisten zu können.

### 1.4.1 Kläranlage des Klärwerkverbundes in Hamburg

Der Klärwerksverbund in Hamburg setzt sich aus den Anlagen zur mechanischen Abwasserreinigung und der zentralen Schlammbehandlung in Köhlbrandhöft und der biologischen Abwasserreinigung in Dradenau zusammen. Es werden hier durchschnittlich 150 Millionen Kubikmeter Abwasser im Jahr gereinigt, welche von 2,9 Millionen Einwohnerwerten verursacht worden sind. Die Einwohnerwerte setzen sich aus der Anzahl der angeschlossenen Haushalte und der Belastung aus Industrie und Gewerbe zusammen. Die Anlagen in Köhlbrandhöft sind mit den Anlagen in Dradenau durch eine, die Elbe unterquerende, Leitung verbunden. Diese 2,3 km lange Leitung wird als Düker bezeichnet (HAMBURG WASSER, 2010).

#### 1.4.1.1 Abwasserbehandlungen im kommunalen Klärwerk

Während der mechanischen Abwasserreinigung findet die erste Reinigungsstufe statt. Grobstoffe werden in der Rechenanlage abgetrennt, der mitgeführte Sand verbleibt im Sandfang. Im Vorklärbecken erfolgt die Entfernung der abgesetzten oder aufschwimmenden Feststoffe. Der Schlamm, der im Vorklärbecken entsteht, wird in die zentrale Schlammbehandlung geleitet. Hier finden eine Eindickung des Schlammes und die darauf folgende Beförderung in die Faulbehälter statt. Anschließend erfolgen die Trocknung des ausgefaulten Schlammes und die Überführung in die thermische Verwertung.

Dem Abwasser aus dem Vorklärbecken wird vor der biologischen Reinigungsstufe Eisensalz zur chemischen Phosphatfällung zugeführt. Mit den im Abwasser vorhandenen Phosphatsalzen bilden die Eisensalze unlösliche Komplexe. Diese werden später zusammen mit dem Belebtschlamm abgetrennt.

In der zweiten Reinigungsstufe erfolgt die biologische Abwasserreinigung im Belebtschlammverfahren. Die Belebungsanlage des Klärwerkverbundes Hamburg umfasst ca. 124.000 m<sup>3</sup> (Abb. 2). Hier werden die im Abwasser vorhandenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen abgebaut. Über ein Belüftungssystem wird Sauerstoff in die Belebungsbecken eingebracht, um den Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen gewährleisten zu können. Im Abwasser können Gesamtstickstoffbelastungen

(TKN; Total Kjehldahl Nitrogen) von 20 – 80 mg N\*I<sup>-1</sup> wie bei HENZE et al. (1997) beschrieben, sowie bis zu 73 – 92 mg N\*I<sup>-1</sup>, wie bei GALLERT & WINTER (2005) veröffentlicht, ermittelt werden.



**Abbildung 2:** Belebungsbecken des Klärwerkverbundes Köhlbradhöft/Dradenau (Hamburg)

Das gereinigte Abwasser aus kommunalen Kläranlagen mit Einwohnerwerten über 100.000 darf nicht mehr als 10 mg N\*I<sup>-1</sup> an TKN enthalten. Dieser Wert darf überschritten werden, wenn eine Reduktion von  $\geq 70\%$  nachgewiesen werden kann (EUROPÄISCHE UNION, 91/271/EWG). Im Nachklärbecken erfolgt die Abtrennung von Wasser und Belebtschlamm. Der Schlamm wird der zentralen Schlammbehandlung zugeführt und teilweise in das Belebtschlammssystem zurückgeleitet. Das gereinigte Wasser kann darauf folgend in die Elbe eingeleitet werden (HAMBURG WASSER, 2010).

### 1.4.1.2 Belebtschlammverfahren

Die biologische Abwasserreinigung erfolgt im Belebtschlammverfahren. Es handelt sich um suspendierte Biomasse, welche in Form von Schlammaggregaten oder Schlammflocken vorliegen (Abb. 3). Die Mikroorganismen in diesem System besitzen eine sehr hohe Anpassungsfähigkeit an diesen Lebensraum. Sie unterliegen hohen Schwankungen in den Substratkonzentrationen. Des Weiteren müssen diese Organismen fähig sein Temperaturschwankungen von 12 – 21 °C

zu erdulden und sie sollten eine gewisse Toleranz gegenüber den stoßweise ankommenden toxischen Inhaltsstoffen des Abwassers aufweisen. Die Flocken des Belebtschlammes bestehen zu einem Drittel aus mineralischen Komponenten und zu zwei Drittel aus organischen Substanzen. Die makroskopisch sichtbaren Flocken weisen eine unregelmäßige Struktur auf. Die äußeren Schichten sind gut mit Sauerstoff versorgt, während in den tiefer liegenden Schichten in beschränktem Umfang anaerobe Prozesse stattfinden können.



**Abbildung 3:** Probenahme Belebtschlamm aus dem Belebungsbecken in Dradenau (Hamburg)

Für eine unveränderte Populationsdichte der schnell wachsenden heterotrophen Bakteriengemeinschaften reicht die Schlammrückführung, welche zu einer Schlammkonzentration von  $3 - 4,5 \text{ kg m}^{-3}$  im Belebungsbecken führt, aus. Um die Nitrifikation der langsam wachsenden autotrophen Bakteriengemeinschaften gewährleisten zu können, spielt das Schlammalter eine entscheidende Rolle. Das Schlammalter sollte die zwei- bis dreifache Generationszeit der Nitrifikanten, also 7 – 9 Tage nicht unterschreiten (GALLERT und WINTER, 2005).

### 1.4.2 Aquakulturanlagen in Büsum und Strande

Die Untersuchungen der unterschiedlichen marinen Aquakulturanlagen befassen sich mit der Aktivität der autotrophen Bakteriengemeinschaft unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Untersucht wurden die Biofiltersysteme der mit

Nordseewasser betriebenen Anlage in Büsum und der mit Ostseewasser betriebenen Anlage in Strande.

Bei den marinen Fischfarmen in Büsum und Strande handelt es sich um Meerwasser-Rezirkulationsanlagen (RAS (recirculation aquaculture system)). Diese Kreislaufverfahren werden immer häufiger als Alternativen zu den offenen Verfahren (Teiche, Netzkäfige) verwendet. Die Vorteile dieses Verfahrens sind, dass in Kreislaufverfahren bis zu 90 % des Wassers wieder verwendet werden kann (KEUTER et al., 2009). Daher wird die Belastung von natürlichen Ökosystemen, wie der Ost- oder Nordsee, durch die Ausscheidungsprodukte der Fische und durch Futterreste mittels dieser Verfahren deutlich verringert. Gerade gegenüber den offenen Netzkäfigen, welche punktuell ganze Ökosysteme langfristig zerstören, ist die Anzucht von Fischen in geschlossenen Systemen ein großer Vorteil. Weiter handelt es sich bei den marinen Aquakulturanlagen in Büsum und Strande um saisonunabhängige Produktionsstätten.



**Abbildung 4:** HDPE-Füllkörper (high density polyethylen) mit Biofilmbildung (KEUTER et al., 2009)

Die Wasseraufbereitung erfolgt in den untersuchten Biofilteranlagen im Schwebbett-Verfahren (moving-bed). Bei diesem Verfahren werden Füllkörper verwendet, welche schwimmend vorliegen (Abb.4). Durch die einströmende Luft und Wasser werden diese verwirbelt. Die Füllkörper dienen in diesem Verfahren

als Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen. Vor allem die Anheftung von nitrifizierenden Organismen soll gewährleistet werden, damit diese nicht aus dem Filtersystem ausgewaschen werden können. Durch die Verwirbelung kommt es zu hohen Scherkräften und Reibung im Filtersystem. Um genügend Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen zu erhalten, werden Füllkörper mit dreidimensionalen Strukturen verwendet, die eine möglichst große Oberfläche für die Anheftung aufweisen. Um die Organismen vor der Reibung und den Scherkräften zu schützen, weisen diese Strukturen zusätzlich geschützte Bereiche auf (Abb. 4) (KEUTER et al., 2009).

In dieser Studie wurde der Biofilm auf weißen und schwarzen Füllkörpern des Typs „2H-BCN-09“ der Firma GEA 2H Water Technologies (Wettingen, Deutschland) untersucht (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Schwarze und weiße HDPE-Füllkörper (high density polyethylen (Skala in cm)).

Diese Füllkörper weisen eine Gesamtoberfläche von  $836 \text{ m}^2/\text{m}^3$  auf mit einer geschützten Oberfläche von  $494 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Die weißen Füllkörper bestehen aus HDPE (high density polyethylen). Die schwarzen Füllkörper bestehen aus recycelten HDPE, welche mit 3 % Ruß versetzt sind, um die UV-Beständigkeit zu erhöhen (KEUTER et al., 2009).

### 1.4.2.1 Aquakulturanlage Büsum

Die Meerwasser-Rezirkulationsanlage in Büsum (Deutschland) hat eine Produktionskapazität von 100 Jahrestonnen Fisch. Die Anlage wurde mit Nordseewasser betrieben und war in zwei gleichgroße Module (Modul I und Modul II) unterteilt. Jedes Modul hatte 12 Rundbecken mit Durchmessern von 2 bis 7 m und 10 Becken mit einer Grundfläche von 8 x 8 m. In diesen Modulen wurden Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) und Steinbutt (*Psetta maxima*) herangezogen. Die Betriebstemperatur der Anlagen lag bei 15°C – 20°C. Für jedes Modul bestand die Biofilteranlage aus je zwei Tanks mit einem jeweiligen Volumen von 42 m<sup>3</sup>, welche zu etwa 60 % mit schwarzen recycelten HDPE-Füllkörpern befüllt wurden (SPIECK et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde die Biofilteranlage von Modul II untersucht. Diese Anlage stand nur bis 2008 für eine Beprobung zur Verfügung, daher wurden einige Inkubationsansätze nur mit der Anlage in Strande durchgeführt.

### 1.4.2.2 Aquakulturanlage Strande

Die experimentelle Meerwasser-Rezirkulationsanlage in Strande (Deutschland) wurde in zwei verschiedene Bereiche unterteilt, die Shrimp-Anlage und die Barramundi-Anlage. Beide Anlagen wurden mit Brackwasser aus der nahen Ostsee gespeist. Der Wärmebedarf dieser Einheiten wurde über die Abwärme des Faulturms der nahe gelegenen kommunalen Kläranlage gedeckt. Die Shrimp-Anlage bestand aus drei miteinander verbundenen Becken die insgesamt 189 m<sup>3</sup> fassen können. In diesen Becken wurden bei 29°C Garnelen (*Penaeus vannamei*) herangezogen. Die dazugehörige Biofilteranlage hatte ein Volumen von 11,3 m<sup>3</sup> und wurde mit ca. 3 m<sup>3</sup> schwarzen und weißen HDPE-Füllkörpern befüllt. Die Barramundi-Anlage bestand aus vier einzelnen Einheiten die jeweils 2,7 m<sup>3</sup> fassen können. In dieser Anlage wurden Barramundi (*Lates calcarifer*) bei einer Temperatur von 26°C gezüchtet. Die dazugehörigen Biofiltersysteme bestanden aus 10 Tonnen, die mit verschiedenen Füllkörpermaterialien befüllt waren. Das Fassungsvermögen jeder Einheit betrug 0,2 m<sup>3</sup> (SPIECK et al., 2007). In vorliegender Studie wurden die weißen HDPE-Füllkörper aus Tonne 1 und die schwarzen recycelten HDPE-Füllkörper aus Tonne 3 untersucht.

### 1.5 Fettsäureanalytik

#### 1.5.1 Nomenklatur der Fettsäuren

Die Nomenklatur der Fettsäuren wird wie nachfolgend beschrieben in dieser Studie angewandt. Die erste Ziffer gibt die Anzahl der C-Atome an. Dahinter folgen die Informationen zu den Doppelbindungen. Gesättigte Fettsäuren werden mit „0“, einfach ungesättigte Fettsäuren mit „1“ und mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden mit der Anzahl der Doppelbindungen gekennzeichnet. Die Angabe der Positionen der Doppelbindungen erfolgt, indem vom Carboxylende aus gezählt wird. Weiter wird die Konfiguration der Fettsäure mit *cis* oder *trans* angegeben. Methylverzweigungen werden mit dem Zusatz *methyl* angegeben. Eine Methylverzweigung am vorletzten C-Atom wird mit *iso*, eine Methylverzweigung am drittletzten C-Atom wird mit *anteiso* gekennzeichnet. Die Benennung von Cyclopropanstrukturen erfolgt mit dem Zusatz *cyclo*, sowie der Positionsangabe des C-Atoms. Hydroxylgruppen werden mit OH, sowie der Positionsangabe gekennzeichnet (IUPAC-IUB, 1976).

#### 1.5.2 Fettsäuretypen in der Zellmembran bei unterschiedlichen Temperaturen

Das Vorkommen von Fettsäuren ist ubiquitär. Neben ihrer Funktion als Energiespeicher, z. B. in Triglyceriden, dienen sie bei Pflanzen als Schutz vor Austrocknung der Blattoberfläche, wobei sie hier hauptsächlich als Wachsester gebunden vorliegen. Des Weiteren sind Fettsäuren Bestandteil der Zellmembran, zum Beispiel gebunden an Cholin als Phospholipide. Bei den als Phospholipide gebundenen Fettsäuren dominieren Kettenlängen von 14 bis 20 Kohlenstoffatome. Neben gesättigten und ungesättigten (mono oder poly) Fettsäuren mit einer *cis*- oder *trans*-Konfiguration gibt es auch Fettsäuren die Methylverzweigungen, oder Cyclopropanringe aufweisen. Phospholipide ordnen sich mit den Fettsäure-Enden zueinander gerichtet zu einer Doppelschicht an, deren Innenbereich stark hydrophob ist. Die Fettsäureketten werden zusätzlich durch van-der-Waals-Kräfte stabilisiert. Die Phospholipide liegen in der Doppelschicht unter normalen physiologischen Bedingungen in einer lamellaren Phase vor. Durch diese Bedingungen wird die Fluidität und Permeabilität der Zellmembran gesichert und es können Zellfunktionen, wie die freie Beweglichkeit der Proteine gewährleistet

werden. Durch veränderte Bedingungen in der Umwelt, also Stressfaktoren wie veränderte Temperaturen, pH-Werte oder Salzgehalte, wird dieser optimale Zustand gefährdet. Wenn eine Zelle sich diesen Gegebenheiten nicht anpasst, kann dies dazu führen, dass die freie Beweglichkeit der Membranproteine eingeschränkt ist. Dies kann durch die Verringerung der Fluidität, was zur Ausbildung einer gelartigen Phase führt, geschehen (DE MENDOZA & CRONAN JR., 1983). Dadurch kann die Zelle keine Substrate mehr aufnehmen und keinen Energiestoffwechsel betreiben, was zu ihrem Absterben führt (WEBER & DE BONT, 1996). Wenn andererseits die Fluidität bei steigenden Temperaturen nicht verringert wird, kann dies zur Zellyse führen. Zur Gegensteuerung können sich Organismen an veränderte Umweltbedingungen über die Variation ihrer Lipidzusammensetzung anpassen (SINENSKY, 1974).

Phospholipide haben sich als gute Biomarker für Zellen erwiesen. Über unterschiedliche Temperaturen können bevorzugt gebildete Fettsäuretypen in den Zellmembranen charakterisiert werden. Kurzkettige Fettsäuren haben einen niedrigeren Schmelzpunkt als langkettige, bei niedrigen Temperaturen werden daher bevorzugt kurzkettige Fettsäuren synthetisiert (QUINN, 1981). Verzweigte und zyklische Fettsäuren lassen die Membranfluidität ansteigen, da sie nicht so eng gepackt werden können und keine kristallinen Strukturen ausbilden können. Bei niedrigen Temperaturbedingungen werden verzweigte Fettsäuren bevorzugt synthetisiert (RUSSELL und FUKUNAGA, 1990). Die wichtigste Anpassung innerhalb der Fettsäuren zur Erhaltung der Membranfluidität findet sich im Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren wieder. Ungesättigte Fettsäuren, mit *cis*-Konfiguration, werden bei niedrigen Wachstumstemperaturen bevorzugt gebildet (RUSSEL, 1984). Des Weiteren werden ungesättigte Fettsäuren entweder durch die Fettsäure-Synthese, welches den anaeroben Syntheseweg beschreibt, neu gebildet. Oder sie werden nach der Synthese durch die Desaturase, welches den aeroben Syntheseweg beschreibt, synthetisiert.

### 1.5.3 Fettsäuren und stabile Isotope als Marker in Ökosystemen

In der mikrobiellen Ökologie werden Phospholipid-Fettsäureanalysen (PLFA-Analysen) als chemotaxonomische Marker für Ökosystem-Untersuchungen

verwendet. Die PLFA-Extraktion hat gegenüber der Gesamtzell-Fettsäureanalyse den Vorteil, dass eine bessere Detektierbarkeit der bakteriellen Fettsäuren aus komplexen Ökosystemen erreicht werden kann. Durch die Fraktionierung der unterschiedlichen Lipide, werden unter anderem die neutralen Lipide der Eukaryonten, welche zum Beispiel von Pilzen stammen können, abgetrennt und eine genauere Detektion der bakteriellen Fettsäuren ermöglicht (LIPSKI, 2006). Über die PLFA-Analyse untersuchten unter anderem KOHRING et al. (1994) sulfatreduzierende Bakterien, GREEN & SCOW (2000) die mikrobielle Gemeinschaft einer grundwasserführenden Schicht und NYBERG et al. (2006) beschrieben die Ammoniak-oxidierende Bakteriengemeinschaft in landwirtschaftlich genutzten Böden mittels PLFA-Analysen. Allerdings liefert diese Vorgehensweise nur Erkenntnisse über die Anwesenheit verschiedener Organismen. Es können keine Rückschlüsse auf metabolische Aktivitäten geführt werden. Dies wird über die Gabe von Substraten, die mit stabilen Isotopen markiert sind, möglich. Die Substrate gelangen in die stoffwechselaktiven Zellen und geben dadurch Hinweise auf die Stoffwechselaktivitäten verschiedener Organismen. Die Markierung einzelner Fettsäuren kann über die sensitive Quantifizierung mittels GC-C-IRMS (Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnismassenspektrometrie) geführt werden, was von BOSCHKER et al. (1998) für Acetat-assimilierende Sulfatreduzierer erstmals beschrieben wurde. Des Weiteren können Lipide, welche mit stabilen Isotopen markiert worden sind, auch über Quadrupol GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) analysiert werden. Die Analyse über GC-MS ist weniger sensitiv, allerdings ist die GC-MS Analytik in vielen Laboren etabliert. Die Untersuchung der Fettsäuren über GC-MS wurde erstmals von ARAO (1999) für Boden assoziierte Bakterien und Pilze über den Einbau von  $^{13}\text{C}$ -Acetat gezeigt. KNIEF et al. (2003) beschrieb den Einbau von  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat für autotrophe Organismen, welcher über Quadrupol GC-MS gemessen wurde. Diese Untersuchungen, basieren auf Lipiden, welche mit  $^{13}\text{C}$  als stabiles Isotop markiert wurden, und finden für unterschiedliche Organismen Anwendung. Es wurden unter anderem mit  $^{13}\text{C}$ -Isotopen markierte methanoxidierende Organismen von BULL et al. 2000 und CROSSMAN et al. (2005) untersucht. Hier wurden in Bodenproben die dominierenden Mikroorganismen analysiert, welche für die atmosphärische Methan Oxidation verantwortlich sind. Den Effekt von Ammoniumsulfat auf Methan

oxidierende Organismen untersuchten CROSSMAN et al. (2006). Mit  $^{13}\text{C}$ -markierte nitrifizierende Organismen wurden von PEL et al. (1997) analysiert. Hier wurde die Nitrifikation einer methyloptrophen Population im organischen Material aus Kompost beschrieben. Eine autotrophe nitrifizierende Bakterienpopulation war in diesem Habitat nicht nachweisbar. Eine Markierung kann auch durch andere Isotope erfolgen, die unterschiedlichen Kombinationen hierzu wurden bei BOSCHKER & MIDDELBERG (2002) beschrieben. Hier wurden Markierungsstudien unter anderem für Biomarker, wie Phospholipide, Sterole oder Etherlipide durchgeführt, welche mit stabilen Kohlenstoff- oder Stickstoff-Isotopen versetzt wurden. Des Weiteren können mit stabilen Isotopen markierte Organismen auch phylogenetisch über die DNA analysiert werden, wie bei RADAJEWSKI et al. (2000) für methyloptrophe Bakterien beschrieben wurde.

### **1.6 Charakterisierung autotropher Organismen**

Um die Bakteriengruppe der Nitrit-oxidierenden Bakterien zu charakterisieren sollen für den chemotaxonomischen Ansatz Fettsäureprofile erstellt werden. Über den Einbau von stabilen Isotopen in die Lipide stoffwechselaktiver Zellen sollen Rückschlüsse auf die Zellaktivität geführt werden. Hierzu wird der  $^{13}\text{C}$ -Einbau in die Fettsäuren der stoffwechselaktiven autotrophen Bakteriengemeinschaft untersucht. Die unter 1.4 beschriebenen Habitate werden in dieser Studie näher betrachtet. Die Untersuchungen sollen mit Proben aus der kommunalen Kläranlage und für Proben aus marinen Fischfarmen durchgeführt werden. Die Untersuchungen des Belebtschlammes der kommunalen Kläranlage werden zu unterschiedlichen Jahreszeiten vorgenommen, um die durch die äußeren Umwelteinflüsse bedingten Schwankungen nachweisen zu können. Die Probennahmen zu unterschiedlichen Jahreszeiten sind für das Biofiltermaterial der Aquakulturanlagen nicht notwendig, da diese den Einflüssen der Umwelt, z. B. jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Außentemperaturen, nicht ausgesetzt sind. Die Inkubationen der Proben aus den Habitaten erfolgen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen und bei verschiedenen Temperaturen, damit eine eventuelle Nischenbildung unterschiedlicher Organismen in den Ökosystemen nachgewiesen werden kann. Diese chemotaxonomischen Analysen sollen zudem durch die Charakterisierung der Gattung *Nitrospira* mittels

Sequenzanalysen der 16S rRNA und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung vervollständigt werden.

### 1.6.1 Charakterisierung über Gesamtfettsäureprofile und FAME-SIP

Die Hauptfettsäuregruppen der bekannten Nitrit-oxidierenden Mikroorganismen *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrotoga* und *Nitrospira* können wie folgt zusammengefasst werden (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Hauptfettsäuren in (%) der bekannten Nitrit-oxidierenden Bakterien

	14:0	16:1 cis 7	16:1 cis 9	16:1 cis 11	16:0	16:0 11 methyl	18:1 cis 11
<i>Nitrobacter alcalicus</i> AN4 <sup>1</sup>			1		11		85
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14 <sup>1</sup>	1		1		9		86
<i>Nitrobacter vulgaris</i> Z <sup>1</sup>			1		15		83
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Engel <sup>1</sup>	1		1		11		83
<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> <sup>3a</sup>	2-3	0-1	25-47	0-1	22-26		4-5
<i>Nitrococcus mobilis</i> 231 <sup>1</sup>	1		25		26		43
<i>Nitrospina gracilis</i> 3 <sup>1</sup>	32		50		7		0-1
<i>Nitrospira moscoviensis</i> M-1 <sup>1</sup>	1	6		37	20	34	1
<i>Nitrospira marina</i> Nb-295 <sup>1</sup>	2	31		16	37	1	1
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> <sup>2</sup>	8	3	2	43	16		6
<i>Candidatus Nitrospira bockiana</i> <sup>1b</sup>	3	18-19	1-2		50-52	21-22	0-1

<sup>1</sup>LIPSKI et al., (2001)

<sup>2</sup>SPIECK et al., (2006)

<sup>3</sup>ALAWI et al., (2007)

<sup>a</sup>Prozentanteile an Gesamtfettsäuren bei Temperaturen von 4°C, 10°C und 17°C

<sup>b</sup>Prozentanteile an Gesamtfettsäuren der Anreicherungen Ns42 und Ns47

Die Hauptkomponenten für die Gattung *Nitrospina* sind die Fettsäure 14:0 in Kombination mit der Fettsäure 16:1 *cis* 9. Die Gattung *Nitrococcus* hat als Hauptfettsäuren das Lipid 16:1 *cis* 9 in Kombination mit dem Lipid 18:1 *cis* 11. Die Gattung *Nitrobacter* besitzt die Hauptfettsäure 18:1 *cis* 11 (LIPSKI et al., 2001). *Candidatus Nitrotoga arctica* hat die Hauptfettsäure 16:1 *cis* 9, dieser Organismus

enthält zusätzlich noch die Lipide 10:0 3OH, 12:0 3OH, 14:0 2OH, mit einem Prozentanteil von 3 – 7 % (ALAWI et al., 2007). Die Gattung *Nitrospira* verfügt über spezifische Hauptkomponenten und weist die Fettsäure 16:1 *cis* 7, die Fettsäure 16:1 *cis* 11 und die Fettsäure 16:0 11 methyl auf (LIPSKI et al., 2001; SPIECK et al., 2006; LEBEDEVA et al., 2011). Die spezifischen Hauptkomponenten von *Nitrospira* konnten in den bisher bekannten Stämmen und Anreicherungen in verschiedenen Kombinationen detektiert werden. Die Fettsäure 16:0 wurde für die in Tabelle 1 aufgelisteten Organismen mit einem Prozentanteil von 7 bis zu 57 % identifiziert.

Diese Fettsäureinformationen sollen genutzt werden, um eine Charakterisierung der Organismen aus Anreicherungen vorzunehmen. Vor allem Organismen der Gattung *Nitrotoga*, mit der Hauptfettsäure 16:1 *cis* 9 in Kombination mit den Hydroxy-Komponenten und die Organismen der Gattung *Nitrospira* mit den spezifischen Hauptfettsäuren, lassen sich in Anreicherungen sehr gut abgrenzen. In den Untersuchungsgebieten der kommunalen Kläranlage und der marinen Aquakulturanlagen soll die Fettsäureidentifizierung mit einer Markierung durch Isotopenmarkiertes CO<sub>2</sub> (<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) kombiniert werden. Die Proben werden den Ökosystemen entnommen und einige Zeit mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> inkubiert, hierzu sollen unterschiedliche Parameter für Temperatur und Nitritkonzentration gewählt werden. Die autotrophen Bakterien assimilieren das CO<sub>2</sub> und der Einbau von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in die Fettsäuren lässt Rückschlüsse auf die aktive autotrophe Bakteriengemeinschaft in den untersuchten Habitaten zu. Diese Kombination aus Identifizierung der Fettsäuren über Fettsäuremethylester (FAME) und die Markierung mit stabilen Isotopen (SIP), wurde von KNIEF et al. (2003) etabliert. FAME-SIP ist eine kultivierungsunabhängige Methode. Diese Methode zeigt über die unterschiedlichen Kombinationen der Hauptfettsäuren, der autotrophen Nitritoxidanten, die Stoffwechselaktivität einzelner Gattungen an. Infolgedessen werden Rückschlüsse auf die aktive Bakterienpopulation und Hinweise auf die dominierenden Gattungen in den Ökosystemen möglich.

### 1.6.2 Charakterisierung über 16S rRNA-Analysen

Um die Ergebnisse der Fettsäureanalysen zu bestätigen werden die Organismen der Gattung *Nitrospira* im molekularbiologischen Ansatz auf 16S rRNA Ebene verifiziert.

Hierzu soll aus Proben, welche eine besonders hohe  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung der *Nitrospira*-spezifischen Hauptkomponenten aufweisen, DNA extrahiert werden. Gefolgt von einer Klonierung der 16S rRNA-Gene und einer Sequenzierung mit *Nitrospira*-spezifischen Primern. Dadurch wird die weiterführende Identifizierung dieser Organismen auf 16S rRNA-Ebene möglich, welche über eine weitere *in situ* Charakterisierung von *Nitrospira* auf 16S rRNA-Ebene vervollständigt werden soll. Der direkte Nachweis von Organismen der Gattung *Nitrospira* wird über den Einsatz von spezifischen Oligonukleotidsonden und der Detektion mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erfolgen.

### 1.7 Dominierende Nitritoxidanten in Biofiltersystemen

Zum Schutz von natürlichen Gewässern und gegen eine Überlastung dieser Ökosysteme, werden Systeme verwendet, die eine biologische Abwasserreinigung ermöglichen. Durch Untersuchungen der metabolischen Zellaktivität und die Bestimmung der Wachstumsparameter autotropher Organismen können wichtige erforderliche Parameter für Abwassertechnologien verifiziert werden, die zu der kontinuierlichen Leistungsfähigkeit der Biofiltersysteme in den Anlagen beitragen. Mikrobiologische Untersuchungen, welche sich wie in vorliegender Studie mit der Charakterisierung der in den Systemen dominierenden Bakteriengemeinschaften beschäftigen, liefern wichtige Anhaltspunkte für die Prozesse in der ökologischen Wasserreinigung.

#### 1.7.1 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung der dominierenden Nitrit-oxidierenden Arten im Biofiltersystem des Klärwerkverbundes Hamburg und in den Biofiltersystemen der marinen Aquakulturanlagen Büsum und Strande. Diese Organismen sind für einen entscheidenden Schritt der Nitrifikation

verantwortlich und verhindern im aeroben Bereich eine Akkumulation des für die meisten Organismen toxischen Nitrits. Im Mittelpunkt dieser Studie steht die Gattung *Nitrospira*, in vorangegangenen Arbeiten (ABELIOVICH, 2006) konnte das ubiquitäre Vorkommen dieser Gattung nachgewiesen werden. Die vorliegende Studie soll nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die metabolische Zellaktivität der dominierenden Arten und somit die Relevanz dieser Organismen in den untersuchten Systemen aufklären. Die spezifischen Fettsäurehauptkomponenten dieser Organismen sind dazu sehr gut geeignet, denn hierüber kann die Gattung *Nitrospira* eindeutig von anderen Organismen abgegrenzt werden. Die zentralen Untersuchungen dieser Studie beschäftigen sich mit diesen chemotaxonomischen Parametern. Hierzu werden Analysen durchgeführt, welche über die Assimilierung von  $^{13}\text{CO}_2$  in Form von stabilen Isotopen geführt werden. Diese Untersuchungen sollen die ökologischen Nischen der verschiedenen Nitrit-oxidierenden Bakterien aufzeigen, um Kenntnisse über die dominierenden Arten in den Biofiltersystemen zu erhalten. Diese Erkenntnisse sollen nachfolgend mit den molekularbiologischen Untersuchungen über die 16S rRNA Genanalysen verifiziert werden. Die Sequenzanalysen werden mit spezifischen Primern durchgeführt. Des Weiteren sollen spezifische Oligonukleotidsonden die Detektion der Gattung *Nitrospira* direkt im Ökosystem ermöglichen. Über verschiedene gewählte Temperaturen und Nitritkonzentrationen während der Inkubationen sollen die ökologischen Nischen der Habitate simuliert werden. Die dominierenden Nitrit-oxidierenden Arten in den Systemen sollen charakterisiert und deren Leistungsfähigkeit im Biofiltersystem erfasst werden.

## 2. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen, sofern nicht zusätzlich angegeben, von den Firmen SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) und MERCK KGaA (Darmstadt).

### 2.1 Herkunft und Kultivierung der Mikroorganismen

#### 2.1.1 Herkunft und Probenahmestandorte

Die Umweltproben sind aus dem Belebungsbecken in Dradenau der Kläranlage des Klärwerkverbundes Hamburg (Deutschland) entnommen worden. Weitere Untersuchungen erfolgten mit Proben aus den Biofiltersystemen der marinen Aquakulturanlagen in Strande und Büsum (Deutschland).

Die Belebtschlammproben wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten genommen, hierbei variierten die Temperaturen an den Probenahmetagen in den Original-Belebtschlammproben zwischen 14°C und 20°C. Für das Jahr 2008 wies der Zulauf des Abwassers einen Gesamtstickstoffgehalt von ca. 70 mg N·l<sup>-1</sup> TKN (Total Kjeldahl Nitrogen) auf, dieser konnte auf ca. 15 mg N·l<sup>-1</sup> TKN im Ablauf reduziert werden. Es handelt sich um eine Reduktion von 78 % (HAMBURG WASSER, 2010; Kommunales Abwasser, Lagebericht 2008).

Die Biofilterproben stammen aus den marinen Fischfarmen in Strande und Büsum. Die Originaltemperatur der Fischfarm in Büsum beträgt 17°C. In der Fischfarm in Strande betragen die Originaltemperaturen 26°C für Proben aus dem Biofilter der Barramundi-Becken und 29°C für Proben aus dem Shrimp-Becken.

Die ursprüngliche Herkunft der für diese Studie wichtigen Kulturen und Anreicherungen für die Gesamtzell-Fettsäureanalysen, ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die Reinkulturen von *Nitrospira moscoviensis* M-1, *Nitrospira marina* Nb 295, *Nitrospira calida* Ns10 und viele der Anreicherungen konnten von der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Biozentrums Klein Flottbek der Universität Hamburg (Deutschland) zur Verfügung gestellt werden. Die Probe EP\_NL wurde von der Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Radboud Universität in Nijmegen (Niederlande) angereichert.

**Tabelle 2:** Herkunft der Stämme und Anreicherungen für Gesamtzell-Fettsäureanalyse

Stamm/ Anreicherung	Herkunft
<i>Ns. moscoviensis</i> M-1	Heizungssystem von Moskau (Russland)
<i>Candidatus Ns. bockiana</i>	Heizungssystem von Moskau (Russland)
<i>Ns. calida</i> Ns10	Heiße Quelle Gorjachinsk, Baikal Zone (Russland)
Anreicherung „Ga II“	Heiße Quelle Gorjachinsk, Baikal Zone (Russland)
<i>Ns. marina</i> Nb-295	Oberflächenwasser Golf von Maine (USA)
Anreicherung „Ecomares 2.1“	Marine Fischfarm Büsum (Deutschland)
Anreicherung „Sh“ (schwarze FK)	Marine Fischfarm Strande (Deutschland)
Anreicherung „Sh“ (weiße FK)	Marine Fischfarm Strande (Deutschland)
Anreicherung „EP_NL“	Mariner Bioreaktor (Niederlande)
Anreicherung „Shelly“	Bioreaktor mit einem pH-Wert von 3,8 (± 0,3) (Israel)
<i>Candidatus Ns. defluvii</i>	Kläranlage Klärwerkverbund Hamburg (Deutschland)
Anreicherung „Ham-1“	Kläranlage Klärwerkverbund Hamburg (Deutschland)
Anreicherung „MAK 207.5“	Mamotovy Klyk (Sibirien)
Anreicherung „S11“	Permafrostgebiet, Laptevsee (Sibirien)
Anreicherung „MOV II 9“	Movile Höhle (Rumänien)

Die Herkunft und Inkubationsbedingungen der Dauerkulturen und Anreicherungen aus den Markierungsversuchen der Umweltproben aus Belebtschlamm und aus dem Biofiltersystem der marinen Fischfarm Strande sind in Tabelle 3 dargestellt.

## Material und Methoden

**Tabelle 3:** Dauerkulturen und Anreicherungen aus Umweltproben („≈“ Kennzeichnung marine Kulturen)

Kulturname	Herkunft	Inkubationstemp. (°C)	Nitritkonz. (mM)
„BS_17“	Belebtschlamm	17	0,5
„BS_22“	Belebtschlamm	22	0,5
„BS_28“	Belebtschlamm	28	30
<i>Candidatus</i> Ns. defluvii	Anreicherung Universität Hamburg	28	0,5
„Ham-1“	Anreicherung Universität Hamburg	10	0,5
<i>Ns. moscoviensis</i> M-1	Stammsammlung Universität Hamburg	37	0,5
<i>Ns. marina</i> Nb-295 ≈	Stammsammlung Universität Hamburg	28	0,5
„BW_17“ ≈	Fischfarm Strande	17	2,5
„BW_28“ ≈	Fischfarm Strande	28	2,5
„BB_17“ ≈	Fischfarm Strande	17	2,5
„BB_28“ ≈	Fischfarm Strande	28	2,5
„SH_17“ ≈	Fischfarm Strande	17	2,5
„SH_28“ ≈	Fischfarm Strande	28	2,5
„Shelly“	Anreicherung Universität Hamburg	28	0,5
<i>Nitrobacter vulgaris</i> AB1	Stammsammlung Universität Hamburg	28	1,5

### 2.1.2 Kultivierung von autotrophen Mikroorganismen

Die Kultivierung der Reinkulturen und Anreicherungen erfolgte über die Verwendung eines Mineralmediums. Des Weiteren sind einige Inkubationen der Markierungsversuche in Mineralmedium durchgeführt worden. Das marine Mineralmedium konnte nach WATSON et al. (1986) eingesetzt werden, das terrestrische Mineralmedium wurde nach EHRICH et al. (1995) angefertigt. Tabelle 4 zeigt die genutzten Medien für terrestrische und marine Organismen.

## Material und Methoden

**Tabelle 4:** Mineralmedium für Nitritoxidanten

<b>Mineralmedium</b>			
<b>Terrestrisches Mineralmedium</b>		<b>Marines Mineralmedium</b>	
<b>Stammlösung 10 x</b>		<b>Stammlösung 10 x</b>	
CaCO <sub>3</sub>	0,07 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g
NaCl	5,0 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,017 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	70 % Seewasser	ad 1000 ml
<b>Spurenelementlösung</b>		<b>Spurenelementlösung</b>	
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	0,0338 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0494 g	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,050 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,0431 g	CoCl <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0005 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,0371 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,025 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,973 g	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,006 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 g	bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
in 1000 ml 0,01 N HCl lösen			
<b>Medium</b>		<b>Medium</b>	
NaNO <sub>2</sub>	0,3 – 30 mM	NaNO <sub>2</sub>	0,3 – 30 mM
Spurenelemente	1,0 ml	Spurenelemente	1,0 ml
Stammlösung	100 ml	Stammlösung	100 ml
bidest. H <sub>2</sub> O	900 ml	70 % Seewasser	900 ml
pH 8,6 mit KOH einstellen		pH 6,5 – 7 mit HCl einstellen	

Beim Seewasser für das Medium der marinen Organismen handelt es sich um gefiltertes Nord- bzw. Ostseewasser, welches mit 30 % bidest. H<sub>2</sub>O versetzt wurde. Die Nitritkonzentration der Kulturen wurde regelmäßig geprüft. Die

Bestimmung des Nitritverbrauches in den einzelnen Kulturen erfolgte mit Hilfe eines Tüpfeltests (SCHMIDT und BELSER, 1982). Durch die individuelle Zugabe von steriler Nitritlösung (2,5 molare  $\text{NaNO}_2$ -Lösung) wurde die Ausgangskonzentration wieder eingestellt. Nach mehrwöchiger Inkubation der Anreicherungen und der Dauer-Kulturen sind diese auf frisches Medium überimpft worden. Die Inkubationstemperaturen variierten von  $10^\circ\text{C}$  bis  $46^\circ\text{C}$ , die Nitritkonzentrationen lagen zwischen 0,3 und 30 mM.

### 2.2 Fettsäureanalysen

#### 2.2.1 Gesamtzell-Fettsäurepräparation der Reinkulturen und Anreicherungen

Für Analysen der Gesamtzell-Fettsäuren aus Reinkulturen und Anreicherungen wurde das Zellmaterial für mehrere Wochen in 3 l bzw. 5 l Kolben mit 1,5 l bzw. 4 l Mineralmedium inkubiert und regelmäßig mit Nitrit versorgt. Nach der Inkubation erfolgte das Ernten durch Zentrifugation. Zellen terrestrischen Ursprungs sind mit 0,9 % NaCl-Lösung, Zellen marinen Ursprungs mit 2 % NaCl-Lösung gewaschen worden. Die Zellen wurden bis zur Fettsäure-Präparation bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert (SPIECK et al. 2006). Zellen der Anreicherung „EP\_NL“ wurden direkt aus dem Bioreaktor entnommen und lyophilisiert, für diese Fettsäure-Präparation sind die gefriergetrockneten Zellen eingesetzt worden. Die Fettsäureanalyse der Gesamtzell-Fettsäuren erfolgt über eine Verseifung und saure Methylierung zu Fettsäuremethylestern (FAMES). Die Präparation und Extraktion dieser FAMES wurde nach SASSER (1990) durchgeführt. Die Extrakte sind am GC-FID analysiert worden und die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte mit Hilfe des GC-MSD (siehe 2.2.2.3). Die Auftrennung und Identifizierung wurden, wie bei LIPSKI und ALTENDORF (1997) und LIPSKI et al. (2001) beschrieben, durchgeführt (siehe hierzu auch 2.2.2.4.1).

Für die Probe „EP\_NL“ ist eine DMDS-Derivatisierung zur Bestimmung der Position von einfach ungesättigten Fettsäuren, wie bei NICHOLS et al. (1986) beschrieben, durchgeführt worden. Die Analyse der derivatisierten FAMES erfolgte mit Hilfe des GC-MSD (siehe 2.2.2.3).

### 2.2.2 Markierungsexperimente von Biofiltermaterial über FAME-SIP

#### 2.2.2.1 Inkubationsbedingungen der Biofilterproben

Die Inkubation des Probenmaterials aus den Biofiltern wurde in einem gasdichten 500 ml Kolben, mit einer Teflondichtung und Septum im Schraubdeckelverschluss, durchgeführt. Hierzu ist das Probenmaterial mit markiertem Bicarbonat ( $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ , Endkonzentration 20 mM (Cambridge Isotope Laboratories Inc. (USA))) versetzt und unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen und Nitritkonzentrationen inkubiert worden. Der Nitritverbrauch wurde mit Hilfe des Tüpfeltests bestimmt (SCHMIDT und BELSER, 1982). Hierzu erfolgte die Entnahme von Proben über das Septum mit einer Einmalspritze. Bei Bedarf wurde die Ausgangskonzentration mit steriler Nitritlösung (2,5 molare  $\text{NaNO}_2$ -Lösung), welche ebenfalls über das Septum verabreicht worden ist, wieder eingestellt. Des Weiteren wurden Gasmessungen durchgeführt, um den Sauerstoffgehalt in den gasdichten Systemen überprüfen zu können. Hierzu erfolgte die regelmäßige Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase der Kolben. 10  $\mu\text{l}$  Gasprobe ist jeweils mit einer gasdichten Spritze, über das Septum entnommen worden und mittels GS-MSD (siehe 2.2.2.3) analysiert. Die markierten Proben wurden bei einem Sauerstoffgehalt von ca. 5 % geerntet.

##### 2.2.2.1.1 Inkubationsbedingungen der Proben aus dem Klärwerkverbund Hamburg

Die Analysen der Belebtschlammproben aus Dradenau (Klärwerkverbund Hamburg) fanden mit Proben vom Sommer 2008 bis Sommer 2009 statt. Für die Experimente sind jeweils mit 100 ml Probenmaterial aus Belebtschlamm eingesetzt worden. Die Inkubationen erfolgten bei Temperaturen von  $4^\circ\text{C}$  –  $32^\circ\text{C}$ , mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM, 3 mM und 30 mM. Die nach den Sauerstoffkonzentrationen gerichteten Inkubationszeiten lagen zwischen 19 und 60 Tagen. Für die Lipidextraktion wurden 40 ml markierter Belebtschlamm durch Zentrifugation ( $10.000 \times g$ ; 20 min) von der wässrigen Phase getrennt. Das Schlammmaterial des Rückstandes ist in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Teflondichtung im Schraubdeckelverschluss überführt und in die Lipidextraktion eingesetzt worden (siehe 2.2.2.2).

### 2.2.2.1.2 Inkubationsbedingungen der Proben aus marinen Aquakulturanlagen

Für die Markierungsexperimente der marinen Aquakulturanlagen wurden jeweils 100 ml Mineralmedium mit 100 Füllkörpern versetzt und diese bei unterschiedlichen Temperaturen sowie Nitritkonzentrationen inkubiert. Für die Proben aus Büsum ist das marine Mineralmedium mit 70 % gefiltertem Nordseewasser angewendet worden, die Proben aus Strande enthielten 70 % gefiltertes Ostseewasser. Die Inkubationszeiten richteten sich nach dem jeweiligen Sauerstoffgehalt in den Kolben und lagen zwischen 27 und 55 Tagen.

Für den Versuchsansatz aus der Anlage Büsum erfolgte die Inkubation mit Füllkörper-Material aus Modul II. Hierzu wurden die Füllkörper mit jeweils 100 ml marinem Mineralmedium, sowie mit terrestrischem Mineralmedium versetzt. Die Inkubation ist bei einer Nitritkonzentration von 3 mM mit einer Temperatur von 17°C durchgeführt worden.

Für den ersten Versuchsansatz der Anlage in Strande wurde Füllmaterial aus den Biofiltersystemen „Shrimp (gemischte FK)“, „Barramundi (weiße FK)“ und „Barramundi (schwarze FK)“ entnommen und in marinem Mineralmedium mit 3 mM Nitrit bei 26°C inkubiert.

Im zweiten Versuchsansatz der Anlage Strande sind die Füllkörper ebenfalls aus den Biofiltersystemen „Shrimp (gemischte FK)“, „Barramundi (weiße FK)“ und „Barramundi (schwarze FK)“ entnommen worden. Die Inkubation erfolgte in einem marinen Mineralmedium mit Konzentrationen von 0,3 mM, 3 mM und 10 mM Nitrit, bei Temperaturen von 17°C und 28°C.

Für die Lipidextraktion sind die Füllkörper mit dem Medium in 500 ml Schottflaschen gegeben und mit ca. 20 g Glasperlen (2 mm) versetzt worden. Das Biofiltermaterial wurde über Nacht im Horizontalschüttler (400 rpm) von den Füllkörpern getrennt. 40 ml der Biofiltermaterialsuspension sind zentrifugiert (10.000 x g, 20 min) und der wässrige Überstand verworfen worden. Das Biofiltermaterial wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel und Teflondichtung überführt und in die Lipidextraktion (siehe 2.2.2.2) eingesetzt.

### 2.2.2.2 Extraktion der Phospholipidfettsäuren aus Biofiltermaterial

Das erhaltene Biofiltermaterial ist mit 6 ml 50 mM Phosphatpuffer (8,7 g  $K_2HPO_4/l$ , pH 7,4), 18 ml Methanol und 7,5 ml Chloroform versetzt worden. Nach der 2-stündigen Extraktion im Über-Kopf-Schüttler erfolgte die Phasentrennung durch die Zugabe von 7,5 ml Chloroform und 7,5 ml  $H_2O$  (bidest.), welche durch einen Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min) beschleunigt wurde. Die Chloroformphase ist abgenommen, mit  $NaSO_4$  getrocknet und im Rotationsverdampfer auf 1 ml eingeeengt worden. Die Trennung der neutralen, Glyco- und Phospholipide erfolgte über Silicagelsäulen (0,5 g Sorbent und 10 ml Reservoir (Isolute<sup>®</sup>, Biotage, Schweden)). Die Proben wurden auf die mit Chloroform konditionierten Säulen aufgetragen. Anschließend fand die Elution von neutralen Lipiden mit 2 ml Chloroform, von Glycolipiden mit 10 ml Aceton und von Phospholipide mit 10 ml Methanol statt. Die Phospholipidfraktion ist im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und die erhaltenen Lipide in 1 ml Methanol/Toluol (1:1; v/v) gelöst worden. Die Umsetzung der Phospholipidfettsäuren (PLFA) zu FAMES (Fettsäuremethylester) erfolgte durch eine Inkubation für 15 min bei 37°C nach der Zugabe von 1 ml frischer 0,2 N methanolischer KOH (wasserfreies Methanol, 1,12 g/l KOH). Anschließend wurde, zur Neutralisation und Gewinnung der FAMES, 1,9 ml Hexan, 0,3 ml 1 M Essigsäure, 2 ml  $H_2O$  (bidest.) zugefügt. Zusätzlich sind 100 µl eines internen Fettsäuremethylester-Standards (0,005 % 19:0 Methylester in Hexan; entspricht einer Menge von 5 µg 19:0 Methylester) zugegeben worden. Nach 5 minütigem Mischen im Über-Kopf-Schüttler erfolgte eine Zentrifugation (1000 x g, 5 min) zur Unterstützung der Phasentrennung. Die obere Hexan-Phase, welche die FAMES enthält, wurde abgenommen und mittels  $N_2$  auf ca. 10 – 50 µl eingeeengt, in ein GC-Vial überführt und bis zur Analyse am GC/MSD (siehe 2.2.2.3) bei -20°C gelagert (PETERSEN et al., 1994).

### 2.2.2.3 Parameter der Gaschromatographen für die Fettsäureanalysen

Die Gesamtzellfettsäure-Analysen sind am GC/FID und GC/MSD im Scan-Modus zur Identifizierung der FAMES durchgeführt worden. Die Identifizierung der markierten Fettsäuren aus den Umweltproben fand am GC/MSD im Scan-Modus

statt. Zusätzlich erfolgte die Analyse der FAMES im SIM-Modus (siehe auch 2.2.2.4.2) zur Quantifizierung des Markierungsgrades.

Das Injektionsvolumen betrug 1 µl für die Fettsäureanalysen und 10 µl Gas für die Gasanalysen.

Für die Fettsäureanalysen wurde der Gaschromatograph GC 5890 II Plus mit einem massenselektivem Detektor MS 5972 (GC-MSD, Hewlett Packard, Waldbronn) und einer 5 % Phenyl Methyl-Silicon Kapillarsäule (0,25 mm x 30 m) verwendet. Als Trägergas diente Helium 5.0. Die Temperatur des GC/MSD Injektors betrug 250°C, die Säule ist mit 5°C pro Minute von 120°C auf 240°C erhitzt worden. Die Temperatur der Transferleitung vom GC zum MSD betrug 280°C. Die Anfangstemperatur des Ofens lag bei 120°C und die Erhöhung erfolgte nach 30 Sekunden mit 5°C pro Minute auf 240°C. Diese Temperatur wurde für 2 Minuten gehalten. Für die DMDS-Derivatisierung ist die zu erreichende Endtemperatur des Ofens auf 330°C eingestellt und die Transfer Line Temperatur auf 300°C heraufgesetzt worden. Für die Gasmessungen des Sauerstoffes in den gasdichten Kolben betrug die Injektorblock-Temperatur 120°C, die Ofentemperatur betrug 80°C und die GC/MSD Transfer Line Temperatur lag bei 280°C.

Der GC-FID (Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor GC 6890 (Hewlett Packard, Waldbronn)) war mit einer 5 % Phenyl Methyl-Silicon Kapillarsäule (0,25 mm x 30 m)) ausgestattet. Als Trägergas wurde Helium 5.0 eingesetzt, als Brenngas ist Wasserstoff 5.0 verwendet worden. Beim GC-FID betrug die Injektorblocktemperatur 250°C. Die Anfangstemperatur des Ofens lag bei 120°C und ist nach 30 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 5°C pro Minute auf 240°C erhöht und für 2 Minuten gehalten worden. Die Temperatur des Detektors betrug 300°C.

### 2.2.2.4 Auswertungen der Fettsäureprofile

#### 2.2.2.4.1 Identifizierung der FAMES

Die Identifizierung der Fettsäuren verlief über zwei Schritte. Zuerst wurde die Peakbenennung der unbekanntenen Fettsäuren auf der Grundlage der

Retentionszeit des verwendeten Fettsäurestandards (Produkt Nr.: 19298-60500; Agilent, Waldbronn) vorgenommen. Hierzu erfolgte die Berechnung der ECL-Werte (**E**quivalent **C**hain **L**ength, Berechnung Gleichung 1). Diese ergibt sich aus der Retentionszeit ( $R_{tx}$ ) der unbekanntes Fettsäure (x) im Verhältnis zu den bekannten Retentionszeiten der in dem verwendeten Standard enthaltenen unverzweigten gesättigten Fettsäuren ( $R_{tn}$  und  $R_{t(n+1)}$ ). Wobei  $R_{tn}$  die Retentionszeit der gesättigten Fettsäure vorangehend von x und  $R_{t(n+1)}$  die Retentionszeit der gesättigten Fettsäure nachfolgend von x beschreibt. Durch n wird die Kettenlänge der Fettsäure des Standards, welche vor x detektiert wurde, beschrieben. Die ermittelten ECL-Werte der Peaks aus der zu bestimmenden Probe werden den identifizierten Fettsäuren mit einer Abweichungstoleranz von 0,02 ECL-Einheiten zugeordnet (SASSER, 1990).

$$ECL_x = \frac{R_{tx} - R_{tn}}{R_{t(n+1)} - R_{tn}} + n \quad \text{Gl. 1}$$

Im zweiten Schritt wird diese Identifizierung der FAMEs anhand der Massenspektren mit dem Programm Enhanced Data Analysis (©Agilent Technologies MSD ChemStation) überprüft. Dieses Programm zieht zur Identifizierung der Fettsäuren, Massenspektren aus einer laborinternen Vergleichsbibliothek heran. Die Analyse der Fettsäuren am GC/FID erfolgte anhand der Retentionszeiten des Standards, analog zu der Auswertung der Daten des GC/MSD.

#### 2.2.2.4.2 Berechnung der $^{13}\text{C}$ -Inkorporation in Fettsäuren

Die Berechnung des Markierungsgrades beruht auf der Quantifizierung der Markierung für jede Fettsäure anhand des terminalen  $\text{C}_3$ -Fragmentes. Hier gilt ein Fettsäuremolekül als markiert, wenn mindestens ein  $^{13}\text{C}$ -Atom im terminalen  $\text{C}_3$ -Fragment eingebaut wurde. Während der Ionisierung im MSD wird ein  $\text{C}_3$ -Fragment vom Methylenende des Molekularions abgespalten und gemessen, wodurch eine Quantifizierung durchgeführt werden kann. Grundlage für die Quantifizierung sind das Basision m/z 43 mit den Isotopomeren mit m/z 44, 45 und 46. Dies sind  $\text{C}_3$ -Fragmente mit einem, zwei oder drei eingebauten  $^{13}\text{C}$ -Atomen.

Die Analyse der Ionen erfolgte im SIM-Modus (**S**electe**d-I**on-**M**onitoring), hierbei wird eine maximale Detektorempfindlichkeit und die ausschließliche Detektion der Ionen 43-46 erreicht (Berechnung siehe Gleichung 2) (KNEIF et al., 2003).

$$M = \frac{\sum_{i=44}^{46} [(A_i)_{\text{korrr}}]_i}{A_G} \times 100 \quad \text{Gl. 2}$$

wobei:

$$\sum_{i=44}^{46} [(A_i)_{\text{korrr}}]_i = \text{Summe der Abundanzen der Isotopomere mit den Massen } m/z \text{ 44, 45 und 46, die auf markierte Fettsäuren zurückgehen}$$

$$A_G = \text{Summe der Abundanzen von dem Basision (m/z 43) und den Isotopomeren (m/z 44-46)}$$

Bei der Berechnung des Prozentsatzes markierter Fettsäuren muss berücksichtigt werden, dass stabile Isotope wie  $^{13}\text{C}$  auch natürlicherweise in allen organischen Verbindungen vorkommen. Um eine genaue Berechnung gewährleisten zu können wurden daher für jede Fettsäure Korrekturfaktoren der natürlichen Abundanz aus den jeweiligen Originalproben bestimmt und diese von den markierten Ionen abgezogen.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Diese basierte auf einer einseitigen Student-*t*-Verteilung, welche zur Differenzierung unmarkierter und markierter Fettsäuren herangezogen wird. Da es sich bei der Markierung von Fettsäuren ausschließlich um positive Markierungsgrade handeln kann, wurden die Kalkulationen mit dem einseitigen Test zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit *p* durchgeführt. Die Signifikanz eines Markierungsgrades beruht auf Werte, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % ( $p < 0,1$ ) auf die Markierung einer Fettsäure hinweisen. Diese Schwellenwerte wurden für die Umwelthabitate einzeln bestimmt. Des Weiteren werden für besonders herauszustellende Markierungsgrade einzelner Fettsäuren die *p*-Werte im Ergebnisteil angegeben (Berechnung siehe Anhang 7.3).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

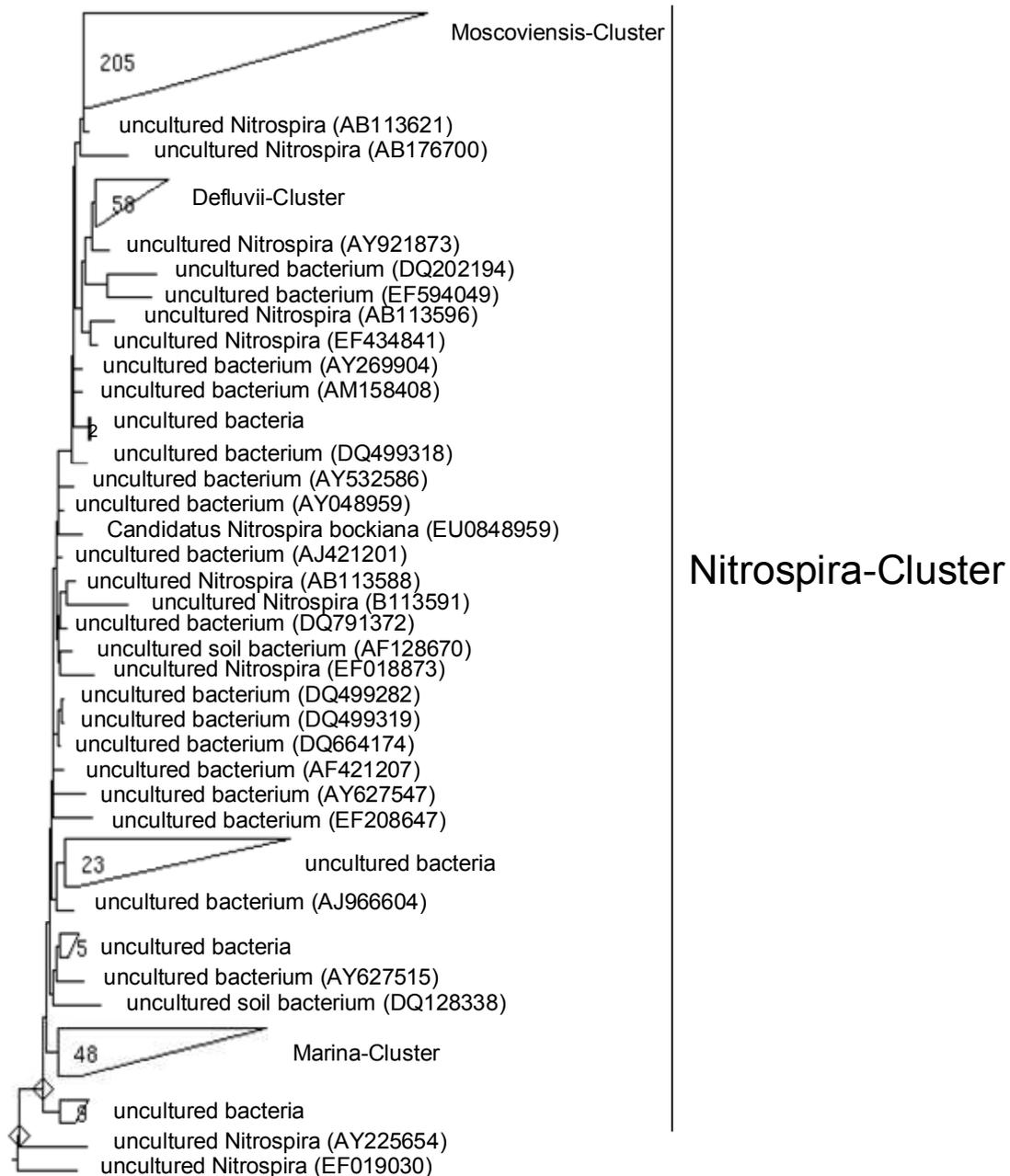
### 2.3.1 Entwicklung von Primern und Sonden

Für die Primerentwicklung wurden verfügbare *Nitrospira*-ähnliche 16S rRNA Sequenzen aus den online Datenbanken RDP II (MAIDAK et al. 2001) und NCBI (ALTSCHUL et al. 1990) entnommen und der 16S rRNA-Datenbank von ARB (ssu\_jan04.corr\_opt.arb (<http://www.arb-home.de>)) zugefügt. Die neu importierten Sequenzen sind mit dem FastAligner-Tool von ARB mit den vorhandenen Sequenzen aligned und die erhaltenen Ergebnisse manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert worden.

Die in dieser Arbeit neu ermittelten Sequenzen wurden über die *maximum parsimony*-Methode in den phylogenetischen Stammbaum der Datenbank von ARB (ssu\_jan04.corr\_opt.arb) eingerechnet. Das *maximum parsimony*-Verfahren folgt dem Prinzip, dass die kleinste Anzahl an Merkmalsübereinstimmungen als optimal gilt. Bei diesem Verfahren werden nach Baum-Topologien gesucht, welche eine möglichst minimale Gesamt-Baum-Länge aufweisen und eine möglichst geringe Anzahl an Mutationen voraussetzen. Die Entwicklung der spezifischen Primer erfolgte ausgehend von der 16S rRNA-Datenbank mit dem PROBE-DESIGN Tool von ARB (STRUNK et al., 1998; LUDWIG et al. 2004). Die Spezifität der Primer ist mit den online Datenbanken RDP II mit der Probe Match Funktion (**R**ibosomal **D**atabase **P**roject, MAIDAK et al. 2001; Stand August 2007) und der BLAST (**B**asic local alignment search tool) Funktion von NCBI (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology Information; ALTSCHUL et al. 1990; Stand August 2007) überprüft worden. Für das Primer-Design wurde das *Nitrospira*-Cluster (Abb. 6) in drei Untercluster eingeteilt, in die Untercluster *Moscoviensis*-Cluster, *Defluvii*-Cluster und *Marina*-Cluster. Die gebildeten Untercluster sind nach Organismen der Gattung *Nitrospira* benannt worden, welche sich in dem jeweiligen Cluster befinden.

Die Entwicklung der Sonden erfolgte nach Sequenzanalysen ausgewählter Proben der Belebtschlamm-Analysen. Die Informationen aus den Sequenzanalysen wurden als Basis für die Positionierung der Oligonukleotidsonden verwendet. Hierzu ist die Match Probe Funktion von ARB (STRUNK et al., 1998 und LUDWIG et

al. 2004) herangezogen worden. Die Sonden wurden analog zu den Primern für die 16S rRNA Sequenzanalysen mit den online Datenbanken RDP II (**R**ibosomal **D**atabase **P**roject, MAIDAK et al. 2001; Stand Mai 2010) und der BLAST (**B**asic **l**ocal **a**lignment **s**earch **t**ool) Funktion von NCBI (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology **I**nformation; ALTSCHUL et al. 1990; Stand Mai 2010) überprüft.



**Abbildung 6:** Das Nitrospira-Cluster, welches als Grundlage für die Primerentwicklung diente. Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum (Zahlen innerhalb der Cluster-Abzweigungen geben die Anzahl der Sequenzen an; Accession Nummern sind in Klammern hinter der jeweiligen Sequenz angegeben).

Die in der vorliegenden Studie entwickelten Primer für die 16S rRNA Sequenzanalysen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Informationen zu den Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung befinden sich in Tabelle 7. Die Synthese der Primer und Sonden wurde von der Firma VBC Biotech Service GmbH (Österreich) vorgenommen.

### 2.3.2 DNA-Extraktion und Amplifikation der 16S rRNA

Für die DNA-Extraktion der Isolate sind aus Flüssigkulturen 2 ml Kultur zentrifugiert (12.000 x g, 10 min), der Überstand verworfen und dieser Schritt 7 – 10 Mal wiederholt worden, bis sich ein ca. Stecknadel großes Pellet gebildet hatte. Die Extraktion erfolgte unter Verwendung des Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Tissue kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift. Das Zellmaterial der Gram-negativen Bakterien wurde in 180 µl Puffer ATL resuspendiert. Nach der Zugabe von 25 µl Proteinase K erfolgte ein Inkubationsschritt bei 55°C über Nacht, bis zur vollständigen Lyse der Zellen. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde die genomische DNA mit Hilfe von Silica-Gel-Minisäulen aufgereinigt. Das selektive Binden der DNA an die Membran der Minisäulen ermöglicht die Reinigung der Probe von Zellartefakten durch verschiedene Puffer des Extraktionskits. In einem letzten Schritt erfolgte die Elution der DNA von den Säulen durch die Zugabe von Elutionspuffer. Die Lagerung der DNA-Proben fand bei -20°C statt.

Für die Isolierung der DNA aus den Umweltproben sind Proben von Belebtschlamm und Biofiltermaterial aus den Aquakulturanlagen zentrifugiert (12.000 x g, 10 min) worden, bis sich ein Pellet von ca. 0,02 – 0,1 g Naßgewicht ergab. Dieses wurde in die DNA-Extraktion mit dem PowerSoil<sup>™</sup> DNA Isolations Kit der Firma MoBio (USA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Bei dieser Extraktion handelt es sich um einen mechanischen Aufschluss durch Microbeads, welche die Zellmembranen durch starkes Mischen für 10 min zerstören. Durch Lysozym können die Zellwände der Zellen zusätzlich destabilisiert werden. Die Proteine werden ausgefällt und auf eine Filtereinheit mit Silica Membran gegeben. Die DNA bindet an die Membran und wird nachfolgend mit Ethanol gereinigt. Im letzten Schritt erfolgt die Trennung der DNA von der Membran über einen Elutionspuffer und die Lagerung bei -20°C.

Die Amplifikation der 16S rRNA wurde über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die verwendeten Primer sowie die Zielorganismen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Liste der Primer. Angegeben sind die Sequenzinformationen, die Zielorganismen, die Position und die Referenz der jeweiligen Primer.

Name	Sequenz 5'- 3'	Zielorganismen	Position <sup>d</sup>	Referenz
Jur8F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG <sup>a</sup>	Bacteria	8	Juretschko et al. (1998)
Jur1529R	CAKAAAGGAGGTGATCC <sup>a</sup>	Bacteria	1545	Juretschko et al. (1998)
NS663F <sup>b</sup>	AGAGGAGCGCGGAATTCC	<i>Nitrospira</i>	663	Daims et al. (2001)
NS1470R	CCCAATCATCGGTCATAC	<i>Nitrospira</i> (Moscoviensis-Cluster <sup>c</sup> )	1470	diese Studie
NS1111R	AGCAACTGAAAGCAGGGG	<i>Nitrospira</i> (Defluvii-Cluster <sup>c</sup> )	1111	diese Studie
NS1036R	GCAGCACCTGAGCTCGCT	<i>Nitrospira</i> (Marina-Cluster <sup>c</sup> )	1036	diese Studie

<sup>a</sup> Austauschbasen: M (A/C) Y (C/T) K (G/T)

<sup>b</sup> Modifiziert von der Sonde: S-G-Ntspa-0662-a-A-18

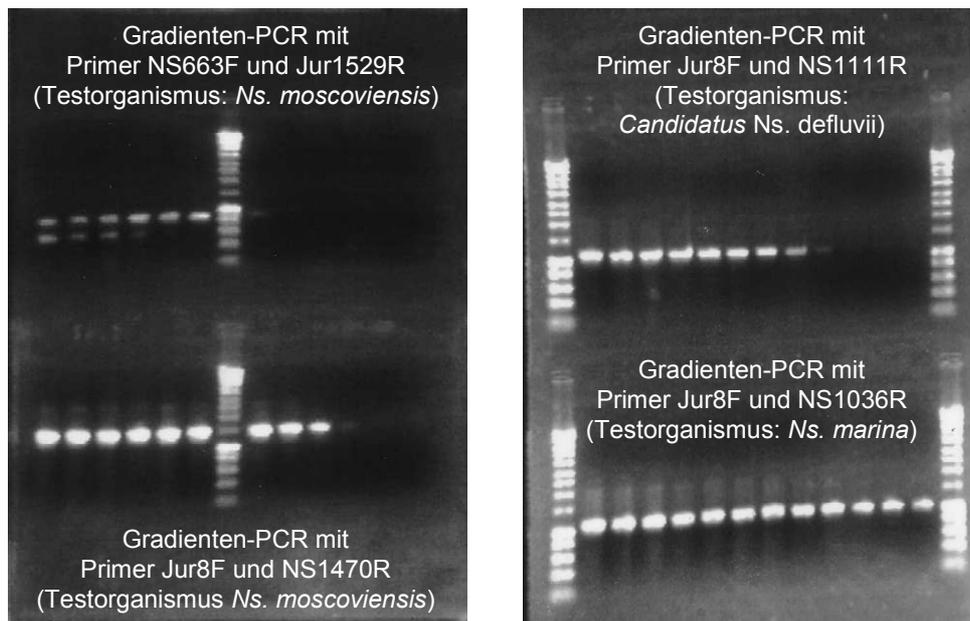
<sup>c</sup> Cluster siehe Abb. 6

<sup>d</sup> Positionsangaben nach *E. coli* (BROSIOUS et al., 1978)

Es handelt sich um F (forward) und R (reverse) Primer. Das Gemisch für eine PCR setzte sich pro Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten zusammen. 10 µl 10x Puffer (Biotherm<sup>TM</sup>, Genecraft<sup>®</sup>, Köln), 2 µl dNTPs (0,2 mM Endkonz. pro Nucleotid; Bioline, UK), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM Endkonz. (Biotherm<sup>TM</sup>, Genecraft<sup>®</sup>, Köln)), 1,5 µl BSA (Bovine Serum Albumin (10 mg/ml); Promega, USA) 1 µl forward Primer (0,5 µl (Endkonz. 8 pmol) (VBC Biotech, Österreich)), 1 µl reverse Primer (0,5 µl (Endkonz. 8 pmol) (VBC Biotech, Österreich)), 0,5 µl Taq-Polymerase (1U, Biotherm<sup>TM</sup>, Genecraft<sup>®</sup>, Köln), 2 µl DNA-Template (ca. 15-20 ng DNA). Die Ansätze wurden mit hochreinem Wasser (HPLC-Grade, steril filtriert, autoklaviert) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte mittels eines Gradientencyclers der Firma Eppendorf (Mastercycler<sup>®</sup> ep gradient; Eppendorf, Hamburg). Die verschiedenen PCR-Programme umfassten 30 Zyklen in zwei

Schritten. Der erste Schritt enthielt 10 Zyklen und der zweite Schritt beinhaltete 20 Zyklen (Tab. 6).

Die Hybridisierungstemperaturen der einzelnen Primer sind über die empirische 2+4-Regel (2°C pro AT, 4°C pro GC) ermittelt worden. In einer Gradienten-PCR, mit jeweils 12 Ansätzen pro Primerpaar, wurde ein Temperaturgradient im Bereich der berechneten Hybridisierungstemperaturen der Primer durchgeführt und somit die optimalen Temperaturen für die einzelnen Primerpaare bestimmt (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Gradienten PCR der entwickelten Primer mit Testorganismen (*Nitrospira moscoviensis* M-1; *Nitrospira marina* Nb-205; *Candidatus Nitrospira defluvii*) (Standard: HyperLadder™ I (200 bis 10000bp (Bioline, UK))).

Die errechneten Hybridisierungstemperaturen für die in dieser Studie verwendeten Primer lagen zwischen 51°C und 60°C. Für die Gradienten-PCR der Primerpaare NS663F/Jur1529R und Jur8F/NS1470 wurde ein Temperaturgradient von 48°C – 68°C im ersten Schritt und 44°C – 64°C im zweiten Schritt genutzt. Als Testorganismus diente *Nitrospira moscoviensis* M-1. Für die Primerkombinationen Jur8F/NS1111R und Jur8F/NS1036R sind Temperaturen von 55°C – 70°C im ersten Schritt und 45 – 60°C im zweiten Schritt angewandt worden. Als Testorganismen dienten hier *Candidatus Nitrospira defluvii* für das Primerpaar Jur8F/NS1111R und *Nitrospira marina* Nb-295 für das Primerpaar Jur8F/NS1036R. Die optimalen Temperatur-Programme für die Amplifikation sind in Tabelle 6 dargestellt. Für die Primer-Paare Jur8F/NS1111R und

Jur8F/NS1036R wurden optimale Temperaturen von 55°C im ersten Schritt und 45°C im zweiten Schritt ermittelt. Für die Primerpaare Jur8F/NS1470R und NS663F/Jur1529R konnten optimale Temperaturen von 56°C für den ersten Schritt und 52°C im zweiten Schritt festgelegt werden.

Die Spezifität der verwendeten Primerpaare für den Zielorganismus *Nitrospira* sind mit verschiedenen Bakterienisolaten, welche aus Bodenproben der Arktis isoliert wurden (BRUNS, 2007), bestätigt worden. Die verwendeten Organismen gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Pedobacter* und *Subtercola*.

**Tabelle 6:** Parameter für die Amplifikation der 16S rRNA mit nachfolgenden Primerpaaren

Primer-Paar Jur8F/NS1111R (Defluvii-Cluster) Primer-Paar Jur8F/NS1036R (Marina-Cluster)			Primer-Paar Jur8F/NS1470R (Moscoviensis-Cluster) Primer-Paar NS663F/Jur1529R (Nitrospira)		
Temp. (°C)	Zeit (s)	Zyklen (n)	Temp. (°C)	Zeit (s)	Zyklen (n)
95	120	1	95	120	1
95	60	10	95	60	10
55	60		56	60	
72	90		72	90	
95	60	20	95	60	20
45	60		52	60	
72	90		72	90	
72	300		72	300	
4	halten		4	halten	

Die Aufreinigung aller Amplifikate erfolgte durch das Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

Einige DNA-Extrakte aus den Umweltproben konnten nicht direkt mit den spezifischen Primersystemen amplifiziert werden. Wenn nach der DNA-Extraktion kein Produkt mit den spezifischen Primern erhältlich war, sind die DNA-Extrakte erst mit den *Bacteria*-Primern GM3F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') und GM4R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (MUYZER et al., 1993) amplifiziert worden. Das Programm bestand aus 30 Zyklen, mit den Hybridisierungstemperaturen von 49°C

im ersten Schritt und 44°C im zweiten Schritt. Dieses Produkt wurde mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in einer weiteren Amplifikation mit dem spezifischen Primersystem eingesetzt.

Zur Überprüfung der DNA-Extraktionen und der Amplifikationen wurden 2 µl DNA-Extrakt bzw. PCR-Produkt mit 1 µl Gelladepuffer (15 % Ficoll (Typ 400) Polymer; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylene cyanol FF) gemischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Gelladepuffer diente zum Anfärben und Beschweren der Probe, um ein Ausdiffundieren aus den Geltaschen zu verhindern. Zusätzlich werden 3 µl Standard (Hyper Ladder 1, Bioline, Luckenwalde) auf das Gel aufgetragen. Der Standard diente zur Quantifizierung und Längenbestimmung der aufgetrennten Fragmente. Für die Auftrennung der PCR-Produkte ist ein 1 %-iges Agarosegel (1 g Agarose (Invitrogen, USA)) auf 100 ml 1 x TAE-Puffer), welches in 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) vorlag, verwendet worden. Nach einer Laufzeit von 40 min bei einer Spannung von 70 V fand das Färben des Gels in einem Homidiumbromidbad (1 µg/ml) für 30 min statt. Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten im Wasserbad entfärbt und auf einem UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen) dokumentiert.

### 2.3.3 Analysen der Umweltproben über Klonierung

Die Klonierung der Umweltproben erfolgte mit dem pGEM®-T Vector System von Promega (USA).

Für die Ligation wurden 5 µl 2 x Rapid Ligation Puffer (Promega, USA), 1 µl T4 DNA-Ligase (3U) (Promega, USA), 1 µl pGEM-T Vector (Promega, USA) und 3 µl PCR-Produkt gemischt und 1 Stunde bei 24°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ligationsreaktion bei 4°C über Nacht. Nach der Inkubation ist der Ligationsansatz zentrifugiert (10.000 x g, 10 min) und 2 µl des Überstandes für die Transformation in 50 µl kompetente Zellen *Escherichia coli* JM109 (Promega, USA) eingesetzt worden. Dieser Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock fand bei 42°C für 50 s im Wasserbad statt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min sind 950 µl SOC Medium (20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCL; ad. 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH 7,0; sterile Supplemente (10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> und 20 ml 1 M Glukose)) zu dem Gemisch gegeben worden. Dieses Gemisch wurde

für 1,5 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation ist die Probe zentrifugiert (1.000 x g, 10 min) und 600 µl Überstand verworfen worden. Das Pellet wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf die vorbereiteten Platten ausplattiert. Die Platten mit LB-Medium und Ampicillin (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl, 15 g Agar; ad. 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH 7 – 7,5; (nach dem autoklavieren steril 2,5 ml Ampicillin (20 mg/ml) zufügen)) sind mit 100 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, 100 mM) und 50 µl X-Gal (20 mg/ml) versetzt worden. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Für die Blau-Weiß-Selektion der Klone erfolgte ein Inkubationsschritt der Platten für 1 h bei 6°C, dies verstärkte die Blaufärbung. Weiße Kolonien wurden gepickt und auf neue Platten mit LB-Medium ausgestrichen. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C. Für die DNA-Extraktion der Klone sind diese in 50 µl hochreinem Wasser (HPLC-Grade) überführt und für 10 min bei 95°C bis zur Zellyse aufgeschlossen worden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min). Die DNA befand sich im Überstand, diese wurde bis bei -20°C gelagert.

Die Amplifikation der Klone erfolgte mit dem Primerpaar M13F/R (M13F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'/ M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (MESSING, 1983)).

### 2.3.4 Identifizierung über Sequenzierung und Sequenzanalysen

Die PCR-Produkte sind mit dem unter Tabelle 5 aufgeführten Primern gemischt und durch einen externen Dienstleister (SEQLAB, Göttingen) sequenziert worden. Die Sequenz-Chromatogramme wurden manuell, mit dem Programm Chromas LITE Version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) überprüft und ggf. manuell editiert. Anschließend sind die Sequenzen mit Hilfe der online Datenbanken RDP II durch die Seqmatch Funktion (Ribosomal Database Project, MAIDAK et al., 2001) und mit der NCBI-BLAST Funktion (Basic local alignment search tool, Altschul et al., 1990) überprüft worden. Das Alignment der Sequenzen und die Konstruktion des phylogenetischen Stammbaumes wurden mit dem Programm MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) mittels „Neighbor-Joining“-Analyse (SAITOU et al., 1987) durchgeführt. Im „Bootstrap“-Verfahren konnten, durch wiederholte Berechnung (1000 x) der Baumtopologien mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren,

Werte für die statistische Signifikanz ermittelt werden. Dabei wird von dem genutzten Programm jeweils eine zufällige Auswahl von Daten aus der gegebenen Datenmenge getroffen. In den resultierenden Pseudostichproben sind Teile des Alignments mehrfach und andere gar nicht vertreten. „Bootstrap“-Werte gaben Auskunft über die statistische Signifikanz, also in wie viel Prozent der Pseudostichproben-Bäume eine bestimmte Verzweigung aufgetreten ist. Mögliche Sequenzanomalien, wie z.B. DNA-Chimären, sind unter Verwendung des Programms Pintail (ASHELFORD et al., 2005) ausgeschlossen worden. Als Referenzen, für die 16S rRNA Sequenzanalysen aus den Umweltproben, dienten die 16S rRNA Sequenzen von *Nitrospira marina* (Acc. Nr. X82559) und *Candidatus Nitrospira defluvii* (Acc. Nr. DQ059545). Identifizierte DNA-Chimären wurden in den weiteren Analysen nicht weiter berücksichtigt.

### 2.3.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Für die Proben aus Belebtschlamm ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), wie bei AMANN et al. (1990) beschrieben, durchgeführt worden. Hierzu wurden Aliquots aus den Markierungsexperimenten des Belebtschlammes aus dem Klärwerkverbund (Hamburg) verwendet. Es handelte sich um Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009, welche bei 17°C mit 0,3 mM Nitrit (siehe 2.2.2.1.1) inkubiert worden sind und um die Anreicherung „Bs\_17“ (Tab. 3) aus der Markierung von Belebtschlamm. Des Weiteren ist eine Kultur von *Candidatus Nitrospira defluvii* in die Hybridisierungsexperimente eingesetzt worden. Für die Hybridisierung wurden Oligonukleotidsonden verwendet, welche am 5'-Ende mit dem Farbstoff Cy3 (Carboxymethylindocyanin-succinimidylester, SOUTHWICK et al. 1990) markiert waren. Die in dieser Studie verwendeten Sonden sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Verwendet worden sind die für *Bacteria* spezifische Sonde EUB338 (AMANN et al., 1990) und die für die Gattung *Nitrospira* spezifische Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al., 2001). Die Sonde NS177A wurde für einen neuen *Nitrospira* aus Belebtschlamm entwickelt (siehe 2.3.1). Der Einsatz der Sonde NS177A erfolgte mit der Kompetitorsonde NS177B, die zu der Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii* (Acc. Nr. DQ059545) komplementär ist. Bei der Kompetitorsonde handelt

es sich um ein nicht markiertes Oligonukleotid, welches die Position im bekannten Organismus besetzen soll. Hierbei handelt es sich um einen Sequenzunterschied zwischen Zielsequenz und bekannter Sequenz von 1 bp. Um dennoch die richtige Bindung der Sonde an die Zielsequenz gewährleisten zu können, werden die Sonden als Gemisch eingesetzt.

**Tabelle 7:** Liste der Sonden. Angegeben sind die Sequenzinformationen, die Zielorganismen, die Position und die Referenz der Sonden.

Name	Sequenz 5'-3'	Ziel	Position <sup>c</sup>	Referenz
EUB338 <sup>ab</sup>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	338	AMANN et al. (1990)
S-G-Ntspa-0662-a-A-18 <sup>ab</sup>	GGAATTCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i>	662	DAIMS et al. (2001)
NS177A <sup>ab</sup>	CCCGAAGATCCGGAGGCG	<i>Nitrospira</i> Kultur BS_17	182	diese Studie
NS177B <sup>b</sup>	CCCGAAGATTCGGAGGCG	Kompetitor-Sonde für NS177A	182	diese Studie

<sup>a</sup> Markierung mit Farbstoff Cy3 (SOUTHWICK et al. 1990)

<sup>b</sup> Formamidkonzentration von 35 %

<sup>c</sup> Positionsangaben nach *E. coli* (BROSIUS et al., 1978)

Die Fixierung der Zellen wurde mit einer Paraformaldehydlösung (PFA, 4 %) durchgeführt. Für 100 ml PFA-Lösung sind 4 g Paraformaldehyd in 60 ml bidest. H<sub>2</sub>O bei 60°C gelöst worden. Nach der Zugabe von 20 µl NaOH (2M) wurden die Reagenzien durchmischt, bis eine klare Lösung entsteht. Darauf folgte die Zugabe von 33 ml 3 x PBS-Puffer (**Phosphate Buffered Saline**; Stocklösung: Tab. 8).

**Tabelle 8:** 10 x PBS-Puffer

10 x PBS-Puffer	
40 g	NaCl
1 g	KCl
7,2 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad. 500 ml bidest. H <sub>2</sub> O, pH mit NaOH auf 7,2 einstellen	

Die Einstellung des pH-Wertes der Fixierlösung auf 7,2 erfolgte mit HCl (1M). Die so erhaltene Lösung ist sterilfiltriert und bei -20°C gelagert worden.

Zur Fixierung der Umweltproben wurden 2 ml Probe mit 6 ml PFA-Fixierlösung versetzt. Die Inkubation dieses Gemisches erfolgte für 2 Stunden im Über-Kopf-Schüttler bei Raumtemperatur. Darauf folgte eine Zentrifugation (12.000 x g, 10 min) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet ist zwei Mal mit 2 ml steriler 1 x PBS-Lösung gewaschen und der Rückstand in 2 ml steriler 1 x PBS/Ethanol-Lösung (1:1 v/v) aufgenommen und bei -20 °C gelagert worden.

Die FISH-Analysen wurden mit Zellmaterial der Anreicherungskultur aus Belebtschlamm („BS\_17“; Tab. 3) durchgeführt. Diese Kultur bestand zum Zeitpunkt der Untersuchungen seit zwei Jahren, welche drei Mal in frisches Medium überführt worden war. Für die Fixierung der Zellen wurden 12 ml aus der Kultur entnommen und zentrifugiert (12.000 x g, 10 min). Aus der Kultur von *Candidatus Nitrospira defluvii* sind 2 ml entnommen und zentrifugiert (12.000 x g, 10 min) worden. Die Aufnahme der Zellpellets aus der Anreicherung BS\_17 und von *Candidatus* Ns. defluvii erfolgte jeweils in 500 µl Ringerlösung. Dieses Gemisch wurde mit 1,5 ml PFA-Lösung versetzt und 2 h bei Raumtemperatur im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Darauf folgte die Zentrifugation (12.000 x g, 10 min). Das Pellet ist dann zwei Mal mit 2 ml steriler 1 x PBS-Lösung gewaschen worden. Die Zellpellets wurden in steriler 200 µl 1xPBS/Ethanol-Lösung (1:1 v/v) bei -20°C gelagert.

Die Objektträger bestanden aus 8 Kavitäten (Thermo Scientific, USA). Die einzelnen Träger sind in 1 %-iger HCl Lösung und mit 70 % Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet worden. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte mit einer Gelatine-Lösung (0,075 % Gelatine mit 0,01 % CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> auf 70°C erhitzt).

Die Hybridisierung wurde auf den beschichteten Kavitäten der Objektträger vorgenommen. Diese sind mit jeweils 3 µl des fixierten Zellmaterials versehen und bei Raumtemperatur getrocknet worden. Nachfolgend wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert, indem diese jeweils 3 min in 50 %, 80 % und 100 % Ethanol inkubiert und bei Raumtemperatur getrocknet worden sind. Vom

Hybridisierungspuffer ist nun 8  $\mu$ l (Formamidkonzentration 35 %: 360 $\mu$ l 5M NaCl, 40  $\mu$ l 1M Tris-HCl, 700  $\mu$ l Formamid (deionisiert), auffüllen mit 2 ml hochreinem Wasser (HPLC-Grade), mit 2  $\mu$ l SDS (10 %) versetzen, sterilfiltrieren) auf jede Kavität pipettiert und mit 1  $\mu$ l Sonde (50 ng/ $\mu$ l) gemischt worden. Die Objektträger wurden in einem verschlossenen 50 ml Röhrchen waagrecht für 1,5 Stunden bei 46°C inkubiert. Die Röhrchen enthielten zusätzlich 4 ml Hybridisierungspuffer, damit die Kavitäten auf den Objektträgern nicht austrocknen konnten.

Nach der Hybridisierung sind die Objektträger mit ca. 4 ml Waschpuffer (1 ml 1M Tris-HCl, 700  $\mu$ l 5 M NaCl auf 50 ml auffüllen mit hochreinem Wasser (HPLC-Grade) und mit 50  $\mu$ l 10 % SDS versetzen, sterilfiltrieren) gewaschen worden. Darauf folgend wurden die Objektträger mit Waschpuffer überschichtet und für 15 min bei 48°C inkubiert. Nach der Inkubation sind die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und mit der Gegenfärbung mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) versehen worden. Jede Kavität wurde mit 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ml) DAPI überschichtet und für 10 min bei 4°C inkubiert. Das DAPI ist mit sterilem hochreinem Wasser (HPLC-Grade) von den Kavitäten gewaschen und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet worden.

Die Proben wurden mikroskopisch mit dem Axiovert 200 (Zeiss, Jena) mit dem Objektiv C-Apochromat 63x/1,20 W Korr M27 (Zeiss, Jena) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit der Kamera AxioCam MRC (Zeiss, Jena). Als Filter wurde der FS28 von Zeiss verwendet, welcher gleichzeitig die Wellenlängen der Flurochrome DAPI (Absorption 345 nm / Emission 455 nm) und Cy3 (Absorption 512/552 nm / Emission 565/615 nm) darstellen kann. Durch dieses Verfahren kommt es bei einer Bindung von DAPI und der Cy3 markierten Sonde zu einer Überlagerung der blauen Fluoreszenz von DAPI und der roten Fluoreszenz von Cy3, hieraus resultiert die Farbe Purpur, welches die Bindung beider Farbstoffe anzeigt. Für die Auswertung ist das Programm AxioVision (Zeiss, Jena) verwendet worden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gesamtzell-Fettsäureanalysen der Reinkulturen und Anreicherungen

In den Gesamtzell-Fettsäureanalysen wurden Anreicherungen und Reinkulturen von verschiedenen Standorten untersucht, die Hauptkomponenten aus diesen Analysen sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9:** Hauptkomponenten der Stämme und Anreicherungen aus den Gesamtzell-Fettsäureanalysen (Fettsäuren in %)

	16:1 cis 7	16:1 cis 9	16:1 cis 11	16:0	16:0 11 methyl	18:1 cis 11
<i>Ns. moscoviensis</i> M-1	8		40	23	27	
<i>Candidatus Ns. bockiana</i>	16	0-1		49	24	
<i>Ns. calida</i> Ns10 <sup>a</sup>	9-14			45-58	19-39	
Anreicherung „Ga II“	46			43	1	
<i>Ns. marina</i> Nb-295	34-36		22-24	23-26	2	1
Anreicherung „Ecomares 2.1“ <sup>b</sup>	37-41		20-31	25-36	0-3	
Anreicherung „Sh“ (schwarze FK)	26	2	19	30		3
Anreicherung „Sh“ (weiße FK)	19		14	40		5
Anreicherung „EP_NL“	36-37		40	24-25		
Anreicherung „Shelly“	3		69-75	13-15		2-3
<i>Candidatus Ns. defluvii</i> <sup>c</sup>	1-5	0-6	41-78	10-26		0-10
Anreicherung „Ham-1“		31	3	29		6
Anreicherung „MAK 207.5“		33		27		5
Anreicherung „S11“	32-33	1-3	41-45	13-16		1-4
Anreicherung „MOV II 9“	5		74	10		2
<i>Nitrobacter vulgaris</i> AB1 <sup>d</sup>				4-14		79-93

<sup>a</sup>Inkubationen bei 37°C und 45°C

<sup>b</sup>Inkubationen bei 17 und 28°C

<sup>c</sup>Inkubationen bei 10°C, 17°C und 28°C

<sup>d</sup>Inkubationen bei 10°C und 28°C

## Ergebnisse

Die spezifischen Hauptkomponenten für Organismen der Gattung *Nitrospira* sind anhand der Reinkulturen *Ns. marina* NB-295 und *Ns. moscoviensis* M-1 (LIPSKI et al., 2001 (Tab.1)), sowie für Anreicherungen von *Candidatus Nitrospira defluvii* (SPIECK et al., 2006 (Tab.1)) und *Candidatus Nitrospira bockiana* (LIPSKI et al., 2001 (Tab.1)) in dieser Arbeit bestätigt worden (Tab. 9).

Des Weiteren konnte durch Untersuchungen nach einer Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen eine temperaturunabhängige Konstellation der Hauptfettsäuren einzelner Organismen bestimmt werden. In den Tabellen 10 – 13 sind die Ergebnisse der Fettsäureprofile von Nitritoxidanten dargestellt, die bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden. Hierfür dienten *Candidatus Nitrospira defluvii* (Tab. 10) und *Nitrobacter vulgaris* AB1 (Tab. 11), die Anreicherung „Ecomares 2.1“ (Tab. 12) und *Nitrospira calida* Ns10 (Tab. 13) als Modellorganismen.

**Tabelle 10:** Prozentanteil der Gesamtzellfettsäuren von *Candidatus Nitrospira defluvii* (Fettsäuren in %; Jahr der Analyse ist in Klammern angegeben)

Fettsäuren	10°C (2007)	17°C (2007)	28°C (2007)	28°C (2010)
12:0	1,1	0,7	0,7	0,7
14:0	3,2	3,7	5,8	6,0
15:0	0,9		0,2	
16:1 <i>cis</i> 7	3,5	1,1	4,4	4,1
16:1 <i>cis</i> 9	6,2	1,2	0,3	
16:1 <i>cis</i> 11	40,9	65,8	69,5	77,5
16:0	26,1	15,9	10,1	10,3
18:1 <i>cis</i> 11	9,4	5,3	1,4	0,2
18:0	7,5	4,1	0,8	0,3

*Candidatus Nitrospira defluvii* wurde bei den Temperaturen 10°C, 17°C und 28°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 und die Hauptkomponente 16:0 über das Temperaturspektrum

## Ergebnisse

bestehen bleiben und es nur quantitative Unterschiede im Prozentanteil der Gesamtzellfettsäuren gibt.

Der Organismus *Nitrobacter vulgaris* AB1 ist bei 10°C und 28°C inkubiert worden. Auch hier zeigte sich, dass die Fettsäure 18:1 *cis* 11 als Hauptkomponente bestehen bleibt und nur ein quantitativer Unterschied in den Prozentanteilen der Gesamtzellfettsäuren vorliegt.

**Tabelle 11:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren von *Nitrobacter vulgaris* AB1 (Fettsäuren in %)

Fettsäuren	10°C	28°C
16:0	4,0	13,6
18:1 <i>cis</i> 9	1,2	4,8
18:1 <i>cis</i> 11	92,3	78,7
18:0	2,5	2,9

Dieser ausschließlich quantitativ vorliegende Unterschied der Hauptkomponenten bei Nitrit-oxidierenden Bakterien konnte auch in der Anreicherung „Ecomares 2.1“ (KEUTER et al., eingereicht) für die Temperaturen 17°C und 28°C und für *Nitrospira calida* Ns10 (LEBEDEVA et al., 2011) bei Temperaturen von 37°C und 45°C gezeigt werden (Tab. 12 & 13).

**Tabelle 12:** Prozentanteil der Gesamtzellfettsäuren aus der Anreicherung „Ecomares 2.1“ (Fettsäuren in %)

Fettsäuren	17°C	28°C
14:0	1,0	
16:1 <i>cis</i> 7	40,7	37,1
16:1 <i>cis</i> 10	1,9	2,8
16:1 <i>cis</i> 11	30,8	19,8
16:0	24,4	35,3
16:0 11 methyl		2,3
18:0	2,2	2,8

## Ergebnisse

In der Anreicherung „Ecomares 2.1“ bilden die spezifischen Fettsäuren 16:1 *cis* 7 (37 – 41 %) und 16:1 *cis* 11 (20 – 31 %) und die Fettsäure 16:0 (24 – 36 %) die Hauptkomponenten (Tab. 12). In den Gesamtzellfettsäure-Analysen von *Ns. calida* Ns10 zeigen sich die spezifische Komponenten die Fettsäuren 16:0 11 methyl (19 – 38 %) und 16:1 *cis* 7 (9 – 14 %), sowie das Lipid 16:0 (45 – 58 %) als Hauptkomponenten (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Gesamtzellfettsäureprofile aus heißen Quellen (Fettsäuren in %)

Fettsäuren	Ns 10 (37°C)	Ns 10 (45°C)	Ga II (46°C)
14:0	1,1	0,4	1,1
15:0 iso			1,7
16:0 iso		0,3	1,6
15:0	1,0	0,3	0,3
16:1 <i>cis</i> 7	13,7	9,2	45,8
16:1 <i>cis</i> 10		0,4	1,1
16:0	57,3	45,0	42,1
16:0 10 methyl			0,5
16:0 11 methyl	19,0	38,3	0,8
16:0 3OH	1,0	0,4	
18:0	4,0	3,3	2,2

*Ns. calida* Ns10 stammt aus den heißen Quellen in der Nähe von Gorjachinsk (Russland). Aus dieser heißen Quelle konnte in einer Anreicherung bei einer Temperatur von 46°C ein weiterer Organismus der Gattung *Nitrospira* identifiziert werden. Es handelt sich um die Anreicherung „Ga II“, welche die spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 7 mit einem Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren von 46 % und die Hauptkomponente 16:0 mit einem Prozentanteil von 43 % zeigte. Im Unterschied zu *Ns. calida* Ns10 weist dieser Organismus die spezifische Fettsäure 16:0 11 methyl mit einem sehr geringen Anteil von < 1 % auf.

Die Untersuchungen der Anreicherungen (Tab. 9), welche aus marinen Systemen (Tab. 2) stammen, weisen die Fettsäure 16:1 *cis* 7 und die Fettsäure 16:1 *cis* 11

als spezifische Hauptkomponenten auf. Als weitere Hauptkomponente wurde die Fettsäure 16:0 detektiert. Diese Fettsäuren konnten auch für *Ns. marina* NB-295, als Hauptkomponenten identifiziert werden. Dieser Organismus wies für die Fettsäure 16:1 *cis* 7 einen Prozentanteil von 34 – 36 % und für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 einen Prozentanteil von 22 – 24 % auf. Aus marinen Fischfarmen wurden diese spezifischen Hauptkomponenten aus Anreicherungen der Fischfarm Büsum, durch die Anreicherung „Ecomares 2.1“, mit einem Prozentanteil von 37 – 41 % für die Fettsäure 16:1 *cis* 7 und mit einem Prozentanteil von 20 – 31 % für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 detektiert. Ähnliches gilt für die Fischfarm in Strande. Hier konnten in den Anreicherungen „Sh“ die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 7 mit einem Prozentanteil von 19 – 26 % und die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 11 mit einem Prozentanteil von 14 – 19 % identifiziert werden. Weitere Anreicherungen, welche diese Hauptkomponenten aufweisen sind Anreicherungen von Proben aus der Laptev See („S11“) und die Anreicherung aus einem marinen Bioreaktor („EP\_NL“). Als spezifische Hauptkomponenten wurden in diesen Proben die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 7 mit einem Prozentanteil von 32 – 37 % und die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 11 mit einem Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren von 40 – 44 % detektiert.

Die spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 für *Candidatus Nitrospira defluvii* mit einem Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren von 41 – 78 % konnte auch in einer Anreicherung aus einem sauren Bioreaktor („Shelly“) mit einem Prozentanteil von 69 – 75 % detektiert werden. Diese spezifische Fettsäure ist ebenfalls als Hauptkomponente mit einem Prozentanteil von über 70 % in einer Anreicherung aus der Movilen Höhle („MOV II 9“) analysiert worden (Tab. 2; Tab. 9). Die Kulturen *Candidatus Nitrospira defluvii*, die Anreicherung „Shelly“ und die Anreicherung „MOV II 9“ enthalten ebenfalls die nicht spezifische Fettsäure 16:0 als Hauptkomponente.

Die Anreicherungen „MAK 207.5“ und „Ham-1“ (Tab. 2) zeigten die Fettsäure 16:1 *cis* 9 und die Fettsäure 16:0 als Hauptkomponenten, mit einem Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren von 27 – 33 %. Zusätzlich enthielten die Anreicherungen die Hydroxyl-Komponenten 10:0 3OH, 12:0 3OH und 14:0 2OH, mit einem Prozentanteil von 2 – 5 %. Dieses Gesamtzellfettsäureprofil wurde zum ersten Mal

## Ergebnisse

in einem psychrophilen, Nitrit-oxidierenden Organismus aus der sibirischen Permafrostregion identifiziert, welcher *Candidatus Nitrotoga arctica* (ALAWI et al., 2007) benannt wurde. Die Gesamtzellfettsäureprofile dieser Organismen sind in Tabelle 14 gegenübergestellt.

**Tabelle 14:** Gesamtzellfettsäureprofile von *Candidatus Nitrotoga arctica* (ALAWI et al. 2007) und den Anreicherungen „Ham-1“ und „MAK 207-5“ (Fettsäuren in %)

Fettsäuren	<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> (4 – 17°C)	Ham-1 (10°C)	MAK 207-5 (17°C)
10:0 3OH	2-4	2	2
12:0	4-6	4	5
12:0 3OH	4-7	2	4
14:0	2-3	4	4
15:0 iso	2-3	2	
15:0 anteiso	1-2	1	5
14:0 2OH	3-5	3	5
16:1 <i>cis</i> 9	25-47	31	33
16:1 <i>cis</i> 11	0-1	3	
16:0	22-26	29	27
17:0 cyclo 9-10	4-5	3	3
18:1 <i>cis</i> 9	1-2	2	2
18:1 <i>cis</i> 11	4-5	6	5
18:0	1-3	9	7
18:1 <i>cis</i> 11 11 methyl	0-1	1	2

### 3.2 Vorbereitende Analysen für die Markierung von Umweltproben

#### 3.2.1 Einbau von <sup>13</sup>C-Bicarbonat in die Fettsäuren von *Nitrospira*

Die Messbarkeit der <sup>13</sup>C-Assimilierung in die Fettsäuren von Nitrit-oxidierenden Bakterien bei unterschiedlichen Temperaturen wurde mit Anreicherungen von *Candidatus Nitrospira defluvii* ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die

## Ergebnisse

Fettsäuren des Organismus mit dem stabilen Isotop markieren lassen. Dies wurde für Temperaturen von 10°C und 17°C getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt, hier konnten hohe Markierungsgrade, vor allem in die ungesättigten Fettsäuren detektiert werden. Die spezifische Hauptkomponente von *Candidatus* Ns. defluvii, die Fettsäure 16:1 *cis* 11 wies hohe Einbauraten von über 70 % auf.

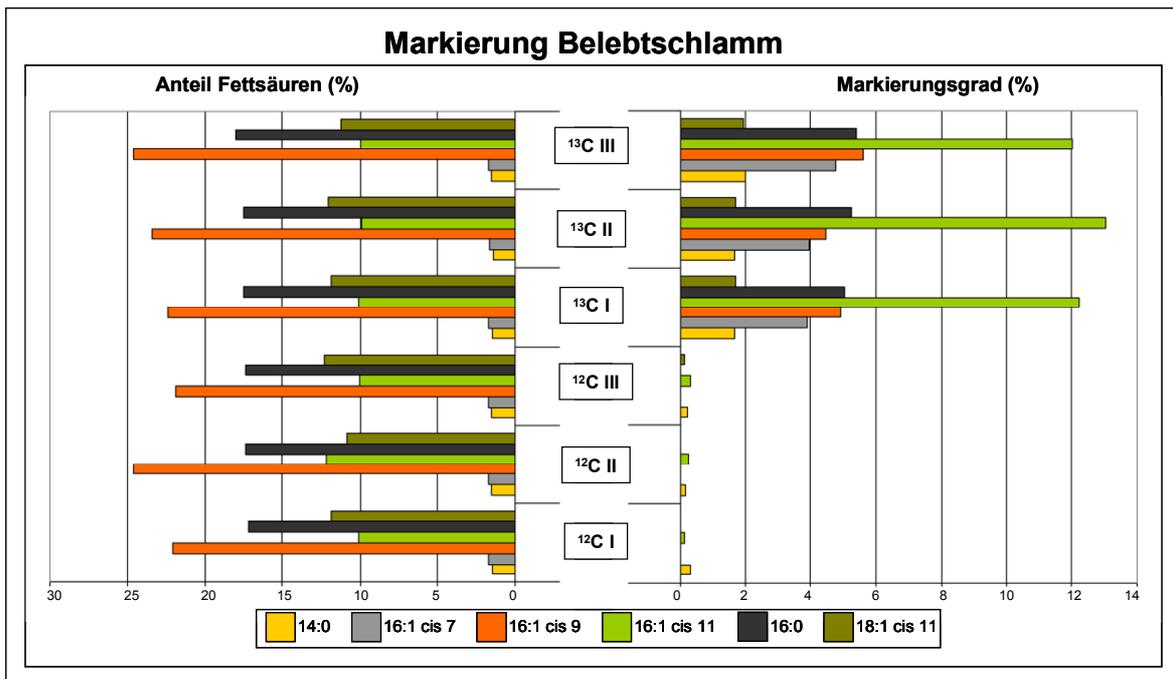
**Tabelle 15:** Markierung einer Anreicherungskultur von *Candidatus* Nitrospira defluvii (% = Gesamtzellfettsäuren MG = Markierungsgrad (Angaben in %))

Anreicherung <i>Candidatus</i> Ns. defluvii			Anreicherung <i>Candidatus</i> Ns. defluvii		
Temperatur 10 °C			Temperatur 17 °C		
Fettsäuren	%	MG	Fettsäuren	%	MG
12:0	1,1	42	12:0	0,7	31
14:0	3,2	35	14:0	3,7	54
15:0	0,9	3	15:0		
16:1 <i>cis</i> 7	3,5	74	16:1 <i>cis</i> 7	1,1	76
16:1 <i>cis</i> 9	6,2	68	16:1 <i>cis</i> 9	1,2	58
16:1 <i>cis</i> 11	40,9	75	16:1 <i>cis</i> 11	65,8	76
16:0	26,1	33	16:0	15,9	41
18:1 <i>cis</i> 11	9,4	70	18:1 <i>cis</i> 11	5,3	64
18:0	7,5	2	18:0	4,1	4

### 3.2.2 Markierungen einer Umweltprobe mit <sup>12</sup>C- und <sup>13</sup>C-Bicarbonat

Die Hauptkomponenten der Nitrit-oxidierenden Bakterien zur Differenzierung zwischen <sup>12</sup>C-inkubierten und <sup>13</sup>C-inkubierten Umweltproben aus Belebtschlamm sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Inkubationstemperatur betrug 28°C mit 3 mM Nitrit. Es wurden jeweils drei Parallelen mit <sup>12</sup>C- und drei Parallelen mit <sup>13</sup>C-Bicarbonat versetzt. Gezeigt werden die Hauptkomponenten der Nitrit-oxidierenden Bakterien (siehe hierzu auch Tab. 1). Die Prozentanteile an Gesamtfettsäuren weisen keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,94$ ) zwischen

den Parallelen und zwischen den  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Inkubationen auf (Berechnung siehe 7.4). Bei den Markierungen wird der  $^{13}\text{C}$ -Einbau in die Fettsäuren bei den Inkubationen mit  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat deutlich, hier weisen die Parallelen ähnliche Ergebnisse zueinander auf. Vor allem die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 11 zeigt mit 12 – 13 % ( $p < 0,005$ ) eine deutlich messbare  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung.



**Abbildung 8:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad (rechte Grafik) in Prozent einer Belebtschlammprobe, Inkubation bei 28°C mit 3 mM Nitrit, je drei Parallelen für  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat (Probe I bis III).

### 3.3 Ergebnisse zum Ökosystem Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage

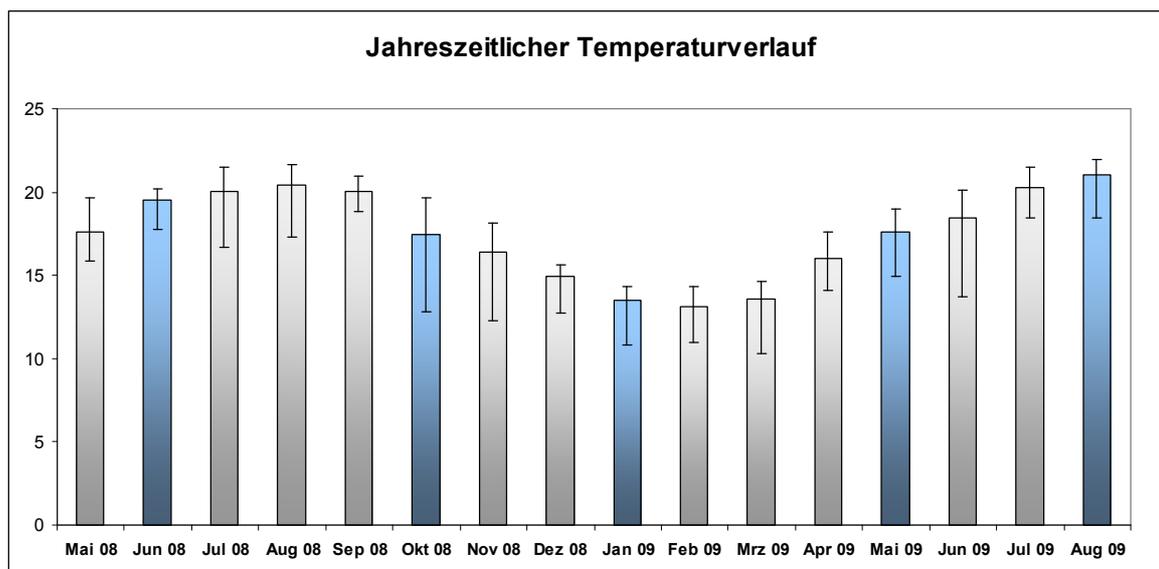
#### 3.3.1 FAME-SIP mit Proben aus Belebtschlamm

Für die Markierungsexperimente im Belebtschlamm werden die Fettsäureprofile und Markierungsgrade der Nitrit-oxidierenden autotrophen Bakteriengruppen dargestellt. Die Ergebnisse für die relevanten Hauptfettsäuren (siehe Tab. 1) sind in den Abbildungen 10 – 14 gezeigt. Die Darstellung aller detektierbaren Gesamtzellfettsäuren mit den dazugehörigen Markierungen erfolgt im Anhang (Abb. 34 – 51). Fettsäuren mit einer Gesamt-Abundanz  $\leq 1000$  wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Diese Gesamt-Abundanz, der minimalen zu berücksichtigenden Fettsäuremenge mit einer Abundanz von

1000, wurde auch bei Untersuchungen von KNIEF et al. (2003) festgestellt. Für die Proben aus Belebtschlamm ist der Schwellenwert einer signifikant markierten Fettsäure von 3 % ( $p < 0,1$ ) ermittelt worden. Alle Fettsäuren, welche Einbauraten  $\geq 3$  % ( $p < 0,1$ ) aufweisen, werden nachfolgend als signifikant markiert bewertet. Zusätzlich erfolgt die Angabe der Wahrscheinlichkeit  $p$  der für diese Studie relevanten  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen für die wichtigen Hauptkomponenten im Text.

Durch die messbare  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung können Rückschlüsse auf die aktive autotrophe Mikroorganismengemeinschaft gezogen werden. Es zeigte sich, dass die nicht spezifischen Hauptfettsäuren für die Gattungen *Nitrospina* (Fettsäure 14:0 in Kombination mit Fettsäure 16:1 *cis* 9), *Nitrococcus* (Fettsäure 16:1 *cis* 9 in Kombination mit Fettsäure 18:1 *cis* 11), *Nitrobacter* (Fettsäure 18:1 *cis* 11) und dem Betaproteobakterium *Nitrotoga* (Fettsäure 16:1 *cis* 9), sowie die spezifischen Komponenten für die Gattung *Nitrospira* (Fettsäure 16:1 *cis* 7 und Fettsäure 16:1 *cis* 11) im Gesamtzellfettsäureprofil detektiert wurden. Allerdings kann ausschließlich über die  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung in die spezifischen Hauptkomponenten von *Nitrospira* Rückschlüsse auf die metabolische Zellaktivität dieser Gattung gewonnen werden. Signifikant markierte Fettsäure-Kombinationen der anderen Nitritoxidanten werden als Hinweis auf dessen metabolische Aktivität gewertet. Diese Ergebnisse bedürfen einer weiteren Analysierung, welche durch z. B. molekularbiologische Methoden oder im Zuge einer Anreicherung erhalten werden können. Durch die Fettsäure 16:0 lässt sich auf keinen Organismus geschlossen werden, es handelt sich hierbei um eine Hauptkomponente von fast allen untersuchten Mikroorganismen. Die Markierungsgrade dieser Fettsäure werden in den Grafiken mit dargestellt. In den nachfolgenden Ausführungen wird allerdings nicht weiter auf den Einbau in diese Fettsäure eingegangen.

Die Markierungen von Belebtschlamm fanden vom Sommer 2008 bis Sommer 2009 statt. Hierzu wurden im Juni 2008, Oktober 2008, Januar 2009, Mai 2009 und August 2009 Probenahmen durchgeführt. Die durchschnittliche Temperatur im Belebungsbecken lag für diesen Zeitraum zwischen 13,5 und 21,0°C (Abb. 9).



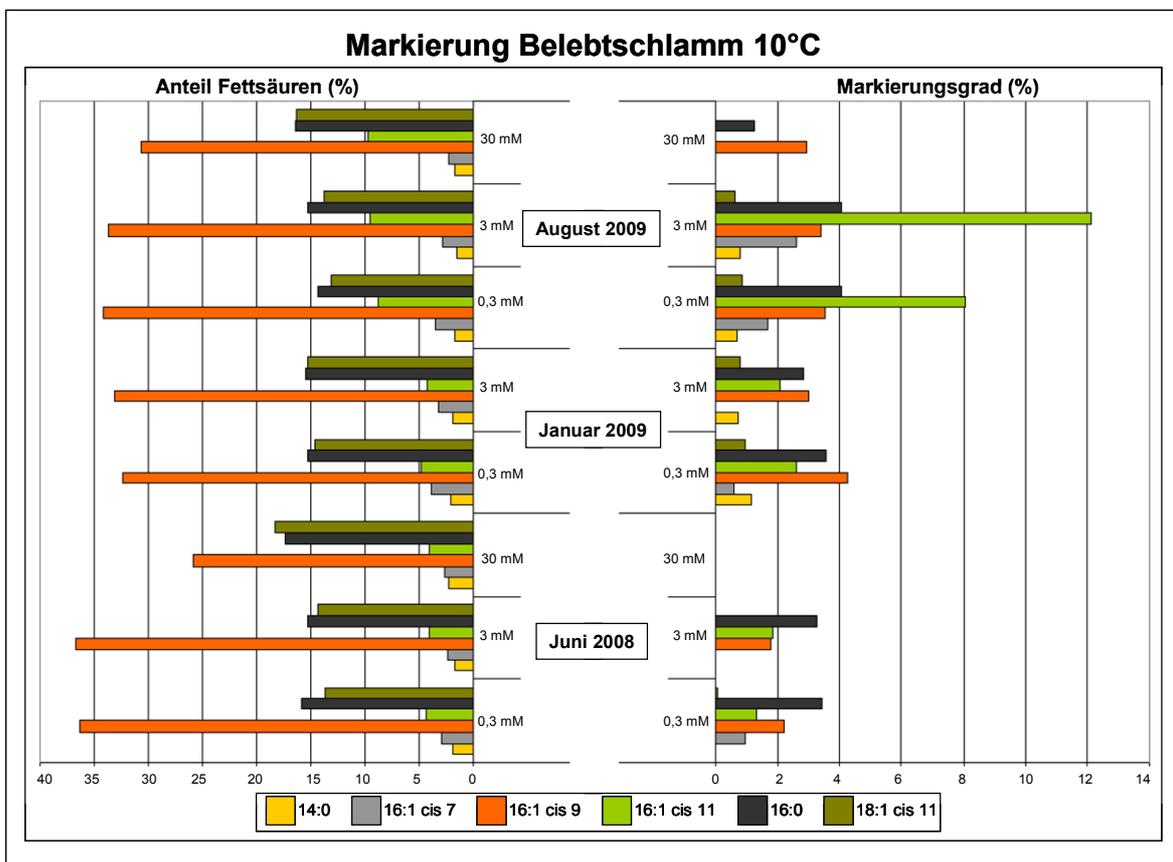
**Abbildung 9:** Balken geben die monatliche Mittelwerte der Temperaturen im Original-Belebtschlamm während des Probenahmezeitraumes, Probenahmemonate in blau dargestellt, Indikatoren geben die Niedrigste und die Höchste gemessene Temperatur des jeweiligen Monats an (Rohdaten von Herrn Ehlen (Hamburger Stadtentwässerung AöR) zur Verfügung gestellt).

Nachfolgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse zu den Experimenten der Markierung aus Belebtschlamm des Klärwerkverbundes in Hamburg. Die untersuchten Proben stammen aus verschiedenen Jahreszeiten und wurden bei Temperaturen von 4°C – 32°C inkubiert, sowie auf Nitritkonzentrationen von 0,3 mM, 3 mM und 30 mM eingestellt. Diese Parameter sind gewählt worden, um ein möglichst breites Spektrum der denkbaren natürlichen Bedingungen des Habitates analysieren zu können und um Grenzen der Leistungsfähigkeit der analysierten Organismen aufzudecken. Die Inkubationstemperatur von 4°C wies in den Analysen vom Juni 2008 (siehe Abb. 39) keine aussagekräftige <sup>13</sup>C-Assimilierung auf, lediglich die Fettsäure 16:0 zeigte bei einer Nitritkonzentration von 3 mM eine signifikante Markierung von > 3 %. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Inkubation bei 10°C (Abb. 38) vom Juni 2008, somit wurde eine Inkubation von 4°C in den nachfolgend durchgeführten Experimenten nicht weiter berücksichtigt und eine Temperatur von 10°C als Maßstab für eventuelle Zellaktivitäten psychrophiler Nitritoxidanten verwendet. Einen signifikanten Unterschied des Prozentanteils an Gesamtzellfettsäuren von ≥ 50 % zwischen den verschiedenen Temperaturen, Nitritkonzentrationen und Jahreszeiten konnte nicht festgestellt werden. Lediglich der Prozentanteil der *Nitrospira* spezifischen Fettsäure 16:1 *cis* 11 zeigte, einen solch erhöhten Anteil an Gesamtzellfettsäuren

## Ergebnisse

in den Proben vom August 2009. Dies konnte bei der PLFA-Extraktion aus dem Probenmaterial direkt nach der Probennahme, also ohne Inkubation, ermittelt werden. Hier wurde die Fettsäure 16:1 *cis* 11 im Probenmaterial vom August 2009 mit einem doppelt so hohen Wert detektiert, als im Probenmaterial vom Juni 2008 und Mai 2009 (Abb. 32 & 33). Nach den Inkubationen zeigte sich, dass eine Nitritkonzentration von 30 mM teilweise hemmend auf die Organismen wirkt. Dies konnte durch geringere Prozentanteile der Gesamtzellfettsäuren bei Inkubationen mit 30 mM Nitrit abgelesen werden.

In Abbildung 10 werden die Inkubationen bei 10°C dargestellt, welche für Proben vom Juni 2008, Januar 2009 und August 2009 durchgeführt wurden.



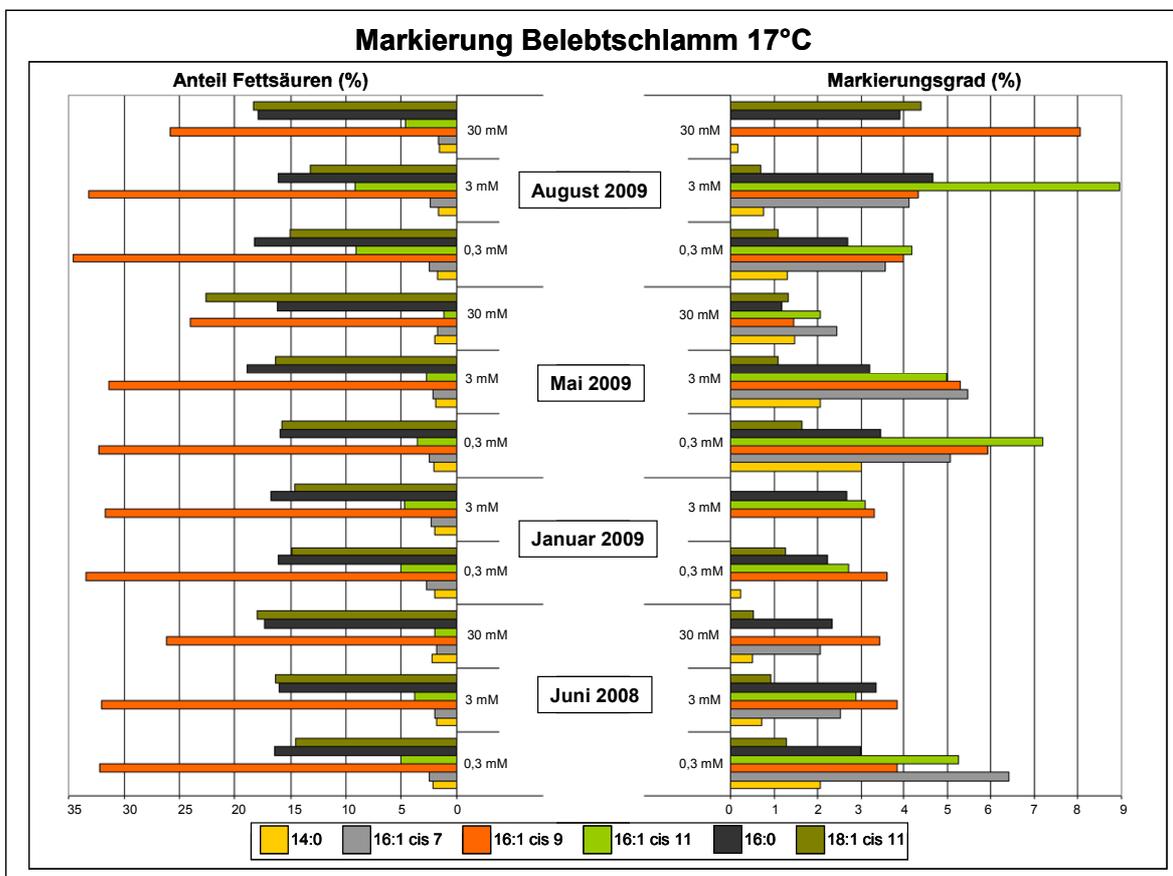
**Abbildung 10:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammproben vom Juni 2008, Januar 2009 und August 2009. Bei einer Inkubationstemperatur von 10°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Die Nitritkonzentrationen der Inkubationen vom Juni 2008 und August 2009 lagen bei 0,3 mM, 3 mM und 30 mM, die Nitritkonzentrationen im Januar 2009 lagen bei 0,3 mM und 3 mM. Im Juni 2008 konnte bei dieser Inkubationstemperatur kein

## Ergebnisse

erhöhter Einbau an  $^{13}\text{C}$  detektiert werden. Die inkubierten Proben vom Januar 2009 wiesen bei einer Nitritkonzentration von 0,3 mM eine erhöhte Markierung der Fettsäure 16:1 *cis* 9 mit Einbauraten von 5 % ( $p < 0,025$ ) auf. Für die Proben vom August 2009 konnten nach der Inkubation mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit Markierungsgrade von 8 – 12 % ( $p < 0,005$ ) der *Nitrospira* spezifischen Fettsäure 16:1 *cis* 11 ermittelt werden.

Die Inkubationen bei einer Temperatur von 17°C (Abb. 11) wurden für Proben vom Juni 2008, Januar 2009, Mai 2009 und August 2009 durchgeführt.



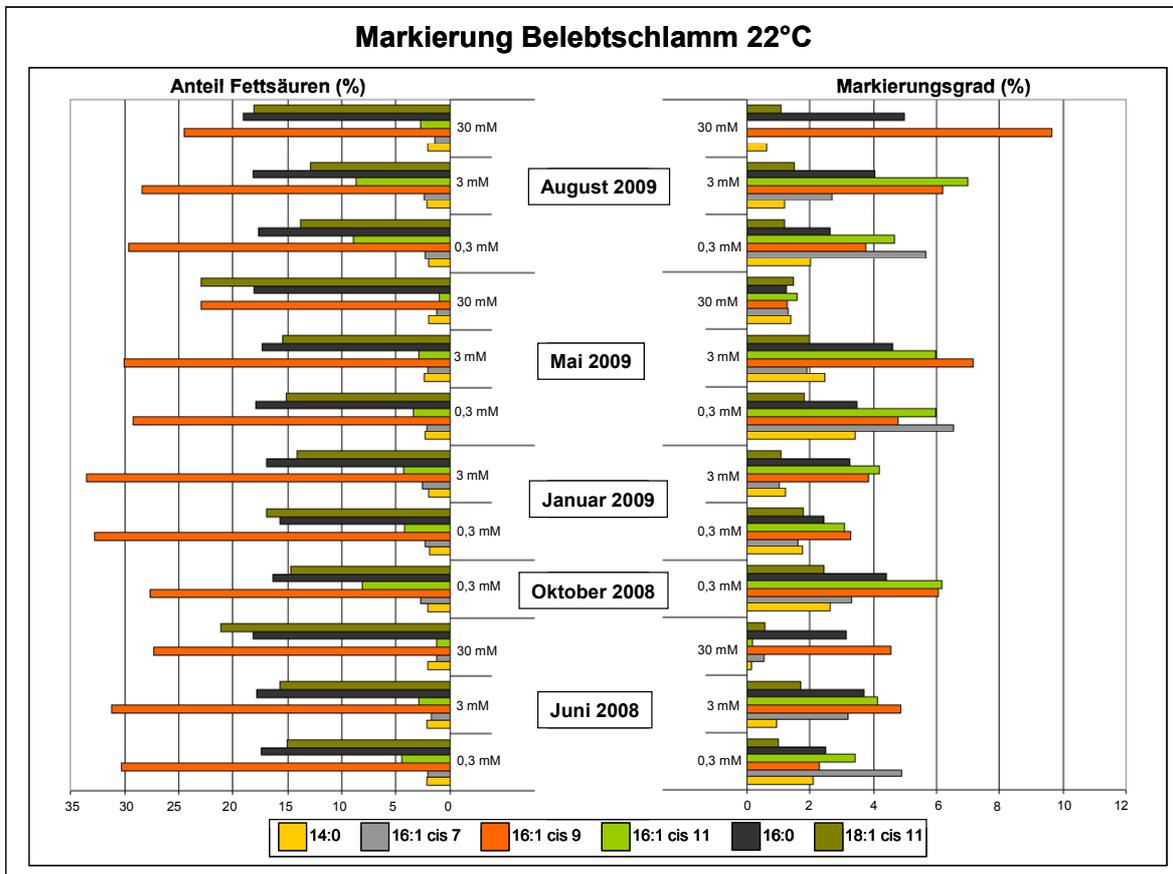
**Abbildung 11:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammproben vom Juni 2008, Januar 2009, Mai 2009 und August 2009. Bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Die Nitritkonzentrationen lagen bei den Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009 bei 0,3 mM, 3 mM und 30 mM Nitrit, für die Inkubation vom Januar 2009 wurden Nitritkonzentrationen von 0,3 mM und 3 mM gewählt. Die inkubierten Proben vom Juni 2008 wiesen einen erhöhten Einbau von 5 – 7 % in die

Fettsäuren 16:1 *cis* 7 ( $p < 0,05$ ) und 16:1 *cis* 11 ( $p < 0,005$ ) bei einer Nitritkonzentration von 0,3 mM auf. Die Proben vom Januar 2009 zeigten keine erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung. In den Proben vom Mai 2009 konnte ein Einbau in die *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren 16:1 *cis* 7 ( $p < 0,1$ ) und 16:1 *cis* 11 ( $p < 0,01$ ), mit Prozentanteilen von 5 – 7 %, sowie in die nicht von *Nitrospira* stammende Komponente 16:1 *cis* 9 ( $p < 0,025$ ), mit einem Markierungsgrad von 6 %, ermittelt werden. Die Proben vom August 2009 wiesen einen erhöhten Einbau in die Fettsäure 16:1 *cis* 11 bei den Nitritkonzentrationen 0,3 mM und 3 mM mit Prozentanteilen von 4 – 9 % ( $p < 0,005$ ) auf. Die Fettsäure 16:1 *cis* 7 wurde hier mit einem Einbau bei Nitritkonzentrationen von 0,3 mM und 3 mM mit Markierungsgraden von 4 – 5 % ( $p < 0,1$ ) analysiert. Die Fettsäure 16:1 *cis* 9 zeigte erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung bei 3 mM und 30 mM Nitrit mit Prozentanteilen von 4 – 8 % ( $p < 0,01$ ). Bei 30 mM Nitrit wurde mit 5 % ( $p < 0,05$ ) ein Einbau in die Fettsäure 18:1 *cis* 11 detektiert.

Die Abbildung 12 zeigt die Inkubationen bei einer Temperatur von 22°C. Die Proben für diese Inkubationstemperatur stammen vom Juni 2008, mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM, 3 mM und 30 mM, vom Oktober 2008, mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM, vom Januar 2009, mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit und vom Mai 2009 sowie August 2009, mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM, 3 mM und 30 mM. Im Juni 2008, Mai 2009 und August 2009 konnte bei einer Nitritkonzentration von 0,3 mM ein erhöhter Einbau in die Fettsäure 16:1 *cis* 7 mit Prozentanteilen von 4 – 7 % ( $p < 0,05$ ) detektiert werden. Das Lipid 16:1 *cis* 11 wies erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in den Proben vom Juni 2008 mit 3 mM Nitrit, im Oktober 2008 mit 0,3 mM Nitrit, im Januar 2009, Mai 2009 und August 2009 mit jeweils 0,3 mM und 3 mM Nitrit auf. Die Prozentanteile der Markierung lagen für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 zwischen 4 – 7 % ( $p < 0,025$ ). Die Komponente 16:1 *cis* 9 zeigte einen erhöhten Einbau in den Proben vom Juni 2008 und August 2009 mit 3 mM und 30 mM Nitrit. In den Proben vom Oktober 2008 wurde ein erhöhter Markierungsgrad in die Fettsäure 16:1 *cis* 9 bei einer Nitritkonzentration von 0,3 mM detektiert. Des Weiteren zeigte diese Fettsäure einen erhöhten Einbau in Proben vom Januar 2009 und Mai 2009 mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit. Die

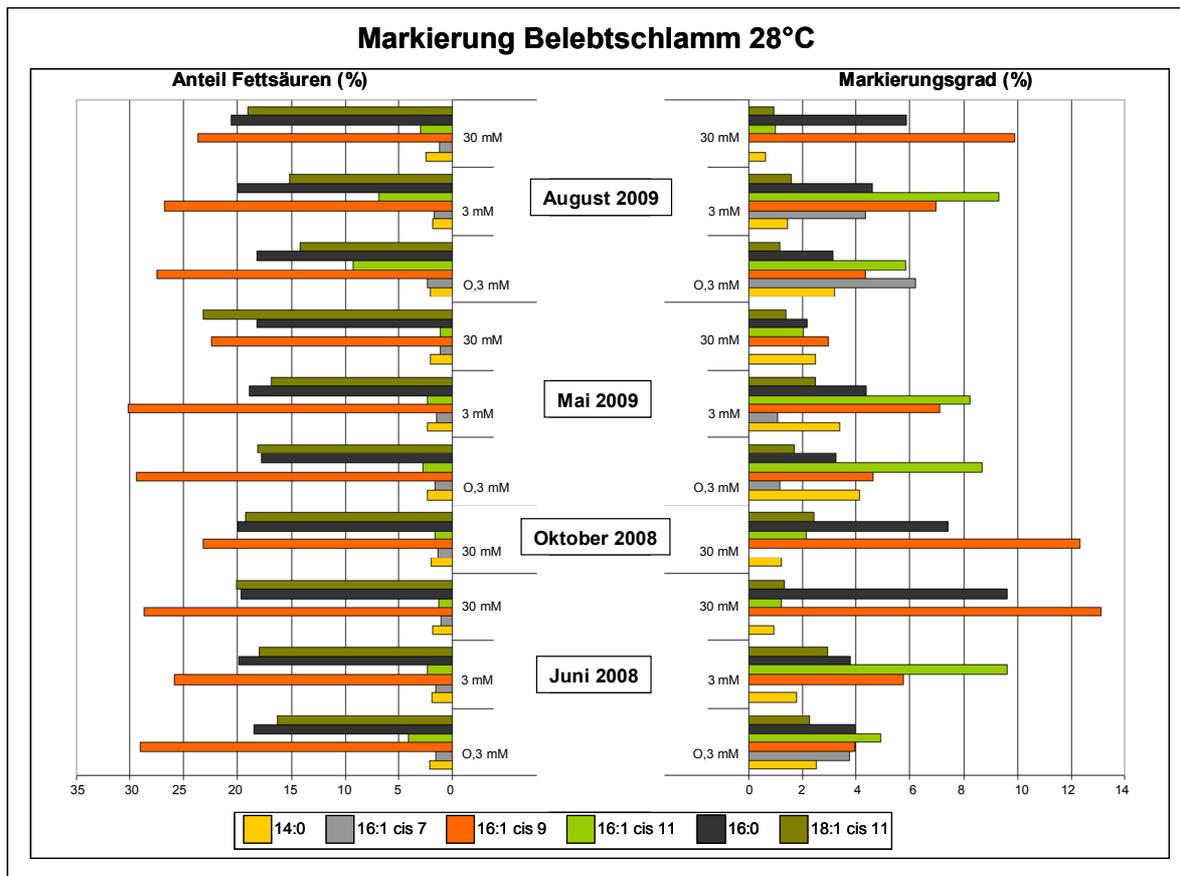
Prozentanteile der Markierung der Fettsäure 16:1 *cis* 9 lagen zwischen 4 und 10 % ( $p < 0,025$ ).



**Abbildung 12:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammproben vom Juni 2008, Oktober 2008, Januar 2009, Mai 2009 und August 2009. Bei einer Inkubationstemperatur von 22°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Die Inkubationen bei einer Temperatur von 28°C (Abb. 13) sind für Proben vom Juni 2008, Oktober 2008, Mai 2009 und August 2009 durchgeführt worden. Die Nitritkonzentrationen lagen für die Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009 bei 0,3 mM, 3 mM und 30 mM Nitrit. Die Probe vom Oktober 2008 wurde mit 30 mM Nitrit inkubiert. Diese Inkubationstemperatur wies für das Lipid 16:1 *cis* 7 einen erhöhte <sup>13</sup>C-Assimilierung mit Prozentanteilen von 4 – 7 % ( $p < 0,05$ ) in Proben vom August 2009 mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit auf. Die zweite spezifische Komponente für *Nitrospira*, die Fettsäure 16:1 *cis* 11, zeigte erhöhte Werte für den <sup>13</sup>C-Einbau in den Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009 bei Nitritkonzentrationen von 0,3 mM und 3 mM. Hier lagen die Prozentanteile der Markierung zwischen 5 und 10 % ( $p < 0,005$ ). Die Fettsäure 16:1 *cis* 9 zeigte

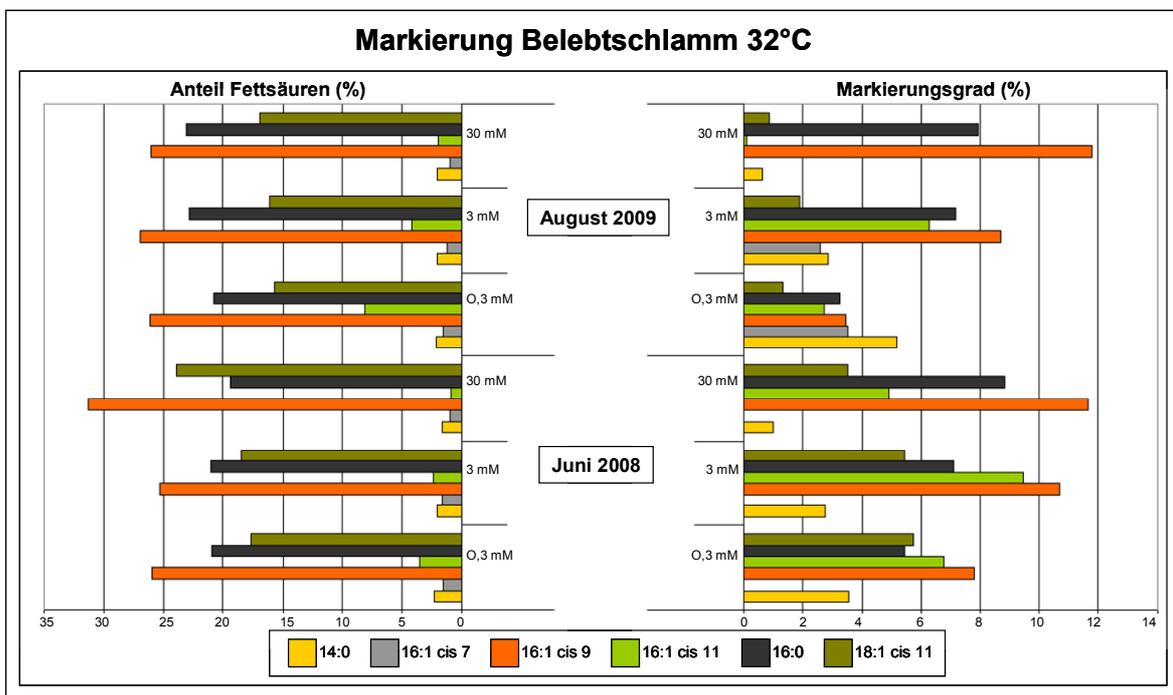
einen erhöhten Einbau in den Inkubationen vom Juni 2008 mit 3 mM und 30 mM Nitrit. Im Oktober 2008 konnte für die Fettsäure 16:1 *cis* 9 erhöhte <sup>13</sup>C-Assimilierung bei 30 mM Nitrit, sowie in den Inkubationen vom Mai 2009 mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit ermittelt werden. Im August 2009 wies diese Komponente Markierung bei allen Nitritkonzentrationen von 0,3 mM – 30 mM auf. Der höchste Wert an <sup>13</sup>C-Einbau wurde mit über 13 % ( $p < 0,005$ ) in der Inkubation vom Juni 2008 mit 30 mM Nitrit gemessen.



**Abbildung 13:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammproben vom Juni 2008, Oktober 2008, Mai 2009 und August 2009. Bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Die Inkubationen bei einer Temperatur von 32°C wurden mit Proben vom Juni 2008 und August 2009 durchgeführt (Abb. 14). Die Nitritkonzentrationen lagen für beide Inkubationstemperaturen bei 0,3 mM, 3 mM und 30 mM. Hier zeigte sich in den Markierungen vom Juni 2008 mit 0,3 mM Nitrit und 3 mM Nitrit ein erhöhter Einbau in die Fettsäuren 16:1 *cis* 9 ( $p < 0,005$ ), 16:1 *cis* 11 ( $p < 0,005$ ) und 18:1 *cis* 11 ( $p < 0,025$ ) mit Markierungsgraden zwischen 6 und 11 %. Bei einer

Nitritkonzentration von 30 mM konnte eine erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Einbaurrate, von 5 – 12 % ( $p < 0,005$ ) in die Hauptkomponenten 16:1 *cis* 9 und 16:1 *cis* 11 detektiert werden. Die Proben vom August 2009 wiesen bei einer Nitritkonzentration von 0,3 mM einen erhöhten Einbau in die Fettsäure 14:0 von 6 % ( $p < 0,05$ ) auf. Des Weiteren wurden Einbauraten von 6 bis 9 % ( $p < 0,005$ ) bei einer Nitritkonzentration von 3 mM Nitrit in die Fettsäure 16:1 *cis* 9 und die Fettsäure 16:1 *cis* 11 detektiert. Bei einer Nitritkonzentration von 30 mM zeigten sich erhöhte Werte an  $^{13}\text{C}$  in die Fettsäure 16:1 *cis* 9 mit Prozentanteilen an Markierung von 12 % ( $p < 0,005$ ).



**Abbildung 14:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammproben vom Juni 2008 und August 2009. Bei einer Inkubationstemperatur von 32°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Zusammenfassend kann dargestellt werden, dass die *Nitrospira*-spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 über das gesamte gewählte Temperaturspektrum zu allen Jahreszeiten nachgewiesen wurde. Die höchsten Markierungsgrade sind für diese Fettsäure bei einer Nitritkonzentration von 3 mM ermittelt worden. Weiter wurde eine zweite *Nitrospira*-spezifische Hauptkomponente im Belebtschlamm identifiziert, die Fettsäure 16:1 *cis* 7. Die Einbauraten in diese Komponente waren auf ein engeres Temperaturspektrum ausgelegt. Die höchsten Markierungsgrade konnten bei einer Temperatur von 17°C und 22°C mit 0,3 mM Nitrit nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte die nicht spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 9 hohe Werte

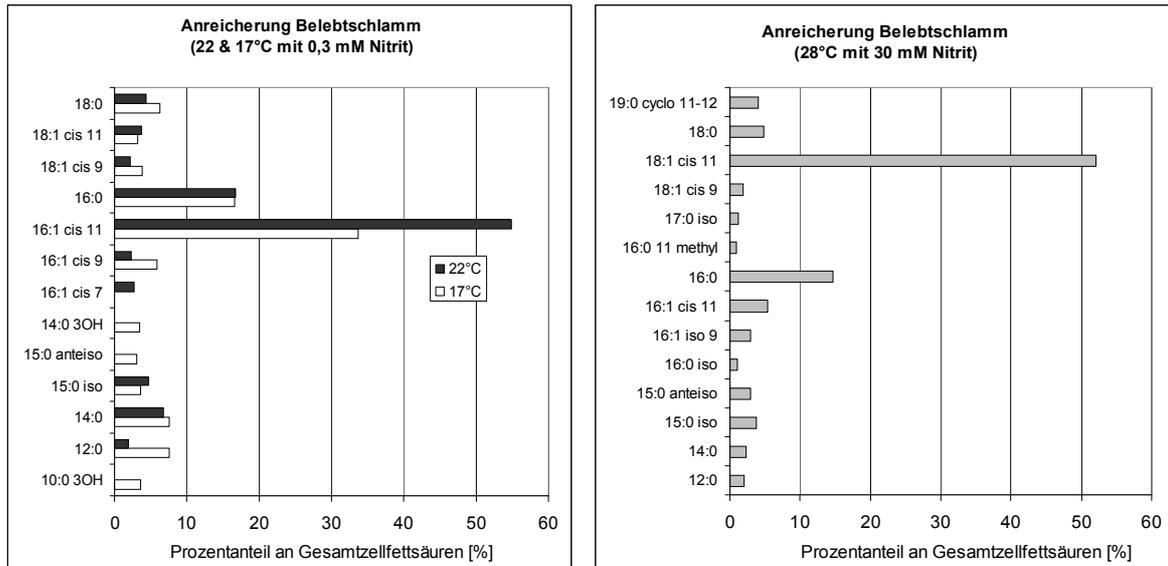
an  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung bei hohen Temperaturen von 28°C und 32°C mit hohen Nitritkonzentrationen von 30 mM. Dieser Einbau, mit einer Nitritkonzentration von 30 mM, wurde in den Proben vom Juni 2008, Oktober 2008 und August 2009 identifiziert, während dieses Lipid in den Proben vom Mai 2009 die hohen Werte für die  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung bei dieser hohen Nitritkonzentration nicht aufwies.

Die Fettsäure 16:1 *cis* 11 ist als Hauptkomponente für den Organismus *Candidatus Nitrospira defluvii* im Belebtschlamm bekannt, allerdings wurde die *Nitrospira*-spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 7 bisher nicht für Nitritoxidanten aus diesem Habitat identifiziert. Ähnliches gilt für die Komponente 16:1 *cis* 9. Diese nicht-spezifische Hauptkomponente ist zwar für das Betaproteobakterium *Nitrotoga* bekannt, allerdings sind nach bisherigen Erkenntnissen keine Nitritoxidanten beschrieben worden, welche diese Hauptkomponente besitzen und bei diesen Temperaturen und dieser hohen Nitritkonzentration metabolische Zellaktivität aufweisen können. Diese Anhaltspunkte wurden verwendet, um in einem kulturellen Versuchsansatz (siehe 3.3.2) die zugehörigen Organismen aus dem Habitat anzureichern und näher zu charakterisieren. Zusätzlich wurden molekularbiologische Analysen (siehe 3.3.3 und 3.3.4) durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über den vermutlich unbekanntem Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* zu erhalten.

### 3.3.2 Anreicherungen aus Belebtschlamm

Für den kulturellen Versuchsansatz sind die aus den Markierungsexperimenten erhaltenen Ergebnisse verwendet worden, um die optimale Temperatur und Nitritkonzentration für eine Anreicherung wählen zu können. Somit wurde für den unbekanntem Organismus der Gattung *Nitrospira*, mit der Fettsäure 16:1 *cis* 7 als Hauptkomponente eine Anreicherungstemperatur von 17°C und 22°C mit niedrigen Nitritkonzentrationen gewählt. Für den unbekanntem Organismus mit der nicht spezifischen Hauptkomponente 16:1 *cis* 9, wurde eine Temperatur von 28°C mit 30 mM Nitrit vorgenommen. Die Ergebnisse der ersten Anreicherungsversuche zeigen, dass es sich bei den erhaltenen Gesamtzellfettsäureprofilen um schon bekannte Profile für Nitritoxidanten handelt (Abb. 15).

## Ergebnisse



**Abbildung 15:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren erster Anreicherungsversuche der neuen autotrophen Bakterien. Der neue Organismus von *Nitrospira* mit der Hauptfettsäure 16:1 *cis* 7 bei 17 und 22°C mit 0,3 mM Nitrit. Der neuen Organismus, welcher die Hauptfettsäure 16:1 *cis* 9 enthält bei 28°C mit 30 mM Nitrit.

In den Inkubationen bei 17°C bzw. 22°C mit 0,3 mM Nitrit konnte die Hauptfettsäure 16:1 *cis* 11, welche die Hauptkomponente für den Organismus *Candidatus Nitrospira defluvii* ist, mit Prozentanteilen an Gesamtfettsäuren von 34 – 55 % detektiert werden. In der Anreicherung von Belebtschlamm bei 28°C mit 30 mM Nitrit wurde die Hauptkomponente von *Nitrobacter*, die 18:1 *cis* 11, mit einem Prozentanteil an Gesamtfettsäuren von 52 % identifiziert.

Weitere Anreicherungen zu den Nitritoxidanten mit der *Nitrospira*-spezifischen Hauptkomponente 16:1 *cis* 7, werden unter den Kulturnamen „Bs\_17“ und „Bs\_22“ fortgeführt (Tab. 3). Im Unterschied zu den ersten Anreicherungen bei diesen Temperaturen, sind für diese neuen Kulturen größere Nitritgabeintervalle gewählt worden, so wurden die wöchentlichen Nitritzugaben auf 14-tägig reduziert. Für die nicht-spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 9 erfolgt eine weitere Anreicherung unter dem Kulturnamen „Bs\_28“ (Tab. 3). Die erste Anreicherung ist mit Nitritgaben von 3 mM gestartet worden, welche dann langsam erhöht wurden. Die neue Anreicherung erfolgt sofort mit einer Nitritkonzentration von 30 mM, welche nach Verbrauch wieder eingestellt wird. Die Kultur „Bs\_17“ wurde darüber hinaus für die molekularbiologische Analyse mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt (siehe hierzu 3.3.4).

### 3.3.3 Sequenzanalysen der 16S rRNA aus Belebtschlamm

Basierend auf den Ergebnissen der FAME-SIP Analyse aus Belebtschlamm, erfolgen 16S rRNA Sequenzanalysen mit den spezifischen Primersystemen (Tab. 5 & 6) für die Gattung *Nitrospira*. Hierzu wurden DNA-Extraktionen aus den <sup>13</sup>C-markierten Proben vom Juni 2008 und August 2009, welche bei 17°C mit 0,3 mM Nitrit inkubiert worden sind, vorgenommen. Die Auswahl dieser Proben erfolgte aufgrund der hier vorliegenden hohen <sup>13</sup>C-Assimilierung in die *Nitrospira* spezifische Fettsäure 16:1 cis 7. Die DNA aus den Proben wurde mit den für die Gattung *Nitrospira* spezifischen Primersystemen Jur8F/NS1036R, Jur8F/NS1470R und NS663F/Jur1529R amplifiziert. Auf die Amplifikation der Proben mit dem Primersystem Jur8F/NS1111R wurde verzichtet, da der Primer NS1111R für das Defluvii-Cluster entwickelt wurde. Das Primersystem Jur8F/NS1470R, bei dem der Primer NS1470R für das Moscoviensis-Cluster entwickelt worden ist, lieferte keine erfolgreiche Amplifikation der DNA aus Belebtschlamm. Die erhaltenen Amplifikate der Primersysteme Jur8F/NS1036R und NS663F/Jur1529R sind in die Klonierung eingesetzt worden. Über die Amplifikate des Primersystems NS663F/Jur1529R wurden klonierte Sequenzen identifiziert, die eine Übereinstimmung von 100 % zu der bekannten 16S rRNA Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii* (Acc. Nr. DQ059545) aufweisen. Hierbei handelte es sich um einen klonierten Bereich von 717 Basenpaaren. Der verwendete Primer NS663F ist nicht für ein Cluster der Gattung *Nitrospira* spezifisch. Des Weiteren konnten mit dem Primersystem Jur8F/NS1036R, klonierte Sequenzen ermittelt werden, die zu der 16S rRNA Gensequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii* (Acc. Nr. DQ059545), Unterschiede in den Basenpositionen 190 und 1056 (Abb. 16) aufweisen. Der klonierte Bereich umfasst eine Länge von 1019 Basenpaaren und zeigt eine Sequenzsimilarität von 99,8 % zu der 16S rRNA Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii*. Die Sequenzen waren sowohl in den Proben vom Juni 2008, sowie in den Proben vom August 2009 nachweisbar. Der spezifische Primer NS1036R wurde für das Marina-Cluster entwickelt und weist zu der Sequenz *Candidatus Nitrospira defluvii* eine Base Unterschied auf.

Der Basenunterschied an Position 190 ist verwendet worden, um eine Cy3-markierte Oligonukleotidsonde zu entwickeln (blauer Kasten, Abb. 16).

## Ergebnisse

BS_17_03_So08_clone1	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 GCG <b>A</b> 1056
BS_17_03_So08_clone2	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 GCG <b>A</b> 1056
BS_17_03_So08_clone3	182 ..... 199	1053 GCG <b>A</b> 1056
BS_17_03_So09_clone4	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 .... 1056
BS_17_03_So09_clone5	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 GCG <b>A</b> 1056
BS_17_03_So09_clone6	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 .... 1056
BS_17_03_So09_clone7	182 CGCCTCCG <b>G</b> ATCTTCGGG 199	1053 GCG <b>A</b> 1056
<i>Cand. Ns. defluvii</i>	182 CGCCTCCG <b>A</b> ATCTTCGGG 199	1053 GCG <b>T</b> 1056
<i>Ns. moscoviensis</i> M-1	182 CGATTCCC <b>G</b> ACTGCGGT 199	1053 GCG <b>T</b> 1056

**Abbildung 16:** Ausschnitt aus dem Alignment für Sequenzen aus der Klonierung der Belebtschlammproben (Juni2008/August2009) mit Sequenzinformationen von *Candidatus Ns. defluvii* (Acc. Nr. DQ059545) und *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558) als Referenz. Die unterschiedlichen Basenpaare an der Position 190 und 1056 sind in rot dargestellt. Die blaue Box markiert die Sequenz welche für die Sonde zur Detektion des *Nitrospira* aus Belebtschlamm eingesetzt wurde, die grüne Box markiert die Zielsequenz der Kompetitorsonde, welche auf die Sequenz von *Candidatus Ns. defluvii* (Acc. Nr. DQ059545) passt. Positionsangaben der Basenpaare nach *E. coli* (BROSIOUS et al., 1978).

Diese wurde mit einer auf die 16S rRNA-Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii* (Acc. Nr. DQ059545) passenden Kompetitorsonde eingesetzt (grüner Kasten, Abb. 16). Die 16S rRNA Sequenzinformationen zu der Sondensequenz (blauer Kasten Abb. 16) weisen zu den 16S rRNA Sequenzinformationen der Reinkulturen *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558), *Nitrospira calida* (Acc. Nr. HM485589) und *Nitrospira marina* Nb-295 (Acc. Nr. X82559) Unterschiede an 6 – 10 Positionen auf. Als Referenz ist die 16S rRNA-Information von *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558) in Abbildung 16 dargestellt. Die Oligonukleotidsonde und die Kompetitorsonde wurden in Analysen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung verwendet (siehe 3.3.4).

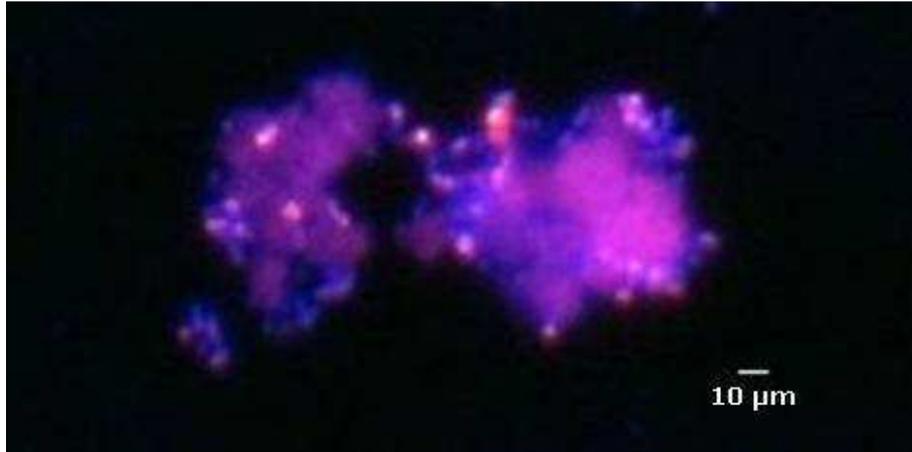
### 3.3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung für Anreicherungen aus Belebtschlamm

Der Unterschied in den Basen an der Position 190 diene als Grundlage für die Entwicklung der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde auf Basis der 16S rRNA Informationen für den unbekanntem Organismus der Gattung *Nitrospira* (siehe blauer Kasten, Abb. 16). Diese Sonde wurde in Kombination mit einer nicht markierten Kompetitorsonde eingesetzt. Diese Kompetitorsonde enthielt die Information der 16S rRNA-Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii* an der Position 190 (siehe grüner Kasten, Abb. 16). Nachfolgende Abbildungen zeigen

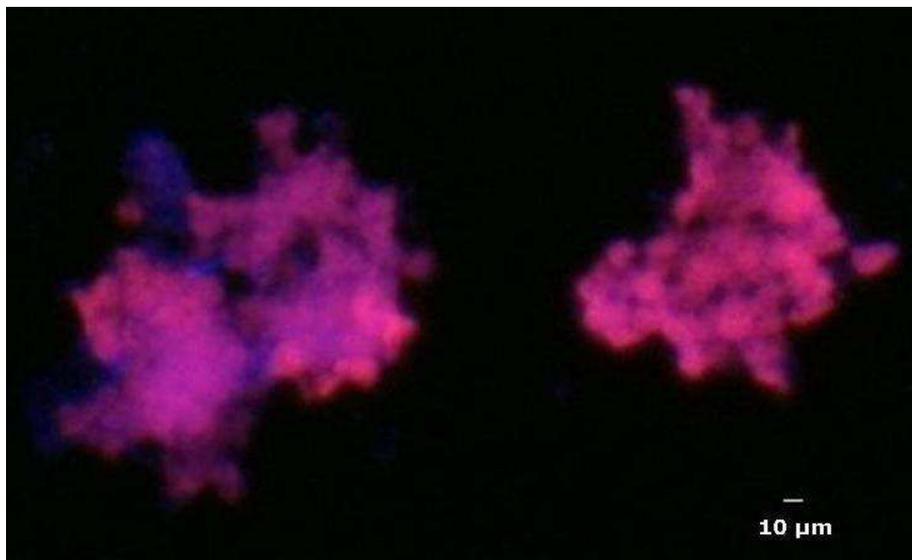
die Ergebnisse der neu entwickelten Cy3-markierten Sonde NS177A, welche in Kombination mit der nicht markierten Kompetitorsonde NS177B in die Analysen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt worden sind. Zusätzlich wurden die *Bacteria* spezifische Cy3-markierte Sonde EUB338 (AMANN et a. 1990) und die *Nitrospira* spezifische Cy3-markierte Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al. 2001) eingesetzt (Sondeninformationen Tab. 7).

Die fluoreszierenden Farbstoffe sind, bedingt durch das eingesetzte Filtersystem (FS28 von Zeiss (Jena); siehe auch 2.3.5), bei einer Bindung der beiden Farbstoffe DAPI und Cy3 überlagert dargestellt. Hieraus resultierte die Mischfarbe Purpur, welche die Bindung beider Farbstoffe im mikroskopischen Bild anzeigt. Die Zellen an denen nur der Farbstoff DAPI gebunden wurde, erschienen im mikroskopischen Bild blau. Die Hybridisierungen mit einer Formamidkonzentration von 35 % und einer Hybridisierungstemperatur von 46°C gaben bei allen in dieser Studie verwendeten Oligonukleotidsonden die besten Resultate. Die Cy3-markierte Sonde NS177A und die Kompetitorsonde NS177B sind als Gemisch (1:1, v/v) eingesetzt worden. In den nachfolgenden Beschreibungen wird nur die Sonde NS177A angegeben, welche zusätzlich immer die Kompetitorsonde NS177B enthielt.

Die Prüfung der Spezifität der Sondenkombination, bestehend aus der Cy3 markierten Sonde für den unbekanntem Organismus der Gattung *Nitrospira* und der nicht markierten Kompetitorsonde, erfolgte mit einer Anreicherung von *Candidatus Nitrospira defluvii*. Die Ergebnisse hierzu sind in den Abbildungen 17 bis 19 dargestellt. Die Ergebnisse zur Hybridisierung mit der Sonde EUB338 (AMANN et a. 1990) sind in Abb. 17 gezeigt. Die FISH-Ergebnisse zur Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al. 2001) werden in Abb. 18 dargestellt. Unter den gewählten Konditionen konnte die Bindung dieser beiden Cy3-markierten Sonden an das Zellmaterial von *Candidatus Ns. defluvii*, erzielt werden. Dies wurde durch die purpurfarbenen Zellen klar dargestellt. Die Zellen von *Candidatus Nitrospira defluvii* wiesen im mikroskopischen Bild kokkoide Strukturen auf und lagen in Kolonien vor, welche teilweise an nicht bakterielle Strukturen angeheftet waren.

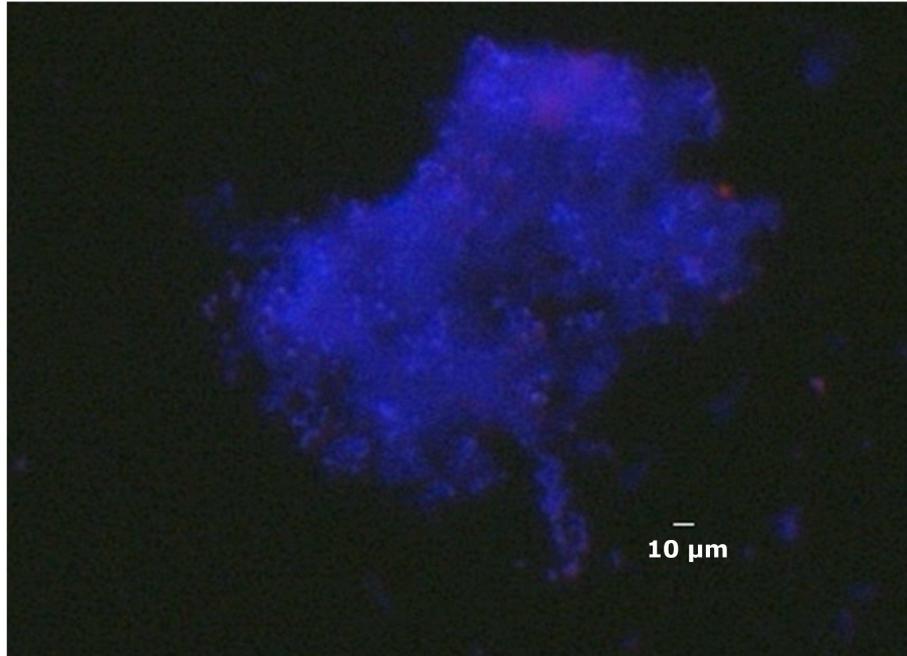


**Abbildung 17:** Sonde EUB338 (AMANN et al., 1990) mit einer Anreicherung von *Candidatus Nitrospira defluvii*



**Abbildung 18:** Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al., 2001) mit einer Anreicherung von *Candidatus Ns. defluvii*

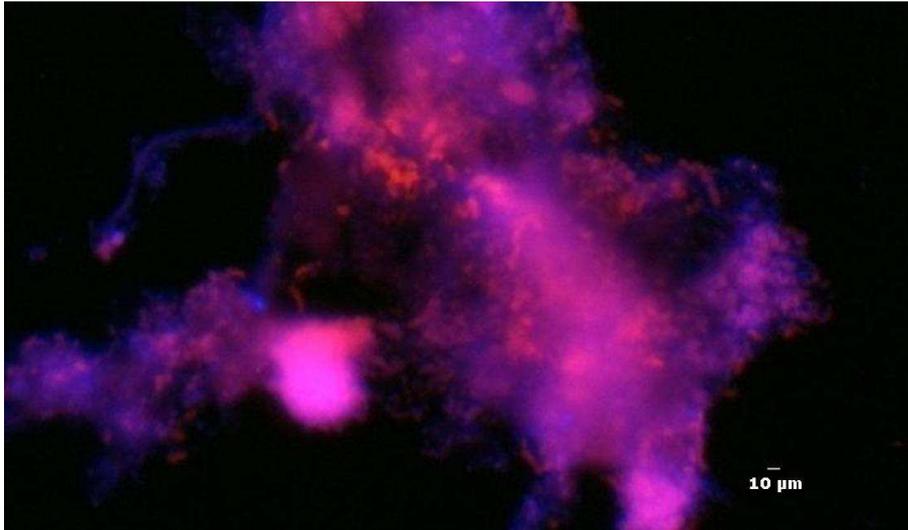
Die Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung des Zellmaterials von *Candidatus Ns. defluvii* mit der Sonde NS177A. Diese Sonde bindet nicht an das Zellmaterial von *Candidatus Ns. defluvii*, die Zellen werden nur mit DAPI erfasst, was durch die blaue Färbung sichtbar wurde.



**Abbildung 19:** Oligonukleotidsonde NS177A mit einer Anreicherung von *Candidatus* Ns. defluvii

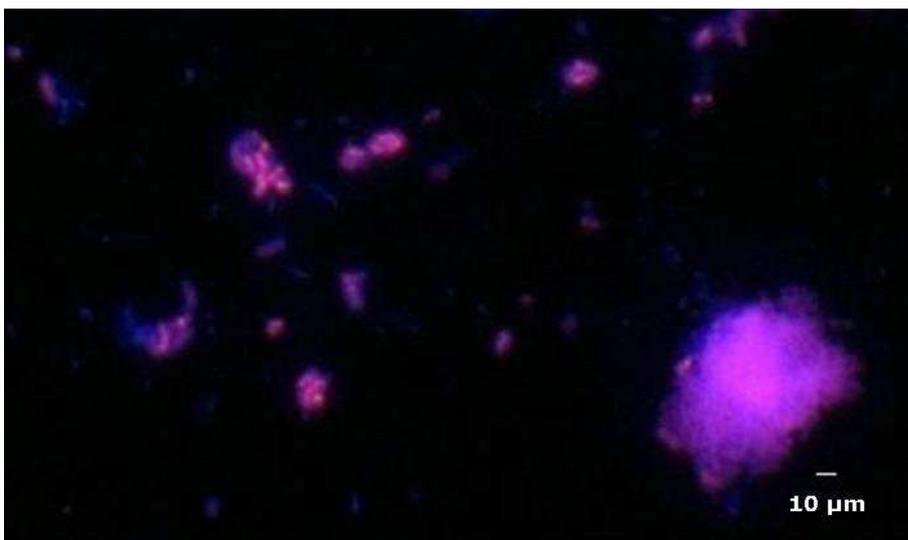
Die Ergebnisse belegen, dass durch die Kombination der nicht markierten Kompetitorsonde NS177B und der zusätzlich abweichenden Zielsequenz der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde NS177A, die Cy3-markierte Bindung an die rRNA von *Candidatus* Nitrospira defluvii verhindert werden konnte.

Die Abbildungen 20 bis 25 stellen die Ergebnisse der Anreicherung (Tab. 3) für die Gattung *Nitrospira* aus Belebtschlamm („Bs\_17“) mit einer Inkubationstemperatur von 17°C und niedrigen Nitritkonzentrationen von 0,3 mM dar. Die Abbildung 20 zeigt die Hybridisierung mit der Sonde EUB338 (AMANN et al. 1990). Die Zellen wurden von der Cy3-markierten Sonde und durch DAPI gefärbt, was die purpurfarbenen Strukturen belegen. Es handelte es sich um dicht gepackte große Kolonien, welche teilweise an Belebtschlamm angeheftet waren. Zellmorphologisch lagen unterschiedliche Zelltypen vor, welche nicht weiter differenziert werden konnten.



**Abbildung 20:** Sonde EUB338 (AMANN et al., 1990) mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)

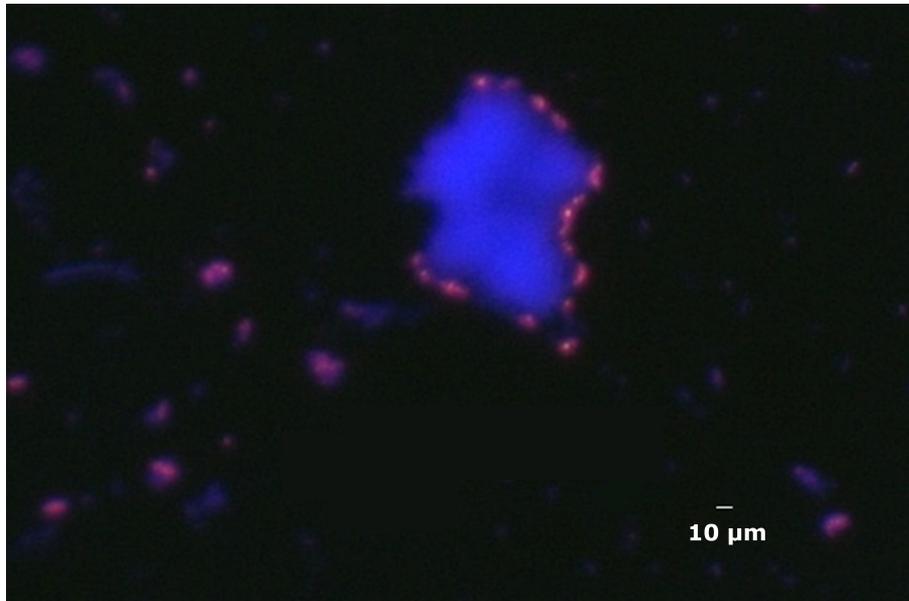
In der Abbildung 21 ist die Hybridisierung mit der Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (Daims et al. 2001) dargestellt. Hier wurden zwei Zelltypen analysiert, welche eine Bindung an die Cy3-markierte Sonde und an DAPI aufwiesen. Es handelte sich um Kolonien und einzelne Zellen, welche verschiedene Zellmorphologien zeigten. Bei den Kolonien handelte es sich um kokkoide Formen und bei dem zweiten Zelltyp sind stäbchenförmige Strukturen identifiziert worden, welche in kleineren Verbänden, oder einzeln vorliegend identifiziert wurden.



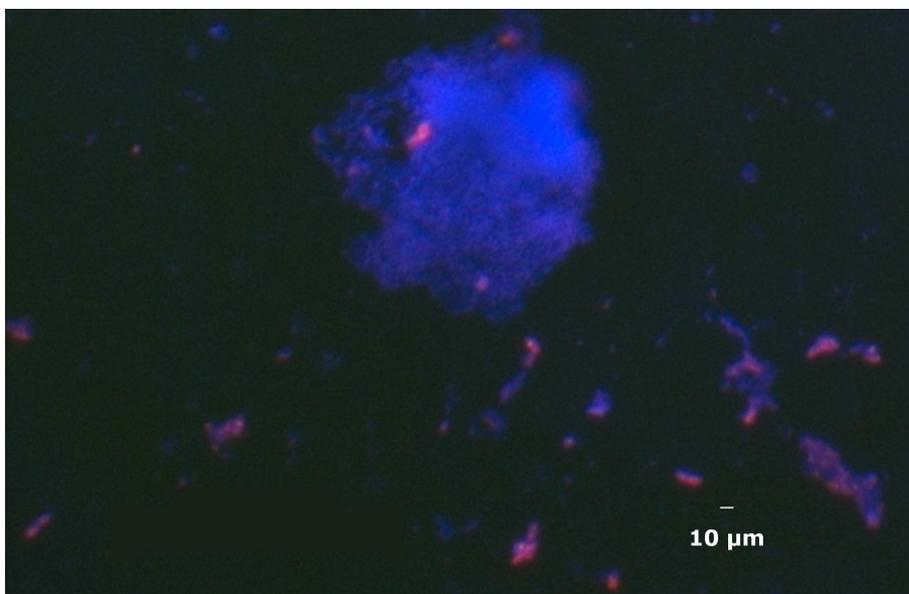
**Abbildung 21:** Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al., 2001) mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)

Die Abbildungen 22– 25 zeigen Zellen aus der Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“) mit der Sonde NS177A. Die Ergebnisse belegen, dass die Zellen, welche

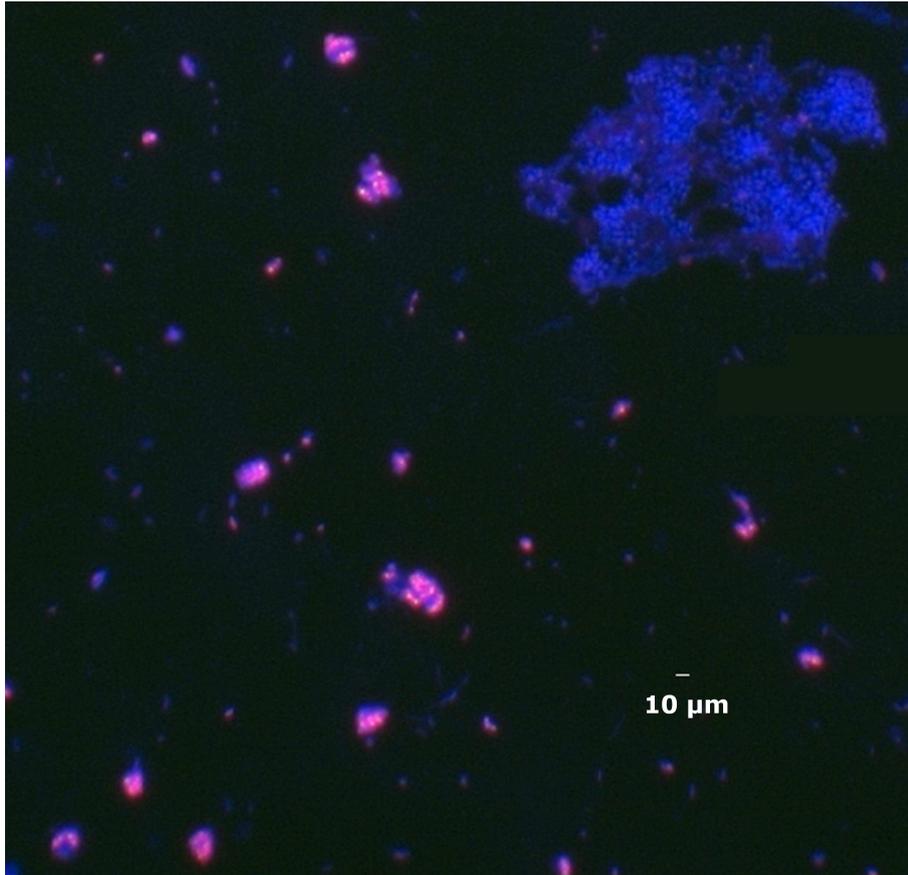
zellmorphologisch eine stäbchenförmige Form aufwiesen und nur in kleineren Verbänden oder frei vorlagen, von der neu entwickelten Sonde erfasst wurden. Während die Kolonien mit den zellmorphologisch kokkoiden Strukturen nur die DAPI-Färbung aufwiesen.



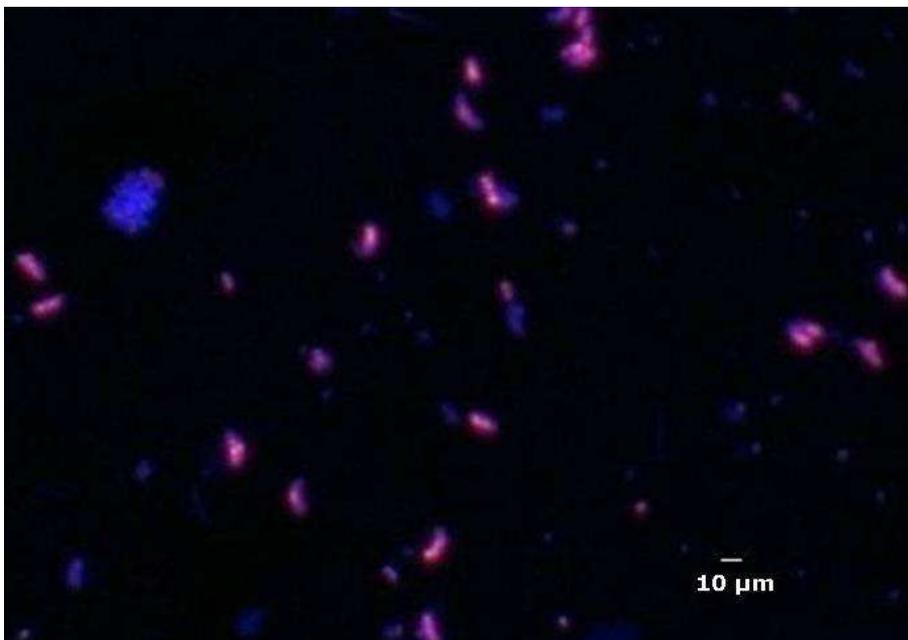
**Abbildung 22:** Oligonukleotidsonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)



**Abbildung 23:** Oligonukleotidsonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)



**Abbildung 24:** Oligonukleotidsonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)



**Abbildung 25:** Oligonukleotidsonde NS177A mit Nitrospira-Anreicherung („BS\_17“)

### 3.4 Ergebnisse zum Biofiltermaterial aus marinen Fischfarmen

Nachfolgend sind die Ergebnisse der FAME-SIP Analysen des Biofiltermaterials aus den marinen Fischfarmen Büsum und Strande dargestellt. Die Ergebnisse der Markierungsexperimente unter Beschränkung auf die relevanten Komponenten der autotrophen Nitrit-oxidierenden Gemeinschaft (siehe auch Tab. 1) werden in den Abbildungen 26 – 29 gezeigt. Die ausführlichen Profile der Gesamtfettsäuren mit den dazugehörigen Markierungsgraden sind im Anhang (Abb. 53; 55 - 61) aufgeführt. Wie schon für die Untersuchungen aus Belebtschlamm beschrieben worden ist, werden Fettsäuren mit einer Gesamt-Abundanz  $\leq 1000$  nicht berücksichtigt. Basierend auf dem einseitigen Student *t*-Test konnte für die Fettsäuren aus dem Biofiltermaterial ein Schwellenwert für eine signifikant markierte Fettsäure von 3,7 % ( $p < 0,1$ ) ermittelt werden. In den nachfolgend dargestellten Untersuchungen werden alle Markierungsgrade  $\geq 4$  % als signifikanter Einbau gewertet, zusätzlich sind die Wahrscheinlichkeitswerte  $p$  für wichtige Einbauraten in einzelne Fettsäuren im Text angegeben. Durch die  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in die einzelnen Lipide können Rückschlüsse auf die aktive autotrophe Bakteriengemeinschaft im Biofiltermaterial gezogen werden. Als Index für diese Aktivität wurden die Hauptfettsäuren der bekannten Nitrit-oxidierenden Bakteriengemeinschaft gewählt, wobei zu beachten war, dass es sich nur bei den Hauptfettsäuren für *Nitrospira* um für die Gattung spezifische Hauptkomponenten handelt. Dennoch liefern die nicht spezifischen Hauptkomponenten für die Gattung *Nitrococcus* (Fettsäure 16:1 *cis* 9 in Kombination mit Fettsäure 18:1 *cis* 11), die Gattung *Nitrobacter* (Fettsäure 18:1 *cis* 11) und dem Betaproteobakterium *Nitrotoga* (Fettsäure 16:1 *cis* 9) Hinweise auf die Relevanz der unterschiedlichen Nitritoxidanten im System. Alle Hauptkomponenten der Nitritoxidanten konnten in den beiden Aquakulturanlagen von Strande und Büsum detektiert werden. Weiter zeigte sich, dass die Hauptfettsäure 14:0 nur in den Proben aus Strande vorhanden war. Diese Fettsäure ist in Kombination mit der Fettsäure 16:1 *cis* 9 ein Indiz auf die mögliche Anwesenheit der Gattung *Nitrospina*. Die spezifischen Hauptkomponenten für die Gattung *Nitrospira*, welche für alle untersuchten Biofilter detektiert wurden, waren die Fettsäuren 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11. Die Fettsäure 16:0 weist nicht auf einen Organismus im Habitat hin. Es handelt sich

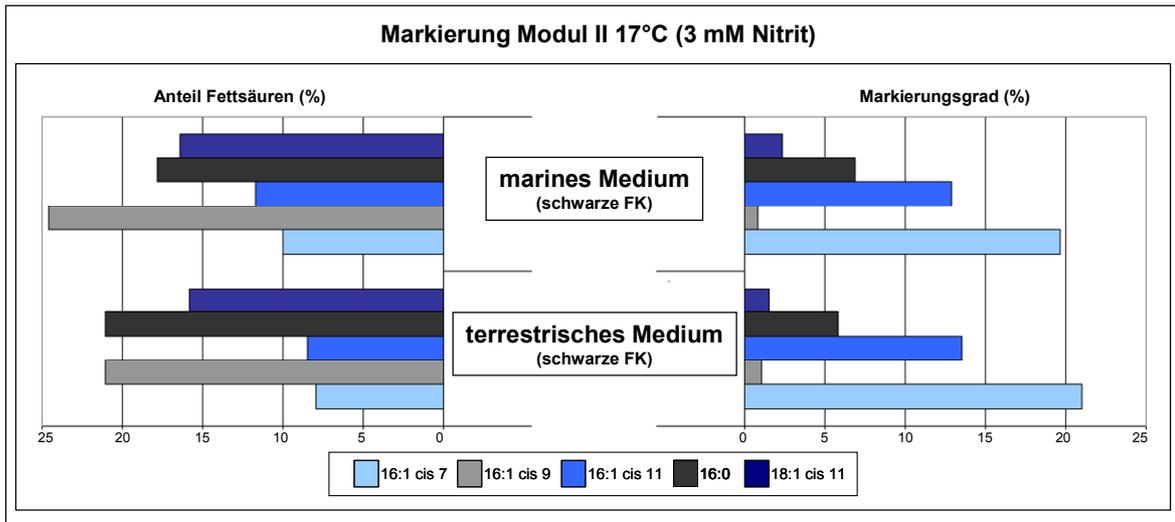
bei dieser Fettsäure um eine Hauptkomponente von vielen Bakterien, daher werden die Markierungen dieser Fettsäure in den Grafiken mit dargestellt, allerdings wird in den nachfolgenden Ausführungen nicht weiter auf den Einbau in diese Komponente eingegangen.

### 3.4.1 FAME-SIP Analysen mit Proben aus Büsum und Strande

Die FAME-SIP Analysen der Biofiltersysteme der marinen Fischfarmen Büsum und Strande wurden mit Biofiltermaterial aus Modul II (Abb. 26) für die Fischfarm Büsum und für die Fischfarm in Strande mit Material der Filteranlagen Shrimp (gemischte FK), Barramundi (weiße FK) und Barramundi (schwarze FK) (Abb. 27) durchgeführt. Die Temperaturen und Nitritkonzentrationen der Proben aus Büsum und Strande erfolgten in Anlehnung an die natürlich vorherrschenden Parameter der Biofiltersysteme. Des Weiteren sind Untersuchungen, welche außerhalb der Parameter im natürlichen System lagen durchgeführt worden, so wurden einige Analysen mit terrestrischem und marinem Mineralmedium durchgeführt und extreme Temperaturparameter und Nitritkonzentrationen getestet.

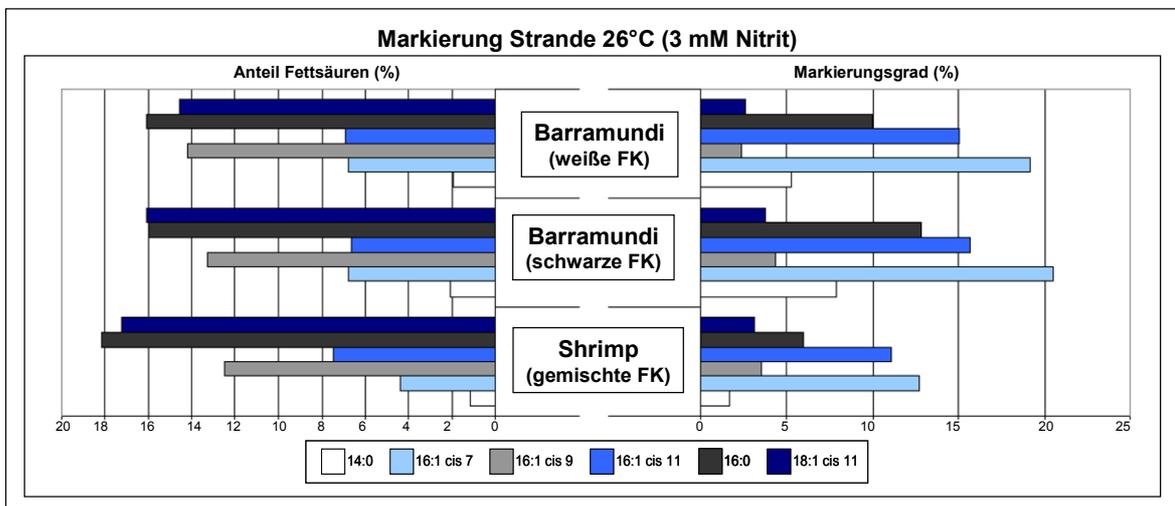
Für die marine Fischfarm in Büsum erfolgte die Inkubation der schwarzen Füllkörper (schwarze FK) bei 17°C mit 3 mM Nitrit in terrestrischem und marinem Mineralmedium (KEUTER et al., eingereicht). Die unterschiedlichen Medien resultieren aus Wachstumsversuchen, welche für dieses System durchgeführt worden sind. Die Fettsäure 14:0 wurde im Originalmaterial (Abb. 52) aus dem Biofilter detektiert, nach der Inkubation war diese allerdings nicht mehr vorhanden. Die Hauptkomponenten für *Nitrotoga*, *Nitrococcus* und *Nitrobacter*, die Fettsäuren 16:1 *cis* 9 und 18:1 *cis* 11 konnten nachgewiesen werden, zeigen aber keine <sup>13</sup>C-Assimilierung. Unter den gewählten Bedingungen wiesen nur die spezifischen Fettsäuren für die Gattung *Nitrospira* einen Einbau von 20 – 21 % ( $p < 0.005$ ) für die Fettsäure 16:1 *cis* 7 und einen Einbau von 13 – 14 % ( $p < 0.005$ ) für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 auf (Abb. 26).

## Ergebnisse



**Abbildung 26:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Biofilterproben aus Büsum. Biofilterproben aus Modul II. Proben bei 17°C in marinem und terrestrischem Mineralmedium inkubiert, mit einer Nitritkonzentration von 3 mM.

Die ersten Markierungen der Proben aus den drei Biofiltersystemen der Anlage in Strande sind bei 26°C mit einer Nitritkonzentration von 3 mM durchgeführt worden (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Biofilterproben aus Strande. Biofilterproben aus der Barramundi-Anlage und Shrimp-Anlage. Bei einer Inkubationstemperatur von 26°C, mit 3 mM Nitrit.

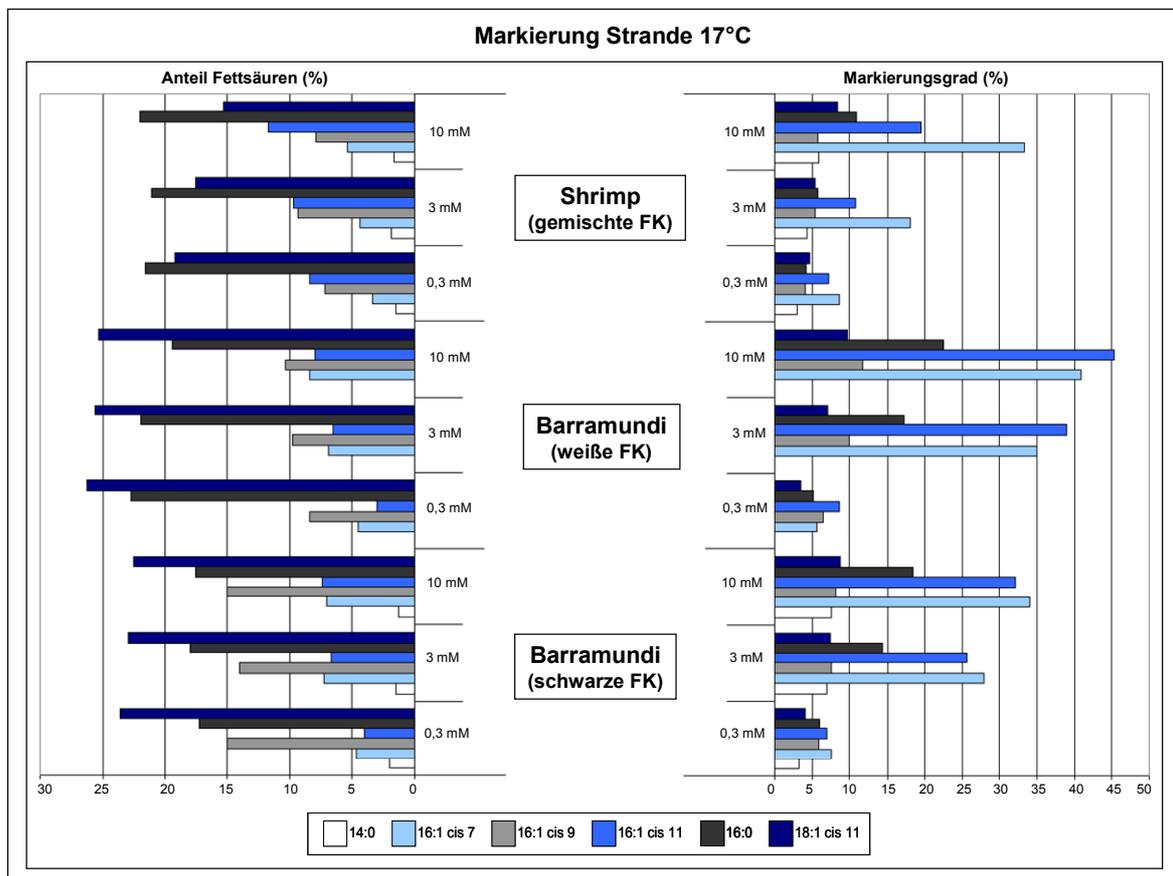
Für die Fettsäure 16:1 cis 9 wurde ein Einbau von knapp 5 % ( $p < 0.05$ ) in der Probe aus dem Biofiltersystem Barramundi (schwarze FK) detektiert. Die Fettsäure 14:0 zeigte einen erhöhten Einbau von 5 – 8 % ( $p < 0.1$ ) in den Proben der Biofilter Barramundi (weiße und schwarze FK). Die *Nitrospira*-spezifischen

## Ergebnisse

Fettsäuren wiesen sehr hohe Einbauraten in den Proben aus allen drei Biofiltersystemen auf. Für die Fettsäure 16:1 *cis* 7 konnten  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen von 13 – 21 % ( $p < 0.005$ ) detektiert werden. Für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 konnten Einbauraten zwischen 11 – 16 % ( $p < 0.025$ ) ermittelt werden.

### 3.4.2 FAME-SIP und 16S rRNA Sequenzanalysen der Biofilter aus Strande

In einem erweiterten Versuchsansatz sind die Füllkörper (FK) aus dem Shrimp- und Barramundi-Filtersystemen der Aquakulturanlage in Strande bei 17°C und 28°C mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 10 mM belegt worden (Abb. 28 & 29). Diese Parameter wurden gewählt, um ein möglichst breites Spektrum der natürlichen Bedingungen, sowie Stressparameter, analysieren zu können.

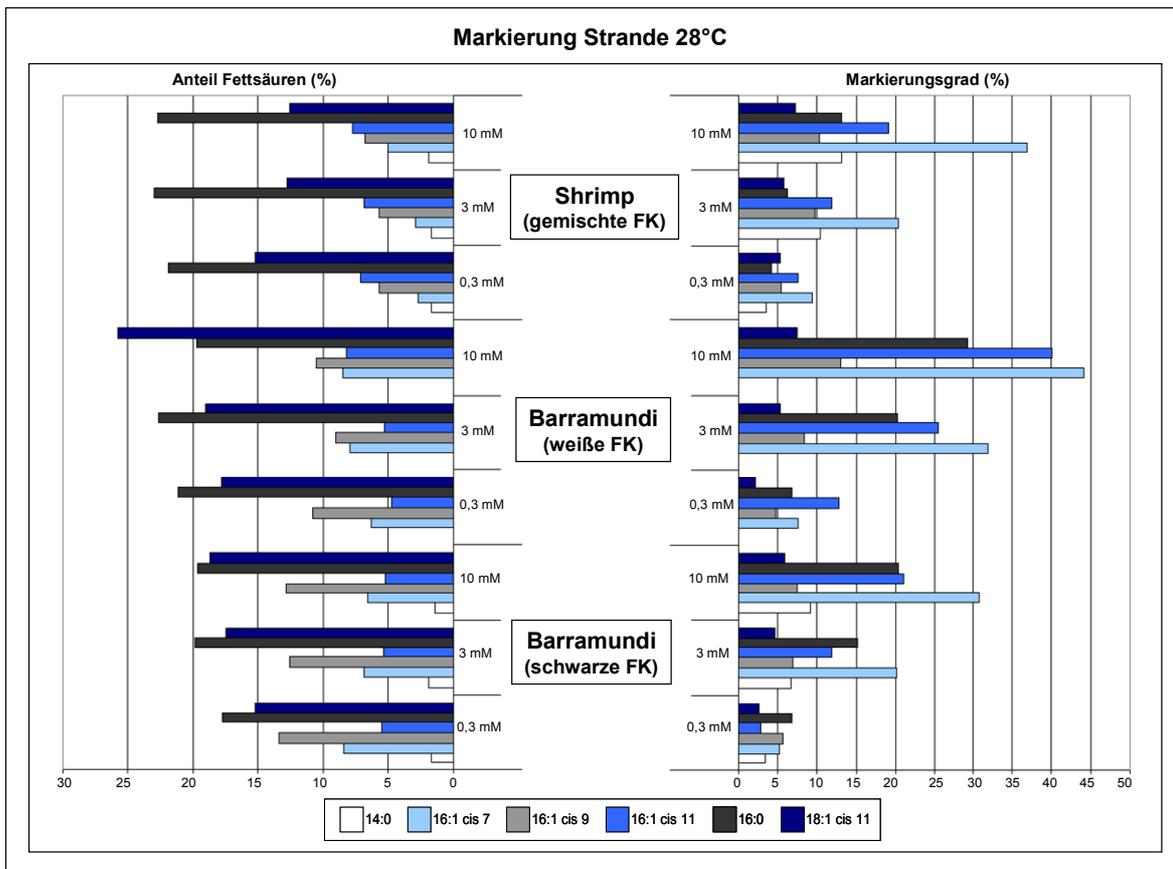


**Abbildung 28:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Biofilterproben aus Strande. Biofilterproben aus der Barramundi-Anlage und Shrimp-Anlage. Bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Bei beiden Inkubationstemperaturen zeigte sich, dass die Fettsäure 14:0 im Biofiltersystem Barramundi (weiße FK) nicht detektiert werden konnte, allerdings

## Ergebnisse

ist diese Fettsäure in den Original-Proben noch präsent gewesen (Abb. 54). In den beiden anderen Biofiltersystemen wiesen die Inkubationen dieser Fettsäure bei Temperaturen von 17°C und 28°C mit Nitritkonzentrationen von 3 mM und 10 mM Einbauraten von 4 – 13 % ( $p < 0.1$ ) auf. Die Fettsäure 16:1 *cis* 9 konnte in allen Biofiltersystemen detektiert werden und zeigte Einbauraten zwischen 4 – 13 % ( $p < 0.025$ ). Die Fettsäure 18:1 *cis* 11 wurde in allen Biofiltern nachgewiesen und wies Einbauraten zwischen 4 und 10 % ( $p < 0.05$ ) auf.



**Abbildung 29:** Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Biofilterproben aus Strande. Biofilterproben aus der Barramundi-Anlage und Shrimp-Anlage. Bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

Die  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in die zuvor genannten Lipide erhöhten sich mit ansteigender Nitritkonzentration. Die höchste Einbaurate für die Fettsäure 14:0 wurde im Biofilter Shrimp 28°C (gemischte FK) mit 10 mM Nitrit gemessen, für die Fettsäure 16:1 *cis* 9 ist die höchste  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung in der Probe Barramundi (weiße FK) bei einer Temperatur von 28°C mit 10 mM Nitrit detektiert worden. Im

Biofiltersystem Barramundi (weiße FK) mit 10 mM Nitrit bei einer Temperatur von 17°C konnte der höchste Einbau der Fettsäure 18:1 *cis* 11 ermittelt werden.

Die Untersuchungen für die *Nitrospira*-spezifischen Hauptfettsäuren 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11 zeigen, dass sich der Markierungsgrad mit der Nitritkonzentration erhöht. Für beide Temperaturparameter, 17 und 28°C, konnten hohe Einbauraten detektiert werden. Hierbei lag die <sup>13</sup>C-Assimilierung in die spezifische Hauptkomponente 16:1 *cis* 7 zwischen 30 und 44 % ( $p < 0.005$ ). Die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 11 wies Einbauraten von 19 bis 45 % ( $p < 0.005$ ) auf. Unterschiede konnten beim Vergleich der Fettsäureanteile der spezifischen Hauptkomponenten in den verschiedenen Biofilterproben ermittelt werden. Für beide Temperatur-Ansätze der Biofilter Shrimp (gemischte FK) und in den Inkubationen Barramundi (schwarze FK und weiße FK) mit einer Temperatur von 28°C lag ein höherer Markierungsgrad für die Fettsäure 16:1 *cis* 7 vor. Dagegen zeigte die Probe Barramundi (weiße FK) mit der Inkubationstemperatur von 17°C einen höheren Einbau an <sup>13</sup>C in die Fettsäure 16:1 *cis* 11. Der Biofilter Barramundi (schwarze FK) zeigte bei einer Inkubationstemperatur von 17°C eine ähnliche <sup>13</sup>C-Assimilierung für beide spezifischen Komponenten von *Nitrospira*.

Dieser zweite Versuchsansatz wurde parallel, im Zuge einer Kooperation mit der Hamburger Arbeitsgruppe Mikrobiologie von PD Dr. Eva Spieck durch Sabine Keuter durchgeführt. Um die Ergebnisse dieser Kooperation voneinander abgrenzen zu können, werden die Daten der Kooperationspartner mit dem Kürzel „HH“, für Hamburg gekennzeichnet und die Ergebnisse aus vorliegender Studie mit dem Kürzel „OS“ für Osnabrück. Die Arbeitsgruppe in Hamburg verwendete für ihren Ansatz 300 ml Kulturkolben, also ein für Sauerstoff offenes System, welche mit 100 Füllkörpern und 100 ml Mineralmedium inkubiert wurden. Die Parameter für die Temperaturen und die Ausgangskonzentrationen an Nitrit sind wie in der vorliegenden Studie eingesetzt worden. Die Zugabe von Nitrit wurde individuell nach dem Verbrauch in den Proben vollzogen. Der Erntezeitpunkt der Zellen richtete sich nach dem Sauerstoffgehalt, welcher zu den Inkubationen in den gasdichten Kolben während der Inkubation in Osnabrück bestimmt worden war.

## Ergebnisse

Ein Ziel dieser Versuchsreihe sollte die Detektion eines möglichen Unterschiedes in der Nitritverwertung zwischen dem geschlossenen System der vorliegenden Studie und dem offenen System der Kooperationspartner sein. Vor allem aber sind die 16S rRNA Sequenzanalysen der verschiedenen Arbeitsgruppen für dieses System miteinander verglichen worden. Der daraus resultierende phylogenetische Stammbaum wurde in vorliegender Studie berechnet und ist in Abb. 30 dargestellt. Die Sequenzanalysen erfolgten mit unterschiedlichen Primersystemen. In Osnabrück wurden der *Bacteria*-spezifische Primer Jur8F (JURETSCHKO et al., 1998) und der *Nitrospira*-spezifische Primer NS1036 (diese Studie) verwendet. In Hamburg wurden der *Bacteria*-spezifische Primer 27F (LANE, 1991) und der *Nitrospira*-spezifische Primer Ntspa1158R (MAIXNER et al., 2006) verwendet. In Tab. 16 sind die einzelnen Nitritzugaben der Inkubationen der Proben aus Strande dargestellt. Die Inkubationszeiten richteten sich nach den Gasmessungen der Inkubationen aus der vorliegenden Studie und die Kulturen wurden bei einem Sauerstoffgehalt von ca. 5 % geerntet.

**Tabelle 16:** Nitritgabe der einzelnen Inkubationen in Hamburg (HH) und Osnabrück (OS), sowie die Inkubationszeiten in Tage (FK = Füllkörper)

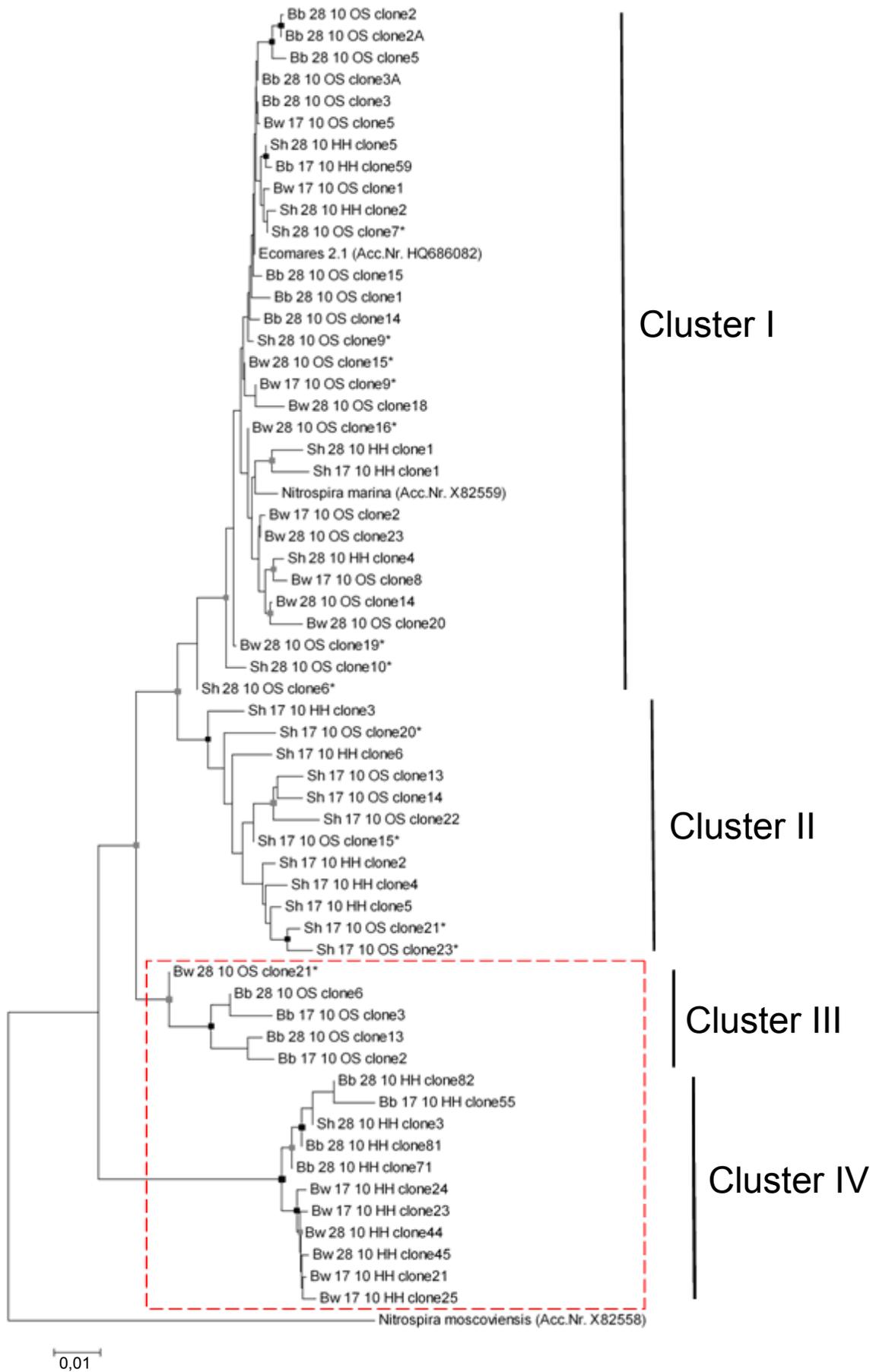
	0,3 mM Nitrit		3 mM Nitrit		10 mM Nitrit		Zeitraum
	HH	OS	HH	OS	HH	OS	Tage
Shrimp 17°C (gemischte FK)	15 x	15 x	5 x	6 x	2 x	3 x	55
Shrimp 28°C (gemischte FK)	10 x	11 x	8 x	5 x	3 x	1 x	41
Barramundi 17°C (weiße FK)	14 x	15 x	13 x	13 x	4 x	4 x	55
Barramundi 28°C (weiße FK)	9 x	9 x	8 x	9 x	4 x	4 x	34
Barramundi 17°C (schwarze FK)	11 x	11 x	11 x	10 x	3 x	4 x	41
Barramundi 28°C (schwarze FK)	7 x	7 x	8 x	6 x	4 x	2 x	27

Es zeigte sich, dass ein ähnlicher Nitritverbrauch bei den Inkubationen im geschlossenen System (Osnabrück) und im offenen System (Hamburg) vorlag. Die Inkubationszeiten beliefen sich auf 27 – 55 Tage, wobei die Inkubationen von 17°C länger inkubiert wurden, um den Sauerstoffgehalt von ca. 5 % zu erreichen. Die Inkubationen von Shrimp und Barramundi (schwarze FK) wurden bei 17°C

zwei Wochen länger inkubiert als die Inkubationen bei 28°C. Die Inkubationen von Barramundi (weiße FK) wurden bei 17°C um 21 Tage länger inkubiert.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen sind im nachfolgenden Stammbaum (Abb. 30) zusammengefasst. Das Alignment der Sequenzen und die Konstruktion des phylogenetischen Stammbaumes („Neighbor-Joining“), sowie die „Bootstrap“-Analysen wurden mit dem Programm MEGA 4 (TAMURA et al. 2007) durchgeführt. Im phylogenetischen Stammbaum werden die 16S rRNA Sequenzen der Biofiltersysteme Barramundi (weiße FK („Bw“)), Barramundi (schwarze Fk („Bb“)) und Shrimp (gemischte Fk („Sh“)) dargestellt (Abb. 30). Es sind beide Inkubationstemperaturen („17“ bzw. „28“), welche mit der höchsten Nitritkonzentration („10“) inkubiert wurden, analysiert worden. Die Benennung der sequenzierten Klone erfolgt je nach Herkunft mit dem Kürzeln „HH“ oder „OS“. Es konnten vier verschiedene Cluster detektiert werden. Das Isolat *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558) bildet im vorliegenden phylogenetischen Stammbaum die Außengruppe. Im Cluster I befinden sich die Sequenz des Isolates *Nitrospira marina* Nb-296 (Acc. Nr. X82559), die Sequenz der *Nitrospira*-Variante (Ecomares 2.1; Acc. Nr. HQ686082; KEUTER et al. eingereicht), sowie klonierte Sequenzen aus allen drei Biofiltermodulen. Im ersten Cluster befindet sich nur eine klonierte Sequenz aus dem Shrimpfilter (17°C), die meisten klonierten Sequenzen dieses Moduls („Sh17“) bilden mit Cluster II eine eigene Untergruppe. Das dritte Cluster umfasst klonierte Sequenzen aus Hamburg, welche aus den Modulen „Bb28“, „Bb17“, „Bw28“, „Bw17“ und „Sh28“ stammen. Des Weiteren befinden sich im Cluster IV klonierte Sequenzen aus vorliegender Studie. Diese stammen aus den Biofiltersystemen „Bb28“, „Bb17“ und „Bw28“ (Abb. 30, Sequenzen Cluster III und Cluster IV rot hervorgehoben). Die Sequenzen aus den Clustern III und IV zeichnen sich durch eine unterschiedliche Basenfolge an Positionen 482 – 487 aus (Abb. 31). Diese Abfolge (grün dargestellt) unterscheidet sie von allen Sequenzen, welche sich in den Clustern I und II (blau dargestellt) befinden, sowie von dem als Außengruppe deklarierten Organismus *Nitrospira moscoviensis* M-1.

Ergebnisse



**Abbildung 30:** Phylogenetischer Stammbaum der 16S rRNA Gensequenzen von *Nitrospira marina* Nb-296 (Acc. Nr. X82559), *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558) und der neuen *Nitrospira*-Variante "Ecomares 2.1" (Acc. Nr. HQ686082; KEUTER et al. eingereicht) mit Sequenzen aus der marinen Fischfarm Strände aus den Biofilteranlagen Barramundi (schwarze FK (Bb)), Barramundi (weiße FK (Bw)) und Shrimp (gemischte FK (Sh)). Die Inkubationstemperaturen betragen 17°C bzw. 28°C mit 10 mM Nitrit. Sequenzen mit dem Kürzel „HH“ stammen aus Hamburg, das Kürzel „OS“ steht für Klone aus vorliegender Arbeit. Sequenzen ≤ 800 bp sind mit \* gekennzeichnet. Das Alignment der Sequenzen und die Konstruktion des Baumes („Neighbor-Joining“) und die „Bootstrap“-Analysen wurden mit dem Programm MEGA 4 (TAMURA et al. 2007) durchgeführt. Bootstrap-Werte ≥ 60 % sind in grau an den Knotenpunkten gekennzeichnet, „Bootstrap“-Werte ≥ 80 % sind in schwarz gekennzeichnet. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 1 %. Mögliche Sequenzchimären, wurden unter Verwendung des Programms Pintail (ASHELFORD et al., 2005) ausgeschlossen. Der rote Kasten markiert die Sequenzen aus Cluster III und IV, welche Unterschiede in den Basen (siehe Abb. 31) zu allen Sequenzen aus Cluster I und Cluster II aufweisen.

<i>Nitrospira marina</i> Nb-295	480	ACC--ACT	487
Cluster II	480	ACC--ACT	487
Cluster III	480	ACT--GCC	487
<i>Nitrospira moscoviensis</i> M-1	480	ACC--GTT	487

**Abbildung 31:** Ausschnitt aus dem Alignment der Sequenzen aus Strände (Abb. 30). Dargestellt sind die Sequenzinformationen der Positionen 480 – 487 für *Nitrospira marina* (Acc. Nr. X82559) (repräsentativ für Cluster I), Cluster II, Cluster III, Cluster IV und *Nitrospira moscoviensis* (Acc. Nr. X82558). Alle in Cluster III und IV (roter Kasten) befindlichen Sequenzen weisen an der Basenposition 482– 487 (grün dargestellt) Basenunterschiede zu allen in Cluster I und Cluster II befindlichen Sequenzen (Basenunterschiede blau dargestellt). Positionsangaben der Basenpaare nach *E. coli* (BROSIUS et al., 1978) verwendet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Gesamtzell-Fettsäureanalysen der Reinkulturen und Anreicherungen

In der Gesamtzell-Fettsäureanalyse konnte gezeigt werden, dass nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand alle Organismen, welche über die 16S rRNA, sowie nach zellmorphologischen Gesichtspunkten der Gattung *Nitrospira* zugeordnet wurden (WATSON et al., 1986; EHRICH et al., 1995; SPIECK et al., 2006, LEBEDEVA et al., 2008; LEBEDEVA et al., 2011), auch über die spezifische Zusammensetzung der Fettsäuren dieser Gattung zugeordnet werden können. Hierzu konnten in der vorliegenden Arbeit die Hauptfettsäuregruppen einzelner Spezies, die in vorangegangenen Studien (LIPSKI et al., 2001; SPIECK et al., 2006) beschrieben wurden, bestätigt werden. Die Hauptkomponenten der Gattung *Nitrospira* lassen sich folglich reproduzierbar nachweisen. Die Fettsäure-Analysen der Anreicherungen und Reinkulturen zeigen zudem, dass die Organismen der Gattung *Nitrospira* in diesen Kulturen über ihre Fettsäureprofile differenzierbar sind. Die spezifischen Hauptkomponenten, die Fettsäuren 16:1 *cis* 7, 16:1 *cis* 11 und 16:0 11 methyl, wurden in unterschiedlichen Kombinationen in den Untersuchungen der Anreicherungen aus unterschiedlichen Ökosystemen detektiert. Diese Resultate weisen auf ein ubiquitäres Vorkommen der Gattung *Nitrospira* hin (Tab. 9).

Anreicherungen aus heißen Quellen in der Nähe von Gorjachinsk (Russland) beinhalten unterschiedliche Fettsäuremuster (Tab. 13). Während in den Organismen von *Ns. calida* Ns10 die spezifischen Fettsäuren 16:0 11 methyl in Kombination mit 16:1 *cis* 7 detektiert wurden, konnte in der Anreicherung „Ga II“ lediglich die Fettsäure 16:1 *cis* 7 als spezifische Hauptkomponente nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Organismen in unterschiedliche taxonomische Gruppen eingeordnet werden können. Jedoch weisen Analysen auf 16S rRNA-Ebene diesen Unterschied nicht auf (LEBEDEVA et al., 2011). Daher ist es denkbar, dass die unterschiedlichen Kombinationen der Fettsäuren in den Anreicherungen aus heißen Quellen aus der Änderung der Lipide innerhalb einer Population resultieren, was auf eine Mikroevolution (SIKORSKI, 2008) hinweisen könnte.

Zudem könnte eine Anpassung der Lipidzusammensetzung eine direkte Reaktion der Organismen auf Stressfaktoren (z. B. extreme Temperaturveränderungen) sein, um eine Änderung der Membranfluidität zu verhindern (DE MENDOZA und CRONAN JR., 1983; SINENSKY, 1974; WEBER und DE BONT, 1996). Allerdings lassen sich komplett unterschiedliche Fettsäuremuster nicht durch den Einfluss von Stressfaktoren erklären. Die Anreicherung von Ns10 bei 37°C weist, in Bezug auf die Zusammensetzung der Hauptkomponenten, die gleichen Ergebnisse auf, wie die Anreicherung von Ns10 bei 45°C. Eine Veränderung zeigte sich im Prozentanteil der Hauptfettsäure 16:0 11 methyl. So konnte in der Anreicherung NS10 bei 45°C ein doppelt so hoher Prozentanteil dieser Hauptkomponente detektiert werden. Dieses Resultat stimmt nicht mit den beschriebenen Anpassungsmechanismen zur Membranfluidität überein. Danach wäre bei verzweigten Fettsäuren ein höherer Prozentanteil bei niedrigeren Temperaturen zu erwarten, um die Membranfluidität aufrecht erhalten zu können, wie bei RUSSELL und FUKUNAGA (1990) beschrieben. Die Anreicherung Ga II mit einer Inkubationstemperatur von 46°C wies ein anderes Muster der Hauptfettsäuren auf. In dieser Anreicherung wurde ausschließlich die Fettsäure 16:1 *cis* 7 als spezifische Hauptkomponente detektiert. Die Fettsäure 16:0 11 methyl konnte hier nicht als Hauptkomponente identifiziert werden. Die Anreicherungen aus den heißen Quellen stammen aus demselben Habitat. Inwieweit unterschiedliche Salzgehalte oder pH-Werte Stress ausgelöst haben, der die Zusammensetzung der Fettsäurekomponenten beeinflusste, ist unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisbar. Das Habitat und die Bedingungen für die Anreicherungen waren gleich, es lag also keine Notwendigkeit für eine direkte Anpassung an unterschiedliche Umwelteinflüsse, oder verschiedene Kultivierungsparameter vor. Langzeitaufnahmen der Parameter im Habitat, wie Temperatur, Salzgehalt oder pH-Wert liegen für dieses Ökosystem nicht vor. Somit können keine Rückschlüsse auf einen stressbedingten Selektionsdruck gezogen werden. Die Frage der eventuell vorliegenden Mikroevolution kann durch die in vorliegender Studie angewandten Methoden und die zur Verfügung stehenden Parametern nicht weiter geklärt werden. Um die Frage des Verwandtschaftsgrades zwischen dem Stamm Ns10 und der Anreicherung Ga II analysieren zu können sind weiterführende Untersuchungen notwendig. So könnten Analysen konservierter

genomischer Regionen, wie den Genen für die Nitritoxidoreduktase, weitere Anhaltspunkte auf den phylogenetischen Verwandtschaftsgrad dieser Organismen der Gattung *Nitrospira* aus heißen Quellen liefern.

Verschiedene Anreicherungen von Nitritoxidanten wurden während dieser Studie bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und mittels Fettsäureanalytik ausgewertet. Hierzu gehörte eine Anreicherung von *Candidatus Nitrospira defluvii*, welche bei Temperaturen von 10°C bis 28°C inkubiert wurden (Tab. 10). Weitere Anreicherungen von Organismen der Gattung *Nitrospira* waren „Ecomares 2.1“ (Tab. 12), welche bei 17°C und 28°C angereichert wurde und *Nitrospira calida* Ns10 (Tab. 13), dessen Anreicherung bei 37°C und 45°C erfolgte. Als weiterer Nitritoxidant wurde *Nitrobacter vulgaris* AB1, bei Temperaturen von 10°C und 28°C, angereichert. Einige Kulturen wiesen eine Adaptation durch Verschiebung der Anteile an gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren auf, welche notwendig für die Erhaltung der Membranfluidität ist (RUSSEL, 1984). So können bei einer Inkubation der Organismen bei der jeweiligen höheren Temperatur höhere Prozentanteile an gesättigten Fettsäuren detektiert werden. Im Gegensatz dazu trat bei niedrigen Inkubationstemperaturen ein Anstieg der Anteile an ungesättigten Fettsäuren auf.

Die Kulturen von *Nitrobacter vulgaris* AB1 zeigen die Anpassung durch Verschiebung des Verhältnisses zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran. Bei einem Vergleich der ungesättigten Fettsäure 18:1 *cis* 11 mit der gesättigten Fettsäure 16:0 wurde diese Anpassung nachweisbar. Des Weiteren konnte die Verschiebung der Verhältnisse von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ebenfalls in der marinen Anreicherung von „Ecomares 2.1“ für die spezifischen ungesättigten Hauptfettsäuren, im Vergleich mit der gesättigten Fettsäure 16:0 nachgewiesen werden. Diese Anpassung der Zellmembran an die unterschiedlichen Temperaturen der Inkubationen, konnte auch für die Proben aus den Modulen der marinen Fischfarm Strande teilweise ermittelt werden (Abb. 56 – 61). Untersucht wurden hier die 17°C und 28°C Inkubationen der Module Shrimp (gemischte FK) und Barramundi (schwarze FK; weiße FK). Als Indikatoren dienten die *Nitrospira*-spezifischen Komponenten 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11, sowie die Hauptkomponenten der

Umweltproben, die Fettsäuren 16:0, 16:1 *cis* 9 und 18:1 *cis* 11. Die Ergebnisse zeigen erhöhte Prozentanteile an ungesättigten Lipiden bei einer Temperatur von 17°C und höhere Prozentanteile für gesättigte Lipide bei einer Temperatur von 28°C für die Module Barramundi (schwarze Füllkörper) und Shrimp (gemischte Füllkörper). Das Modul Barramundi (weiße Füllkörper) wies diesen Unterschied nicht auf. Weitere Anpassungen in den Fettsäuretypen wurden für die Module der Fischfarm und den Anreicherungen von *Nitrospira* und *Nitrobacter* nicht identifiziert.

Die Anreicherungen von *Candidatus Nitrospira defluvii* zeigten keine Anpassung in den Fettsäurezusammensetzungen, um die Fluidität der Zellmembran aufrecht zu erhalten. Die Untersuchungen der Anreicherungen für die Gattung *Nitrospira* implizieren unterschiedliche Anpassungsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität der einzelnen Spezies dieser Gattung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten terrestrisch lebenden *Nitrospiren* andere Anpassungsmechanismen haben müssen, um die Membranfluidität aufrecht erhalten zu können, da eine metabolische Zellaktivität dieser Organismen bei allen Inkubationen mit unterschiedlichen Temperaturen nachgewiesen werden konnte (Tab. 15).

In allen untersuchten Anreicherungen aus marinen Systemen (Tab. 2) stimmt die spezifische Kombination der Hauptkomponenten, bestehend aus der Fettsäure 16:1 *cis* 7 und Fettsäure 16:1 *cis* 11, überein (Tab. 9). Diese Lipide sind zudem für das Isolat *Nitrospira marina* Nb-295 als spezifische Hauptkomponenten identifiziert worden (Tab. 9). Bis heute gibt es keine Hinweise für das Auftreten dieser Kombination der spezifischen Hauptfettsäuren außerhalb mariner Systeme, also für Vertreter der Gattung *Nitrospira*, welche aus limnischen oder terrestrischen Habitaten angereichert wurden.

Die Hauptkomponente von *Candidatus Ns. defluvii*, die Fettsäure 16:1 *cis* 11, konnte mit ähnlich hohen Prozentanteilen, in zwei weiteren Anreicherungen detektiert werden. Es handelte sich um Material aus einem sauren Bioreaktor (Israel) und um Material aus der Movilen Höhle (Rumänien) (Tab. 2, 9). Die Ergebnisse dieser Anreicherungen zeigen, dass die *Nitrospiren*, welche über diese

spezifische Hauptkomponente verfügen, nicht an ein Habitat gebunden sind und die Lebensräume der Organismen mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 eine große Variabilität in der Anpassung an verschiedene Umweltfaktoren aufweisen. Dies wird bestätigt durch die Detektion der Fettsäure 16:1 *cis* 11, als Hauptkomponente, in einem Organismus, welcher aus einem sauren Bioreaktor in Israel angereichert wurde. Hier handelt es sich um einem extremen Lebensraum mit einem niedrigen pH-Wert von 3,8 ( $\pm$  0,3) (TARRE & GREEN, 2004). Diese Fettsäure wurde außerdem in einem Organismus aus dem abgeschlossenen System der Movilen Höhle detektiert. Bei dieser Höhle handelt es sich um ein einzigartiges Grundwasserökosystem. Die Primärproduktion in diesem Habitat basiert auf der Oxidation von geogenem Sulfid, der Methanoxidation und der Nitritoxidation (VLASCEANU et al., 1997; ROHWERDER et al., 2003; HUTCHENS et al., 2004). Des Weiteren trägt mit *Candidatus* Ns. defluvii ein Organismus diese Hauptkomponente, der aus dem Belebungsbecken einer kommunalen Kläranlage angereichert werden konnte (Tab. 9). Bei der Kläranlage handelt es sich um ein Habitat, welches unter anderem mit einer hohen Schadstoffkonzentration belegt ist (GALLERT & WINTER, 2005). Das alleinige Auftreten dieser spezifischen Hauptkomponente ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht in Vertretern mariner Systeme detektiert worden.

Die Ergebnisse der Gesamtzellfettsäuren sind ein wichtiges Merkmal für die Klassifizierung von Organismen der Gattung *Nitrospira*. Über ihre spezifischen Hauptfettsäuren können diese Organismen differenziert und identifiziert werden. Des Weiteren kann *Nitrospira* aufgrund der Spezifität der Hauptfettsäuren über das Fettsäureprofil eindeutig von anderen Organismen abgegrenzt werden. Dies ist ein essentieller Parameter für die Identifizierung der Gattung *Nitrospira* nach einem langen und schwierigen Anreicherungsprozess. Die Kultivierungen aus den unterschiedlichen Ökosystemen zeigen die Verbreitung der Gattung *Nitrospira*, welche in marinen und terrestrischen Systemen vorkommen. Die Abundanz dieser Gattung in Habitaten mit extremen Lebensbedingungen, wie den hohen Temperaturen in heißen Quellen, oder den niedrigen Temperaturen in Permafrostregionen, weisen auf die ökologische Radiation der Organismen dieser Gattung hin. Zudem zeigen die Ergebnisse der Gesamtzellfettsäureanalysen, dass

Organismen von *Nitrospira* an hohe Salzgehalte aus marinen Systemen, an niedrige pH-Werte in Bioreaktoren, oder differenziellen Schadstoffeinträgen, wie sie in Kläranlagen vorkommen können, angepasst sind. Dies lässt den Schluss zu, dass die Gattung *Nitrospira* eine zentrale Position für die Prozesse des aeroben Stickstoffkreislaufes in unterschiedlichen Ökosystemen einnimmt.

Die Anreicherungen „MAK 207.5“ und „Ham-1“ zeigen das Fettsäureprofil des psychrophilen Organismus *Candidatus Nitrotoga arctica*, welcher von ALAWI et al. (2007) aus Permafrostproben (Sibirien) angereichert werden konnte (Tab. 14). Charakteristisch für diese Art ist die Hauptkomponente 16:1 *cis* 9 in Kombination mit drei Hydroxyl-Komponenten (10:0 3OH, 12:0 3OH und 14:0 2OH). Die Anreicherung „MAK 207.5“ stammt ursprünglich ebenfalls aus Sibirien, das Material für die Anreicherung „MAK 207.5“ wurde aus Bodenproben entnommen. Mit der Anreicherung „Ham-1“ (ALAWI et al., 2009) konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal das Fettsäuremuster der *Nitrotoga*-Spezies aus einer Probe vom Belebungsbecken einer kommunalen Kläranlage identifiziert werden. Der jahreszeitlich bedingte Temperaturverlauf im Belebtschlamm (Abb. 9) weist auf die psychrotoleranten Eigenschaften von *Nitrotoga* hin. Durch die Anreicherung „Ham-1“ aus dem Belebungsbecken der kommunalen Kläranlage, konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Nitrotoga* nicht ausschließlich um eine psychrophile Spezies handelt, sondern auch psychrotolerante Arten, in diesem Taxon identifiziert werden können.

Die Anreicherungsversuche haben gezeigt, dass sich Nitrit-oxidierende Bakterien über das Fettsäuremuster voneinander abgrenzen lassen. Unterschiedliche Nitritoxidanten können in denselben Ökosystemen identifiziert werden, wie die Gesamtzellfettsäureanalysen der Anreicherungen aus Permafrostböden in Sibirien, oder Anreicherungen aus Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen belegen. Die Abgrenzung über die Fettsäuren ermöglicht zusätzlich die Detektierbarkeit metabolischer Aktivitäten, welche Rückschlüsse auf die Zellaktivitäten einzelner Nitritoxidanten liefern können. Auf die Besiedelung der ökologischen Nischen in Ökosystemen, durch verschiedene Nitritoxidanten wird im weiteren Verlauf dieser Diskussion in den Markierungsversuchen eingegangen.

## 4.2 Vorbereitende Analysen für die Markierung von Umweltproben

Rückschlüsse auf die metabolischen Aktivitäten von Mikroorganismen können über die Markierung von Fettsäuren mit stabilen Isotopen erhalten werden. Diese weit verbreitete Methode ist erstmals mittels GC-C-IRMS Analyse von BOSCHKER et al. (1998) beschrieben worden und wird seither für Untersuchungen von Bakteriengemeinschaften aus unterschiedlichsten Habitaten angewendet. Unter anderem wurde diese Methode für die Analyse mikrobieller Matten aus heißen Quellen (VAN DER MEER et al., 2007) und für die Untersuchung Mineralöl-Kontaminierter Grundwasserschichten (POMBO et al., 2002) verwandt. Mit stabilen Isotopen markierte Lipide können auch über Quadrupol GC-MS analysiert werden, dies wurde erstmals von ARAO (1999) für acetatassimilierende Bakterien und Pilze beschrieben. KNIEF et al. (2003) analysierte über Quadrupol GC-MS die Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat durch autotrophe Bakterien. Diese Vorgehensweise einer Markierung der autotrophen Bakteriengemeinschaft mittels  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat und die anschließende Analyse über GC-MS sollte auch in vorliegender Studie Anwendung finden. Die Analyse über GC-MS ist weniger sensitiv, allerdings ist die Analyse mittels GC-MS eine etablierte und nicht so kostenintensive Alternative zur Analytik über GC-C-IRMS.

Der Einfluss der Temperatur auf die  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Fettsäuren wurden mit einer Anreicherung von *Candidatus* Ns. defluvii geprüft. Die Inkubation mit  $^{13}\text{C}$  als Kohlenstoffquelle wurde bei Temperaturen von 10°C und 17°C durchgeführt und zeigten, dass sich autotrophe Organismen der Gattung *Nitrospira* mit  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat markieren lassen, was über die Einbauraten belegt wurde (Tab. 15). Diese Resultate stützen das Vorhaben, unterschiedliche Temperaturen in Markierungsexperimenten von Umweltproben einzusetzen. Die Hauptkomponente von *Candidatus* Ns. defluvii ist bei den gewählten Temperaturen nachweisbar und kann als temperaturunabhängiger chemotaxonomischer Marker verwendet werden. Eine Differenzierung ist auch bei dem Einsatz unterschiedlicher Temperaturparameter, vor allem über die spezifischen Hauptkomponenten für die Gattung *Nitrospira*, möglich. Die verwendeten Inkubationstemperaturen führten zu ähnlichen  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen für einzelne Fettsäuren. Dies kann zusätzlich als Anhaltspunkt dafür gewertet werden, dass dieser *Nitrospira*, welcher unter

Laborbedingungen sein Wachstumsoptimum bei 28°C zeigt (SPIECK et al. 2006), auch bei niedrigen Temperaturen, von 10°C bzw. 17°C, Wachstum aufweist, da auch bei diesen Temperaturen metabolische Zellaktivität detektierbar war. Über die hohen Einbauraten an  $^{13}\text{C}$  lassen sich somit Rückschlüsse auf hohe Zellaktivitäten der autotrophen Organismen führen. Die Einbauraten unterschieden sich hingegen in die gesättigten und ungesättigten Fettsäurekomponenten. So konnte in die ungesättigten Fettsäuren eine vermehrte  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung analysiert werden. Unterschiedliche Einbauraten zwischen gesättigten und ungesättigten Lipiden wurden schon zuvor, in Arbeiten von ALEXANDRINO et al. (2001) und KNIEF et al. (2003) detektiert. Dies kann einerseits auf die verschiedenen Synthesewege der Lipide zurückgeführt werden, oder andererseits aus unterschiedlichen Umsatz-Raten resultieren. Bei den Synthesewegen lassen sich zwei Wege beschreiben. Durch den ersten entstehen ungesättigte Fettsäuren aus einer Modifikation der gesättigten Fettsäuren (Synthese durch die Desaturase), hier läge der Einbau an  $^{13}\text{C}$  in die gesättigten Fettsäuren höher, da die ungesättigten erst in einem späteren Schritt synthetisiert werden. Ein höherer Einbau in die ungesättigten Fettsäuren hingegen ist auf die gleichzeitige Synthese von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen und beschreibt den zweiten Syntheseweg (Fettsäure-Synthase). Weiter weisen Lipide unterschiedliche Umsatz-Raten auf (LAW, 1971; ALEXANDRINO et al., 2001; KNIEF et al., 2003; LIPSKI, 2006), vorwiegend weisen die Hauptkomponenten einer Art die höchsten Einbauraten an  $^{13}\text{C}$  auf. Im vorliegenden Fall liegt somit die Vermutung nahe, dass zusätzlich zu einer parallelen Synthese der gesättigten und ungesättigten Komponenten die Umsatz-Raten der ungesättigten Komponenten überwiegen, da diese die Hauptkomponenten darstellen.

Abschließend wurde eine Originalprobe aus Belebtschlamm mit  $^{13}\text{C}$ -Bicarbonat und  $^{12}\text{C}$ -Bicarbonat versetzt und diese Parallelen analysiert und verglichen (Abb. 8). Die Untersuchungen zeigen, dass mit der Fettsäureanalytik im Scan-Modus und der anschließenden Analyse der Proben im SIM-Modus der Einbau an  $^{13}\text{C}$  in die Hauptkomponenten der Nitrifikanten direkt aus den Umweltproben der analysierten Habitate bestimmt werden können. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erlauben infolgedessen nicht nur die Identifizierung der

Fettsäurekomponenten im Scan-Modus, sondern außerdem die Detektion einzelner Ionen im SIM-Modus. Der Vorteil des SIM-Modus liegt in der sensitiven Detektion der vorgegebenen Ionen. Bei der Beschränkung auf einzelne Ionen werden diese empfindlicher und genauer detektiert, da vergleichsweise mehr Zeit zur Detektion der einzelnen Komponenten zur Verfügung steht als bei einer Gesamtanalyse aller Ionen (ROHWEDDER, 1985). Um nicht für jede einzelne Fettsäure die individuellen Molekularionen analysieren zu müssen (ALEXANDRINO et al., 2001), wurde das C<sub>3</sub>-Fragment analysiert, da dieses bei der Ionisierung im GC/MSD bei allen FAMES entsteht (KNIEF et al., 2003). Die Untersuchungen zeigten zudem, dass die Sauerstoffkonzentration in den geschlossenen Systemen der gasdichten Kolben einen limitierenden Faktor darstellt (Daten nicht gezeigt). Dies ist auf die Atmungsaktivität der heterotrophen und autotrophen Gemeinschaft zurückzuführen, da Proben wie Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage und Biofiltermaterial aus marinen Aquakulturanlagen eine heterogene mikrobielle Gemeinschaft aufweisen. Der Sauerstoffverbrauch wurde daher regelmäßig gemessen um zu verhindern, dass die Proben anoxisch wurden. Es konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffverbrauch mit der Temperatur anstieg, was auf die Wachstumsoptima der mikrobiellen Gemeinschaften in den analysierten Ökosystemen zurückgeführt werden kann, da diese eher im mesophilen Bereich lagen. Weiter ist bestimmt worden, dass der Sauerstoffverbrauch bei hohen Nitritkonzentrationen sank, was auf die Toxizität des Nitrits zurückzuführen ist. Die Analysen wurden bei einem Sauerstoffgehalt von ca. 5 % gestoppt. Dies verhinderte unerwünschte anoxische Prozesse im System. Die untersuchten Kolben sind in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur geerntet worden. Dies bedeutet, dass eine komplette Probencharge derselben Inkubationstemperatur geerntet wurde, wenn ein Kolben dieser Temperatur den Sauerstoffgehalt von 5 % erreicht hatte. Dadurch erfolgte die Gewährleistung, dass die <sup>13</sup>C-Assimilierung auch bei langsameren Stoffwechselaktivitäten, durch nicht optimale Inkubationstemperaturen, stattfinden konnte.

### **4.3 Analysen zum Ökosystem Belebtschlamm aus einer Kläranlage**

Die Proben aus Belebtschlamm sind zu unterschiedlichen Jahreszeiten in dem Zeitraum vom Juni 2008 bis August 2009 genommen und bei unterschiedlichen

Temperaturen und mit verschiedenen Nitritkonzentrationen inkubiert worden. Die Inkubationsparameter wurden variabel gewählt, da auch das Belebungsbecken der Kläranlage natürlichen Schwankungen ausgesetzt ist. Im jahreszeitlichen Verlauf sind Temperaturabweichungen mit bis zu 5°C von den jeweiligen monatlichen Mittelwerten (Abb. 9) ermittelt worden.

Nach der Inkubation wurden die Gesamtzellfettsäureprofile bestimmt und die Markierungsgrade, die <sup>13</sup>C-Assimilierung, quantifiziert. Im nachfolgenden Abschnitt sollen diese Inkubationen diskutiert und mit den weiteren Ergebnissen zum Habitat Belebtschlamm verglichen werden.

Die Untersuchungen bei einer Inkubationstemperatur von 4°C sind nicht weiter verfolgt worden, da die bei dieser Temperatur inkubierten Proben vom Juni 2008 keine <sup>13</sup>C-Assimilierung aufwiesen. Der nicht vorhandene Einbau bei dieser untersuchten Inkubationstemperatur kann darauf zurückgeführt werden, dass das Belebungsbecken eine so niedrige Temperatur nicht erreicht, was auch während des Probenahmezeitraumes vom Juni 2008 bis August 2009 ermittelt werden konnte. Es scheint also keine Notwendigkeit einer Anpassung der autotrophen Bakteriengemeinschaft an diese extrem niedrige Temperatur in diesem Habitat vorzuliegen.

Die Inkubation bei 10°C zeigte (Abb. 10), dass eine Nitritkonzentration von 30 mM hemmend auf die Einbauraten in die Fettsäuren der autotrophen Organismen wirkt. Auch die Inkubationen vom Juni 2008 und Januar 2009 zeigen keinen relevanten Anstieg des Einbaus an <sup>13</sup>C in die Fettsäuren. Lediglich die Fettsäure 16:1 *cis* 9 wies einen erhöhten Einbau in der Inkubation vom Januar 2009 mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM auf. Hier lagen die Inkubationstemperatur und die Temperatur in den Originalproben, welche mit 13,5°C im monatlichen Mittel bestimmt wurde (Abb. 9), in einem ähnlichen Bereich. Die Erkenntnisse zu einer Zellaktivität von Organismen mit dieser Hauptkomponente stimmen mit den Ergebnissen von ALAWI et al. (2009) überein. Hier wurde die Anreicherung eines Vertreters der Gattung *Nitrotoga* aus Belebtschlamm bei diesen Parametern beschrieben. Als Hauptkomponente konnte für diesen Organismus die Fettsäure 16:1 *cis* 9 durch Analysen in vorliegender Studie bestimmt werden (Tab. 14). Im

August 2009 wurde ein verstärkter Einbau und somit eine hohe Zellaktivität von Organismen mit der Fettsäure 16:1 *cis* 11, bei Nitritkonzentrationen von 0,3 mM und 3 mM detektiert. Dieses *Nitrospira*-spezifische Lipid ist als Hauptkomponente für den Organismus *Candidatus Nitrospira defluvii* bekannt (SPIECK et al., 2006). In den Originalproben sowie in den Proben nach der Inkubation mit <sup>13</sup>C-Bicarbonat vom August 2009 konnte in den Prozentanteilen an Gesamtfettsäuren ein erhöhter Wert für diese Komponente nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass *Candidatus Nitrospira defluvii*, mit der charakteristischen Hauptfettsäure 16:1 *cis* 11, eine hohe Zellaktivität bei der Temperatur von 10°C in den Proben vom August 2009 aufwies, welche zudem einen hohen Prozentanteil an Gesamtzellfettsäuren für diese Komponente beinhalteten.

In den Inkubationen bei 17°C und 22°C (Abb. 11, 12) mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM zeigte die Fettsäure 16:1 *cis* 7 hohe Einbauraten. Diese Fettsäure ist nicht als Hauptkomponente für den aus Belebtschlamm bekannten Organismus *Candidatus Ns. defluvii* beschrieben. Daher kann diese <sup>13</sup>C-Assimilierung als Hinweis auf eine neue Variante der Gattung *Nitrospira* in diesem Habitat gewertet werden. Die Fettsäure 16:1 *cis* 7 ist als eine Hauptkomponente von *Nitrospira marina* Nb-295 bekannt. Allerdings handelt es sich hier um einen marinen Vertreter dieser Gattung. Der Salzgehalt, den dieser Organismus benötigt, ist im Belebungsbecken des Klärwerkverbundes Hamburg nicht gegeben. Über den Zulauf gelangen nur häusliche Abwässer und industrielle Abwässer in das System der untersuchten Kläranlage, welche keine erhöhte Konzentration an Ionen aufweisen, wie sie unter anderem beim Kaliabbau anfallen würden, die den Salzgehalt anheben könnten. Zudem betrug die mittlere Chloridkonzentration im Belebungsbecken ca. 120 mg/L, mit Spitzenwerten von 170 mg/L (persönliche Mitteilung Dr. Dirk Eifler, Hamburg Stadtentwässerung AöR). Diese Werte unterschreiten den Grenzwert für Chlorid im Trinkwasser, welcher bei 250 mg/L liegt (TRINKWASSERVERORDNUNG, 2001). Der Chloridgehalt im Belebungsbecken bewegt sich also innerhalb der Trinkwassernorm. Des Weiteren gibt es keinen Anhaltspunkt auf eine erhöhte Ionenkonzentration in der untersuchten Anlage, die zu einem hohen Salzgehalt führen könnte, welche das Wachstum von marinen Organismen begünstigen würde. In den Inkubationen vom Januar 2009 zeigte

sich, dass der potentiell neue *Nitrospira* aus Belebtschlamm keine Aktivität aufweist. Das enge Temperaturspektrum und die Adaption an niedrige Nitritkonzentrationen deuten auf eine neue Variante von *Nitrospira* in den Proben aus dem Belebtschlammbecken hin. Im molekularbiologischen Ansatz sollten diese Anhaltspunkte verifiziert werden.

Die Proben mit einer hohen  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung in die Hauptkomponente 16:1 *cis* 7 sind verwendet worden, um über die 16S RNA-Sequenzanalyse phylogenetische Informationen zu dem potentiell unbekanntem Organismus der Gattung *Nitrospira* zu erhalten. Hierzu ist die DNA aus den Belebtschlammproben vom Juni 2008 und August 2009, welche mit einer Inkubationstemperatur von 17°C und einer Nitritkonzentration von 0,3 mM inkubiert wurden, eingesetzt worden. Diese DNA wurde mit den verschiedenen für Organismen der Gattung *Nitrospira* entwickelten Primersystemen amplifiziert, dabei lieferten die Primersysteme Jur8F/NS1036R und NS663F/Jur1529R ein Produkt. Mit dem Primersystem Jur8F/NS1036R konnten Sequenzen aus den Proben vom Juni 2008 und August 2009 nachgewiesen werden, welche zu dem 16S rRNA Gen von *Candidatus Nitrospira defluvii* zwei Basenpaare Unterschied aufwiesen. Diese reproduzierbaren Unterschiede im 16S rRNA Gen, sind mit einem Primersystem identifiziert worden, welches für das Marina-Cluster entwickelt wurde. Der in diesem System für das Marina-Cluster neu entwickelte Primer NS 1036R zeigt zu der Sequenz von *Candidatus Ns. defluvii* einen weiteren Basenunterschied, es handelt sich also um mindestens drei unterschiedliche Basenpositionen, welche im 16S rRNA Gen ermittelt werden konnten. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf eine unbekannte Variante von *Nitrospira* im Belebtschlamm. Der Basenunterschied an Position 190 wurde verwendet, um eine Sonde zu entwickeln (Abb. 16), welche für die *in situ* Detektion über FISH eingesetzt wurde.

Diese Sonde ist mit dem Farbstoff Cy3 markiert worden und sollte die neue *Nitrospira* Variante direkt im Habitat nachweisbar machen. Zum nächsten Verwandten, *Candidatus Nitrospira defluvii*, zeigt die Position der Sondesequenz nur einen Basenunterschied auf, zu den anderen bekannten Nitrospiren weist diese Oligonukleotidsonde 6 – 10 unterschiedliche Basen in der Sondensequenz auf. In Abb. 16 wurde dies am Beispiel von *Ns. moscoviensis* M-1 demonstriert.

Um die hohe Sequenzübereinstimmung im Zielbereich der Sonde zu *Candidatus Nitrospira defluvii* zu kompensieren wurde eine nicht markierte Kompetitorsonde, wie bei MANZ et al. (1992) beschrieben, eingesetzt. Die Sequenz dieser unmarkierten Sonde ist komplementär zur Sequenz von *Candidatus Nitrospira defluvii*. Die neue Cy3 markierte Sonde mit der Kompetitorsonde wurde in einer Anreicherung von *Candidatus Nitrospira defluvii* getestet und die Ergebnisse belegen, dass die Zellen mit der neuen Sonde NS177A (Abb. 19) nicht erfasst werden.

In weiteren Versuchen ist die neue Sonde in Belebtschlammproben aus den Markierungsansätzen erprobt worden. Die Analysen konzentrierten sich auf Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009, welche bei 17°C mit 0,3 mM Nitrit inkubiert wurden. Die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) erwiesen sich als nicht auswertbar. Die Bakterienzellen waren fest an das Belebtschlammmaterial assoziiert. Frei vorliegende Zellen, oder Zellen an der Aggregatoberfläche, welche mit der Sonde NS177A identifizierbar gewesen wären, sind nicht detektiert worden. In den vorliegenden Untersuchungen konnten keine Zellen aus den analysierten Proben der neuen Variante der Gattung *Nitrospira* eindeutig zugeordnet werden.

Es folgten Untersuchungen mit der Anreicherung aus Belebtschlamm („BS\_17“ Tab. 3). In der Anreicherung konnten wiederum Strukturen von Schlammmaterial und eine bakterielle Begleitflora detektiert werden. Mit der Sonde EUB338 (AMANN et al., 1990; Abb. 20), wurden alle Bakterien detektiert und es lagen zellmorphologisch unterschiedliche Zelltypen vor, welche nicht weiter differenziert wurden. Die *Nitrospira*-spezifische Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (DAIMS et al., 2001; Abb. 21) detektierte zwei Zelltypen. Beim ersten Zelltyp handelte es sich um kokkoide Zellstrukturen, welche in Kolonien vorlagen und überwiegend an Schlammstrukturen angeheftet waren. Der zweite Organismus umfasste stäbchenförmige, eher frei vorliegende Zellen, welche nur teilweise in kleinen Verbunden an das Schlammmaterial assoziiert vorkamen. Da beide Zellstrukturen mit der *Nitrospira*-spezifischen Sonde S-G-Ntspa-0662-a-A-18 detektiert wurden, können beide Zellmorphologien der Gattung *Nitrospira* eindeutig zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Sonde NS177A (Abb. 22 – 25) belegen, dass es sich

um unterschiedliche Varianten der Gattung *Nitrospira* handelt. Die stäbchenförmigen Zellen, welche eher frei und nur in kleinerem Verbund vorlagen, wurden von der Sonde erfasst, während die rundlichen Zellen, welche in Kolonien an Partikel assoziiert waren, keine Bindung an die Sonde zeigten. Diese Untersuchungen bestätigen, dass im System Belebtschlamm, bei einer Temperatur von 17°C mit niedrigen Nitritkonzentrationen, zwei Varianten der Gattung *Nitrospira* identifiziert werden konnten. Bei einem Vergleich der Zellstrukturen aus der Anreicherung von *Candidatus Nitrospira defluvii* mit den Zellen aus der Anreicherung „BS\_17“, welche nicht von der Sonde NS177A erfasst werden, sind große zellmorphologische Ähnlichkeiten festgestellt worden. Die Zellen von *Candidatus Nitrospira defluvii* weisen ebenfalls kokkoide Strukturen auf und sind in Kolonien an Partikel assoziiert.

Die chemotaxonomischen Analysen deuten auf metabolische Aktivitäten einer neuen Variante von *Nitrospira* hin, welcher ein enges Temperaturspektrum zeigt. Die Sequenzanalysen der 16S rRNA und FISH Analysen mit der spezifischen Sonde ergaben weitere Anhaltspunkte auf die neue Variante von *Nitrospira* aus Belebtschlamm. Diese Hinweise sollten mit einer Anreicherung der neuen Variante der Gattung *Nitrospira* verifiziert werden. Ein erster Anreicherungsversuch (Abb. 15) scheiterte, da sich hier der schon aus Belebtschlamm bekannte Vertreter, *Candidatus Nitrospira defluvii* mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 11, durchsetzte. Aufgrund dessen wurden neue Anreicherungen („BS\_17“ und „BS\_22“ (Tab. 3)) mit Inkubationstemperaturen von 17°C und 22°C, sowie der Nitritkonzentration von 0,5 mM angesetzt. Die Nitritgaben wurden auf 14tägig modifiziert. Über die Reduzierung der Substratkonzentration und über einen verlängerten Zeitraum für die Inkubation soll die Abgrenzung der neuen Variante von *Nitrospira* zu *Candidatus Nitrospira defluvii* erreicht werden. Die ersten Anreicherungsversuche belegen, wie bei Spieck et al. (2006) beschrieben, dass die Anreicherung von autotrophen Organismen der Gattung *Nitrospira* sehr zeitintensiv ist. Die metabolischen Aktivitäten der Fettsäureanalysen zeigen, dass beide *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren unter diesen Inkubationsbedingungen <sup>13</sup>C-Assimilierung aufweisen. Dieser Umstand könnte die Differenzierung der beiden Varianten über Kultivierung zusätzlich erschweren.

In der Inkubation vom Mai 2009 wiesen die Ansätze bei 17°C und 22°C mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM einen erhöhten Markierungsgrad der Fettsäuren 16:1 *cis* 7, 16:1 *cis* 9 und 16:1 *cis* 11 auf, welche die Hauptkomponenten für die neue Variante der Gattung *Nitrospira*, *Nitrotoga* und *Candidatus Nitrospira defluvii* beschreiben. Die Untersuchungen liefern Anhaltspunkte darauf, dass die drei genannten Organismen mögliche Kandidaten sind, welche zu dieser Jahreszeit die über den Einbau in die Fettsäuren gemessene Zellaktivität aufweisen könnten. Die <sup>13</sup>C-Assimilierung in unterschiedliche Fettsäuren implizieren, dass mehrere Organismen abundant sind, welche sich unter diesen Bedingungen das Habitat und somit die Nitritressourcen teilen. Auffällig ist wieder, dass es sich bei dieser Inkubationstemperatur um eine ähnliche Temperatur handelt, wie sie in der Original-Probe vorherrschte, diese wurde als monatlicher Mittelwert mit 17,6°C bestimmt (Abb. 9). In den Inkubationen vom August 2009 mit einer Konzentration an Nitrit von 3 mM konnte ein hoher Markierungsgrad für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 detektiert werden. Diese Hauptkomponente von *Candidatus Nitrospira defluvii* gibt Anhaltspunkte auf eine aktive Bakterienpopulation dieses Vertreters, bei Inkubationstemperaturen von 17°C und 22°C. Des Weiteren wurde in den Proben vom August 2009 ein erhöhter Einbau in die Fettsäure 16:1 *cis* 9 mit einer Nitritkonzentration von 30 mM detektiert. Dies ist keine Hauptfettsäure von *Nitrospira*, es scheint sich demzufolge um einen anderen autotrophen Organismus zu handeln, welcher bei hohen Nitritkonzentrationen Zellaktivität in diesem Habitat zeigen kann.

In den Markierungsversuchen bei einer Inkubationstemperatur von 28°C (Abb. 13) wies die Hauptkomponente von *Candidatus Nitrospira defluvii* einen sehr hohen Einbau in den Proben vom Juni 2008, Mai 2009 und August 2009 bei den Inkubationen mit 0,3 mM und 3 mM Nitrit auf. Der unbekannte autotrophe Organismus, mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 9, ist mit einem hohen Markierungsgrad in den Proben vom Juni 2008, Oktober 2008 und August 2008, vor allem bei einer Nitritkonzentration von 30 mM detektiert worden. Diese hohen Zellaktivitäten, von Organismen mit der Fettsäure 16:1 *cis* 9, konnten auch bei der Inkubationstemperatur von 32°C mit Nitritkonzentrationen von 3 mM – 30 mM bestimmt werden (Abb. 13). In der Inkubation vom Mai 2009 war kein Einbau in

diese Fettsäure nachweisbar, der unbekannte autotrophe Organismus zeigte hier keine erhöhte Zellaktivität. Diese Untersuchungen gaben Anhaltspunkte für eine Anreicherung des unbekanntes autotrophen Organismus bei einer Temperatur von 28°C mit einer Nitritkonzentration von 30 mM. Die erste Anreicherung der unbekanntes autotrophen Organismen mit der Hauptfettsäure 16:1 cis 9 schlug fehl. Wie die Abbildung 17 belegt, setzte sich in der Anreicherung die Fettsäure 18:1 cis 11 durch, welche als Hauptkomponente von *Nitrobacter* bekannt ist (LIPSKI et al., 2001). Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Nitritkonzentration in der Anreicherung langsam auf 30 mM gesteigert wurde. In einem neuen Ansatz („BS\_28“ (Tab.3)) wurde von Beginn an eine Nitritkonzentration von 30 mM gewählt.

In der Probe vom August 2009 zeigten die Inkubationen von 22°C und 28°C mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM einen erhöhten Einbau der Fettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11, welche die Hauptkomponenten für den potentiell neuen *Nitrospira* und *Candidatus Nitrospira defluvii* sind. Diese Ergebnisse weisen, wie schon für die Proben vom Mai 2009 bei einer Temperatur von 17°C und 22°C mit 0,3 mM Nitrit beschrieben, darauf hin, dass beide Organismen der Gattung *Nitrospira* unter diesen Bedingungen erhöhte Zellaktivität zeigen. Dies ist ein Anhaltspunkt auf eine mögliche Konkurrenz der Organismen um dieselbe ökologische Nische im Habitat. Daher ist es denkbar, dass unterschiedliche Nitrospiren um die Ressourcen im Ökosystem konkurrieren. Weiterführende Belege auf die mögliche Konkurrenz könnten Wachstumsversuche der unterschiedlichen Nitrospiren nach einer erfolgreichen Anreicherung liefern.

Die Fettsäure 18:1 cis 11, welche auf eine metabolische Aktivität von *Nitrobacter* hindeuten würde, zeigte während der Inkubationen keinen relevanten Einbau. Wenn eine signifikante <sup>13</sup>C-Assimilierung nachgewiesen wurde, ist in diesen Inkubationen für die Fettsäuren 16:1 cis 9 und 16:1 cis 11 eine teilweise fast doppelt so hohe <sup>13</sup>C-Assimilierung detektiert worden. Im Habitat Belebtschlamm konnte eine Koexistenz von *Nitrobacter* und *Nitrospira* bei höheren Temperaturen und Nitritkonzentrationen, wie sie bei VANPARYS et al. (2006) beschrieben wurde, nicht bestätigt werden. Ähnliches gilt für die Fettsäurekombination 14:0 und 16:1 cis 9, welche als Hauptkomponenten für den Organismus *Nitrospina* bekannt

sind. Bei einem signifikanten Einbau in diese Fettsäurekombination wurde für die *Nitrospira* spezifische Komponente 16:1 *cis* 11 eine fast doppelt so hohe Einbaurate ermittelt. Eine Relevanz der Gattung *Nitrospira* im Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage ist nach vorliegenden Ergebnissen nicht nachweisbar. Diese Vermutung stimmt auch mit der bisherigen Beschreibung zu *Nitrospira* (TESKE et al., 1994) überein, da diese Art bis heute nur in marinen Systemen detektiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Organismen *Nitrobacter* (mit der Hauptkomponente 18:1 *cis* 11), *Nitrococcus* (mit den Hauptkomponenten 16:1 *cis* 9 und 18:1 *cis* 11) und *Nitrospira* (mit den Hauptkomponenten 14:0 und 16:1 *cis* 9) keinen relevanten Einbau an  $^{13}\text{C}$  aufweisen. Es konnte keine signifikante Zellaktivität, welche über die  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung gemessen wurde, gezeigt werden. Somit ist keine Abundanz dieser Organismen unter den gewählten Temperaturen und Nitritkonzentrationen im Ökosystem Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage vorhanden. Die ökologischen Nischen dieses Habitates werden von Organismen besetzt, welche die Hauptfettsäuren 16:1 *cis* 7, 16:1 *cis* 9 und 16:1 *cis* 11 aufweisen.

Die Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 ist für den Organismus *Candidatus Nitrospira defluvii* bekannt (SPIECK et al., 2006), hohe  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in diese Fettsäure weisen auf eine Abundanz dieser Art in diesem Habitat hin. Besonders hohe Einbauraten in die Hauptkomponente 16:1 *cis* 11 konnten über das gesamte Spektrum der gewählten Inkubationstemperaturen detektiert werden. Der höchste  $^{13}\text{C}$ -Einbau zeigte sich bei einer Nitritkonzentration von 3 mM.

Eine weitere Komponente, welche im Belebtschlamm Markierung aufwies ist die Fettsäure 16:1 *cis* 7. Diese *Nitrospira*-spezifische Fettsäure wurde noch in keinem Organismus aus einer kommunalen Kläranlage als Hauptkomponente identifiziert, was als Indiz auf eine neue Variante von *Nitrospira* gewertet werden kann. Die neue Variante von *Nitrospira*, mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 7, zeigte ein enges Temperaturspektrum, die höchste Aktivität wies dieser Organismus bei einer Temperatur von 17°C und 22°C auf. Hier wurde die Nitritkonzentration von 0,3 mM bevorzugt. Weitere Erkenntnisse zu diesem neuen Organismus sind durch

die molekularbiologischen Ansätze in vorliegender Studie erlangt worden. Diese unterstützen die Anhaltspunkte auf die neue Variante von *Nitrospira* im Belebtschlamm. Durch Analysen der klonierten 16S rRNA Gene konnten auffällige Sequenzunterschiede zu dem bekannten *Nitrospira* aus Belebtschlamm nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit der neu entwickelten Sonde, zeigte in der Anreicherung „BS\_17“ zwei unterschiedliche Zellmorphologien für Organismen der Gattung *Nitrospira*.

Weiterhin gaben die Markierungsversuche mit hohen Einbauraten bei hohen Temperaturen und Nitritkonzentrationen Hinweise auf einen bisher unbekanntem autotrophen Organismus im Belebtschlamm mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 9. Dieser Organismus zeigte die höchste Zellaktivität bei hohen Temperaturen von 28°C und 32°C mit hohen Nitritkonzentrationen von 30 mM. Bisherige Erkenntnisse über das Taxon *Nitrotoga* (ALAWI et al., 2007; ALAWI et al., 2009), schließen die Zugehörigkeit des neuen Organismus zu dieser Art aus. Die im Labor bestimmten Wachstumsparameter weisen ausschließlich auf ein Wachstum bei niedrigen Temperaturen mit niedrigen Nitritkonzentrationen hin. Die autotrophen Organismen beinhalten mit der Fettsäure 16:1 *cis* 9 dieselbe Hauptkomponente, allerdings wurde das Wachstum bei hohen Temperaturen und Nitritkonzentrationen für das Taxon *Nitrotoga* noch nicht beschrieben. Eine weitere Identifizierung und Klassifizierung ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

Wie schon bei JURETSCHKO et al. (1998) mittels FISH-Analysen beschrieben, handelt es sich bei der Gattung *Nitrospira* um einen dominierenden Nitritoxidanten im Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Abundanz und es konnte zusätzlich die metabolische Aktivität dieser Organismen nachgewiesen werden. Die FAME-SIP Analyse liefert Anhaltspunkte auf unterschiedliche Nitrospiren in diesem Ökosystem. Des Weiteren gibt es Anzeichen für einen autotrophen Organismus, der außerhalb der Gattung *Nitrospira* anzusiedeln ist. Die Erkenntnisse zur metabolischen Aktivität können demzufolge genutzt werden, um unbekannte Organismen aus dem Ökosystem anzureichern. Die Anreicherung und Isolierung gewährleistet die Möglichkeit der Charakterisierung und Identifizierung der unbekanntem autotrophen Nitrifikanten aus dem Habitat.

#### 4.4 Analysen zum Biofiltermaterial aus Fischfarmen

Im Biofiltermaterial der Proben aus dem Modul II (Büsum), wurden die Fettsäuren 16:1 *cis* 9 und 18:1 *cis* 11, die Hauptkomponenten von *Nitrotoga*, *Nitrococcus* und *Nitrobacter*, detektiert. Diese zeigten jedoch keinen signifikanten Einbau an  $^{13}\text{C}$  über 4 %. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese im System der Biofilteranlage in Büsum nicht relevant sind. Im Gegensatz dazu wiesen die spezifischen Fettsäuren von *Nitrospira*, die 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11, Einbauraten von bis zu 21 % (Abb. 26) auf. Diese erste Untersuchung gibt wichtige Anhaltspunkte auf die Relevanz von *Nitrospira* in Biofilteranlagen. Weiterführende Untersuchungen konnten mit diesem System nicht durchgeführt werden, da die Anlage geschlossen wurde und die Biofilter für eine weitere Beprobung nicht mehr zur Verfügung standen.

Die erste Markierung der Biofiltermaterialproben aus Strande, welche in die Biofiltersysteme Shrimp (gemischte FK), Barramundi (weiße FK) und Barramundi (schwarze FK) unterteilt ist, erzielten ähnlich hohe Einbauraten in die *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren 16:1 *cis* 7 und 16:1 *cis* 11 (Abb. 27). In diesem Markierungsversuch konnten Einbauraten an  $^{13}\text{C}$  von bis zu 21 % detektiert werden. Die Fettsäure 14:0 zeigte einen Einbau bis zu 8 % in den Proben Barramundi (weiße FK und schwarze FK). Allerdings kommt diese Fettsäure in dem autotrophen Nitritoxidanten *Nitrospina* nur in Kombination mit der Komponente 16:1 *cis* 9 vor. Diese Fettsäure wies keinen erhöhten Einbau an  $^{13}\text{C}$  auf, daher scheint es sich nicht um einen Vertreter dieser nitrifizierenden Bakteriengruppe zu handeln. Die Hauptkomponente 18:1 *cis* 11 zeigte unter den gewählten Bedingungen keine  $^{13}\text{C}$ -Assimilierung.

In einem weiterführenden Versuchsansatz der Füllkörperproben aus Strande wurden die drei Biofiltersysteme mit unterschiedlichen Temperaturen und Nitritkonzentrationen inkubiert. Als Temperaturparameter sind 17°C und 28°C gewählt worden. Die Temperatur von 28°C liegt nahe der Betriebstemperatur der Original-Anlagen. Die Anlage Shrimp wird bei 29°C und die Anlage Barramundi bei 26°C betrieben. Diese Temperaturen entsprechen der optimalen, unter Laborbedingungen ermittelten, Inkubationstemperatur für den aus marinen

Systemen bekannten *Nitrospira marina* NB-295 (WATSON et al., 1986), welche bei 28°C liegt. Die Wärme für die Anlagen stammt aus dem Faulturm der nahe gelegenen kommunalen Kläranlage. Diese Abwärme ist nicht immer steuerbar. Schwankungen der optimalen Temperaturen der Fischfarm sind möglich, wenn z. B. nicht genug Wärme zur Verfügung steht um das notwendige Frischwasser aus der Ostsee vorwärmen zu können, oder die Temperatur in der Anlage auf die optimalen Temperaturen von 26°C bzw. 29°C zu halten. Daher ist mit 17°C eine für das System extrem niedrige Temperatur gewählt worden, welche unter normalen Prozessbedingungen nicht vorkommt. Die Inkubation bei 17°C wurde verwendet, um eine Stresssituation simulieren zu können. Des Weiteren sollten die Analysen auch substratabhängig durchgeführt werden. Daher erfolgte für beide Temperaturen die Inkubation mit Nitritkonzentrationen zwischen 0,3 mM und 10 mM, um die Zellaktivität nicht nur temperaturabhängig sondern auch substratabhängig darstellen zu können. Eine Nitritkonzentration von 10 mM liegt außerhalb der normalen Prozessbedingungen und gibt Anhaltspunkte auf die Toleranz der autotrophen Nitritoxidanten gegenüber hohen Nitritkonzentrationen. Diese Ergebnisse liefern die Möglichkeit Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit der Biofilter führen zu können. Die Nitritgaben der Inkubationen, welche in Hamburg in einem offenen System und in Osnabrück in einem geschlossenen System durchgeführt wurden, weisen über den Inkubationszeitraum keinen Unterschied in den zugeführten Nitritmengen auf (Tab. 16). Daher konnte ausgeschlossen werden, dass der sinkende Sauerstoffgehalt in den gasdichten Kolben einen limitierenden Faktor für die Nitritoxidation während den Inkubationen der marinen Biofilterproben darstellt.

Die Untersuchungen der Biofiltersysteme aus Strande (Abb. 28 und 29) zeigten einen deutlichen Anstieg der Zellaktivität mit zunehmender Nitritkonzentration. Diese wurde für die Nitrit-oxidierende Bakterienpopulation, über die <sup>13</sup>C-Assimilierung in die Hauptkomponenten bestimmt. Während für die spezifischen Fettsäuren der Gattung *Nitrospira*, mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM Einbauraten bis zu 13 % detektierbar waren, konnten für die Inkubationen mit 10 mM Nitrit Einbauraten bis zu 45 % in die spezifischen Hauptkomponenten ermittelt werden. Folglich zeigen die Organismen der Gattung *Nitrospira* auch

unter Stressbedingungen, wie schwankenden Substratkonzentrationen, Einbau in die spezifischen Hauptkomponenten. Sie tolerieren diese Schwankungen und erhöhen sogar die Zellaktivität mit der steigenden Nitritkonzentration, welche unter normalen Prozessbedingungen nicht auf 10 mM ansteigen würde. Unter normalen Prozessbedingungen lagen die gemessenen Nitritkonzentrationen der Anlage in Strände zwischen 10  $\mu\text{m}$  - 100  $\mu\text{M}$  (KEUTER et al., 2009). Eine Konzentration von 10 mM Nitrit wäre toxisch für die meisten Organismen im System und würde die Gesundheit der Fische gefährden, allerdings spricht die Fähigkeit der Gattung *Nitrospira* diese Nitritkonzentration umsetzen zu können für die hohe Leistungsfähigkeit dieser Mikroorganismen in dem Biofiltersystem.

Die Hauptkomponenten der anderen autotrophen Organismen, wie *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospina* und *Nitrococcus* zeigten geringe  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen, welche Werte von 14 % (Abb. 28, 29) nicht überstiegen. Der Organismus *Nitrotoga*, mit der Hauptkomponente 16:1 *cis* 9 wurde bisher nur in terrestrischen Lebensräumen detektiert und zeigte ausschließlich bei niedrigen Temperaturen von 10°C – 17°C (ALAWI et al., 2007 und ALAWI et al., 2009) Wachstum unter Laborbedingungen. Die geringen Einbauraten, die für diese Komponente in den Biofiltern gemessen worden sind, stützen diese bisherigen Kenntnisse. Folglich scheint *Nitrotoga* im marinen System der Biofilteranlagen nicht relevant zu sein, da das System der Anlagen bei Temperaturen von 26°C – 29°C betrieben wird. Weiter ist *Nitrotoga* nach bisherigen Erkenntnissen nicht in marinen Systemen nachgewiesen worden. Die Organismen *Nitrospina*, mit den Hauptkomponenten 14:0 und 16:1 *cis* 9, und *Nitrococcus*, mit den Hauptkomponenten 16:1 *cis* 9 in Kombination mit 18:1 *cis* 11, stammen aus marinen Systemen (WATSON und WATERBURY, 1971b; TESKE et al., 1994), dennoch konnte die Relevanz dieser Organismen im marinen System der Biofilteranlagen nicht bestätigt werden. Die Koexistenz von *Nitrobacter*, mit der Hauptkomponente 18:1 *cis* 11, und *Nitrospira* bei höheren Temperaturen und Nitritkonzentrationen (VANPARYS et al., 2006) wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen war ein relevanter  $^{13}\text{C}$ -Einbau in die Fettsäure 18:1 *cis* 11 nicht nachweisbar. Somit scheint der Nitritoxidant *Nitrobacter* kein wichtiger Vertreter im Biofiltersystem dieser marinen Fischfarm zu sein.

Hohe  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen im Biofiltersystem der marinen Fischfarm in Strande wurden für die *Nitrospira*-spezifischen Fettsäuren detektiert. Hierbei handelt es sich auch um die spezifischen Hauptkomponenten von *Nitrospira marina* Nb-295. Es wurden Einbauraten von bis zu 44 % in die Fettsäure 16:1 *cis* 7 detektiert und  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen von bis zu 45 % für die Fettsäure 16:1 *cis* 11 bei beiden Temperaturen (Abb. 28 & 29). Dies beschreibt die Anpassungsfähigkeit von *Nitrospira* an äußere Bedingungen. Selbst der Temperaturunterschied von 11 °C (von 28°C auf 17°C) schränkt die Zellaktivität dieser Mikroorganismen nicht ein. Der Einbau an  $^{13}\text{C}$  in die spezifischen Fettsäuren von *Nitrospira* blieb konstant hoch und es konnten lediglich Unterschiede in den Prozentanteilen der Fettsäuren in den verschiedenen Inkubationsansätzen nachgewiesen werden. In den Inkubationen „Shrimp“ und „Barramundi (schwarze FK und weiße FK) 28°C“ (Abb. 30 & 31) wurden höhere Einbauraten in die Hauptkomponente 16:1 *cis* 7 detektiert. Die Proben aus „Barramundi (schwarze FK) 17°C“ (Abb. 30) zeigte ähnliche  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in beide Hauptkomponenten von *Nitrospira*. Für die Biofilterprobe „Barramundi (weiße FK) 17°C“ (Abb. 30) sind höhere Einbauraten in die spezifische Fettsäure 16:1 *cis* 11 ermittelt worden. Diese variierenden Prozentanteile in die spezifischen Fettsäuren geben Anhaltspunkte auf verschiedene Ökotypen der Gattung *Nitrospira* in dem Biofiltersystem der marinen Fischfarm. Die unterschiedlichen  $^{13}\text{C}$ -Assimilierungen in die spezifischen Komponenten der Gattung *Nitrospira* weisen auf die unterschiedlichen Nischen im Biofiltersystem hin, die von unterschiedlichen Varianten dieser Gattung besetzt werden können. In KEUTER et al. (eingereicht) ist eine solche neue Variante beschrieben worden. Ecomares 2.1 wurde aus dem Biofiltersystem der marinen Aquakulturanlage Büsum angereichert. Es handelte sich um einen nahen Verwandten zu der Gattung *Nitrospira marina*. Diese neue Variante kann sehr hohe Substratkonzentrationen tolerieren. Die Vermutung, dass es sich auch im Biofiltersystem der Aquakulturanlage Strande um unterschiedliche Ökotypen handelt, sowie die Verwandtschaft mit dem bekannten *Nitrospira marina* Nb-295 wurde mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungen auf 16S rRNA-Ebene weiterführend analysiert.

Die Hinweise aus dem chemotaxonomischen Ansatz dieser Studie, dass es sich im Biofiltersystem um verschiedene Ökotypen der Gattung *Nitrospira* handelt, wird auch durch die Sequenzanalysen der 16S rRNA gestützt. Es konnten ähnliche Sequenzen in Hamburg, sowie in vorliegender Studie identifiziert werden. Im Cluster I (Abb. 30), befinden sich die 16S rRNA Gensequenzen von *Nitrospira marina* (Acc. Nr. X872559), Ecomares 2.1 (Acc. Nr. HQ686082) und klonierte Sequenzen aus allen drei Modulen. Die meisten klonierten Sequenzen aus dem Modul Shrimp (17°C) bilden mit Cluster II eine eigene Untergruppe, es konnte nur eine klonierte Sequenz („Sh 17 10 HH clone1“) dieser Probe nachgewiesen werden, welcher sich in das Cluster I eingliedert. Dieser weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu der klonierten Sequenz „Sh 17 10 HH clone1“ auf, welcher aus dem Modul Shrimp (28°C) stammt. In den Modulen Barramundi („Bw“ und „Bb“) und Shrimp („Sh 28°C“) scheinen mehrere Varianten von *Nitrospira* relevante Organismen dieses Systems zu sein, da diese klonierten Sequenzen über Cluster I, III und IV verteilt vorlagen. Eine interessante Abgrenzung zu den klonierten Sequenzen aus Cluster I und Cluster II konnte für die klonierten Sequenzen der Clusters III und IV vorgenommen werden. Die Cluster III und IV enthalten klonierte Sequenzen aus allen drei Modulen, bis auf Sequenzen aus „Sh17“. Für diese klonierten Sequenzen wurden Unterschiede in den Sequenzpositionen 482 – 487 detektiert, diese Abgrenzung liegt für alle in Cluster I und II befindlichen Sequenzen, sowie für die Sequenz von der Außengruppe *Nitrospira moscoviensis* M-1 (Acc. Nr. X82558) vor. Um den Verwandtschaftsgrad dieser Varianten aufklären zu können müssen diese weiter angereichert werden. Anhand der isolierten Organismen der Gattung *Nitrospira* kann darauf folgend eine exakte Charakterisierung und Identifizierung vorgenommen werden, welche die in dieser Studie gefundenen Anhaltspunkte belegen können.

Zusammenfassend wird deutlich, dass es Hinweise auf unterschiedliche Ökotypen der Gattung *Nitrospira* im untersuchten Habitat gibt. Es konnten mit den unterschiedlichen Clustern Abgrenzungen in der Sequenz, vor allem für die Cluster III und IV, vorgenommen werden. Weiter wurde über die unterschiedlichen Einbauraten in die spezifischen Fettsäuren für *Nitrospira* die metabolische Zellaktivität dieser Gattung bestätigt. Die Einbauraten in die Hauptkomponenten

von *Nitrospira* unterschieden sich. Im Shrimp Biofilter ist bei beiden Temperaturen und im Barramundi Biofilter bei der Temperatur von 28°C ein höherer Einbau in die Fettsäure 16:1 *cis* 7 analysiert worden. Weiter wies die Probe des Biofilters Barramundi (weiße FK; 17°C) eine höhere <sup>13</sup>C-Assimilierung in die Komponente 16:1 *cis* 11 auf. Die Probe aus dem Biofilter Barramundi (schwarze FK; 17°C) zeigte ähnliche Einbauraten in beide spezifischen Komponenten. Folglich gibt es auch über die Fettsäureanalysen Hinweise auf mehrere Varianten der Gattung *Nitrospira* im untersuchten System, welche sich in den Sequenzanalysen über Unterschiede in den Basenpaarungen genauer definieren lassen. Eine Abgrenzung der Probe Shrimp 17°C (gemischte FK), wie dies mit der Bildung von Cluster II deutlich wurde, konnte über den Einbau in die Fettsäuren nicht identifiziert werden. Die Probe Shrimp (gemischte FK; 17°C) wies in den Markierungsgraden einen höheren Einbau in die Fettsäure 16:1 *cis* 7 auf, dieser höhere Einbau zeigte sich allerdings auch in Proben von Shrimp (gemischte FK), Barramundi (weiße FK) und Barramundi (schwarze FK), die bei 28°C inkubiert wurden. In den Biofiltermodulen der marinen Fischfarm scheinen verschiedene Varianten der Gattung *Nitrospira* vorzuliegen, welche Sequenzunterschiede zu dem aus marinen Systemen bekannten Organismus *Nitrospira marina* NB-295 aufweisen. Dies wird auch über die unterschiedlichen <sup>13</sup>C-Assimilierungen in die spezifischen Fettsäuren gestützt. Weiterführende Untersuchungen, wie die Anreicherung und Isolierung der verschiedenen Nitrospiren, sowie die Identifizierung des kompletten Gens, können den Verwandtschaftsgrad dieser Varianten aufklären und somit die Hinweise vorliegender Untersuchungen bestätigen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Organismen der Gattung *Nitrospira* auf abweichende Parameter, wie möglichen Temperaturschwankungen, reagieren können und weiter Zellaktivität aufweisen. Dabei wurden für die Organismen bei den gewählten Temperaturen höhere metabolische Zellaktivitäten bei hohen Nitritkonzentrationen ermittelt. Dies konnte durch höhere Einbauraten in die Fettsäuren bei steigender Nitritkonzentration detektiert werden, was auf eine hohe Leistungsfähigkeit dieser Nitrifikanten im Biofilter hinweist. Die Fähigkeit von *Nitrospira*, hohe Zellaktivitäten bei hohen Nitritkonzentrationen zeigen zu können,

widerspricht der von SCHRAMM et al. (1999) aufgestellten r/K-Hypothese. Die Markierungsexperimente der marinen Aquakulturanlagen liefern eindeutige Anhaltspunkte auf Zellaktivitäten von *Nitrospira* in einem System, welches mit hohen Substratkonzentrationen belegt ist. Dagegen wurde mit der in vorliegender Studie analysierten neuen Variante von *Nitrospira* aus Belebtschlamm, ein Organismus der Gattung *Nitrospira* detektiert, welcher der r/K-Hypothese von SCHRAMM et al. (1999) folgt. Diese Untersuchungen stützen die Hypothese von MAIXNER et al. (2006), dass die Definition zu den r/K-Strategien für die Gattung *Nitrospira* einer variablen Unterscheidungsbasis benötigt, welche auf einer imaginären Skala die Organismen der Gattung *Nitrospira* den r/K-Strategen zuweisen könnte. Nach dieser Hypothese sollten Gattungen wie *Nitrospira* nicht eindeutig der r- oder K-Strategie zugeordnet werden, da diese Gattungen Arten beider Strategien aufweisen. Zudem gibt es Anhaltspunkte über die Sequenzanalysen, dass im Biofiltermaterial „Shrimp“ bei einer Temperatur von 17°C scheinbar eine Variante von *Nitrospira* dominiert, dies könnte ein Anzeichen für einen sehr anpassungsfähigen Ökotyp sein, welcher auf den Temperaturstress besonders gut reagieren kann. Die Untersuchungen zu den Biofiltersystemen aus marinen Fischfarmen konnten die Relevanz der Gattung *Nitrospira* für diese technisch genutzten Systeme belegen. Weitere Nitritoxidanten zeigten keine Aktivität in den untersuchten Systemen. Die ökologischen Nischen dieses Systems werden von Organismen der Gattung *Nitrospira* besetzt.

Durch Technologien, die Bakteriengemeinschaften in Biofiltersystemen nutzen, kann auf ökologische Weise Abwasserreinigung durchgeführt werden, wodurch die Belastung von natürlichen Gewässern reduziert wird. Die Charakterisierung dieser involvierten Bakteriengemeinschaften liefern wertvolle Anhaltspunkte, die für den effizienten Einsatz und eine hohe Leistungsfähigkeit der Biofiltersysteme in der biologischen Abwasserreinigung wichtig sind. Demzufolge leisten Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität dieser Ökosysteme entscheidende Hinweise für den Umweltschutz.

## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte wichtige Anhaltspunkte auf die Zellaktivität der Nitrit-oxidierenden Bakteriengemeinschaft in verschiedenen Ökosystemen, wie der Belebungsanlage einer kommunalen Kläranlage und dem Biofiltersystem mariner Aquakulturanlagen darlegen. Zudem wurde gezeigt, dass Organismen der Gattung *Nitrospira* die wichtigsten Vertreter für die Nitritoxidation in den untersuchten Habitaten darstellen.

Allerdings ist immer noch sehr wenig über diese Organismen bekannt, es sind bisher nur drei Spezies dieser Gattung isoliert worden, da dies eine zeitintensive Prozedur ist. Eine Optimierung der Kultivierungsmethode würde die Anreicherung von *Nitrospira* im Labor erleichtern.

Zellmaterial ist bis zu diesem Zeitpunkt noch ein limitierender Faktor. Jedoch ist diese Biomasse notwendig um die Funktion und Struktur von Nitrit-oxidierenden Bakterien aufklären zu können. Die Untersuchungen dieser Studie haben gezeigt, dass es in Organismen der Gattung *Nitrospira*, wie *Nitrospira* aus heißen Quellen, Unterschiede in der Zusammensetzung der spezifischen Fettsäuren gibt. Diese Unterschiede zeigten sich allerdings nicht in der 16S rRNA Sequenzanalyse, welche von LEBEDEVA et al. (2011) durchgeführt wurde. Genanalysen der NXR-Region könnten die phylogenetische Verwandtschaft der Organismen aufklären. Zudem wiesen Anreicherungen der Gattung *Nitrospira* aus den marinen Systemen bei unterschiedlichen Temperaturen Anpassungen der Lipide zur Erhaltung der Fluidität der Zellmembran auf. Dagegen zeigten andere Anreicherungen, wie die von *Candidatus Nitrospira defluvii*, keine Anpassungen der Fettsäuren. Dies impliziert die Notwendigkeit zusätzlicher Analysen, um diese Verhaltensmuster aufzuklären. So würden chemotaxonomische Untersuchungen, welche unter anderem die Zusammensetzung der Chinone und polaren Lipide beinhalten könnten, weiterführende Anhaltspunkte zu den Strukturen und Funktionen in der Membran von *Nitrospira* liefern.

## 6. Literatur

ABELIOVICH A. (2006): The Nitrite-Oxidizing Bacteria. In: The Prokaryotes, Springer Verlag, New York. 3: 861-872.

AHLERS B., KÖNIG W. und BOCK E. (1990): Nitrite reductase activity in *Nitrobacter vulgaris*. FEMS Microbiol Lett. 67: 121-126.

ALAWI M., LIPSKI A., SANDERS T., PFEIFFER E. M. und SPIECK E. (2007): Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. ISME J. 1, 256-264.

ALAWI M., OFF S., KAYA M. und SPIECK E. (2009): Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. Environ Micro Reports. 1(3): 184-190.

ALEEM M. I. H., HOCH G. E. & VARNER J. E. (1965): Water as the source of oxidant and reductant in bacterial chemosynthesis. Proc Nat Acad Sci USA. 54: 869-873.

ALEXANDRINO M., KNIEF C. und LIPSKI A. (2001): Stable isotope-based labeling of styrene-degrading microorganisms in biofilters. Appl Environ Microbiol. 67: 4796-4804.

AL-HALBOUNI D., TRABER J., LYKO S., WINTGENS T., MELIN T., TACKE D., JANOT A., DOTT W., HOLLENDER J. (2008): Correlation of EPS content in activated sludge at different sludge retention times with membrane fouling phenomena. Water Res. 42: 1475-1488.

ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W. MYERS E. W. und LIPMAN D. J. (1990): Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215: 403-410.

AMANN R. I., BINDER B. J., OLSON R. J., CHISHOLM S. W., DEVEREUX R. & STAHL D. A. (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl Environ Microbiol. 56: 1919-1925.

ARAO T. (1999): In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring  $^{13}\text{C}$  incorporation into soil phospholipid fatty acids from  $^{13}\text{C}$  acetate. Soil Biol Biochem. 31: 1015-1020.

ASHELFORD K.E., CHUZHANOVA N.A., FRY J.C., JONES A.J. and WEIGHTMAN A.J. (2005): At Least 1 in 20 16S rRNA Sequence Records Currently Held in Public Repositories Is Estimated To Contain Substantial Anomalies. Appl Environ Microbiol. 71: 7724-7736.

BOCK E., SUNDERMEYER-KLINGER H. & STACKEBRANDT E. (1983): New facultative lithoautotrophic nitrite oxidizing-bacteria. Arch Microbiol. 136: 281-284.

BOCK E., KOOPS H.-P., MÖLLER U. C. & RUDERT M. (1990): A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Arch Microbiol.* 153: 105-110.

BOCK E., KOOPS H.-P., HARMS H. und AHLERS B. (1991): The biochemistry of nitrifying organisms. In: J. M. Shively (Ed.) *Variations of Autotrophic Life.* Academic Press. London, 171–200.

BOCK E. und KOOPS H. P. (1992): The genus *Nitrobacter* and related genera. In: *The Prokaryotes.* Springer-Verlag, New York. 3: 2302-2309.

BOCK E. & SAND W. (1993): The microbiology of masonry biodeterioration. *J Appl Bacteriol.* 74: 503-504.

BOCK E. und WAGNER M. (2006): Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as Energy Source. In: *The Prokaryotes.* Springer-Verlag, New York. 2: 457-495.

BOSCHKER H. T. S., NOLD S. C., WELLSBURY P., BOS D., DE GRAAF W., PEL R., PARKES R. J. & CAPPENBERG T. E. (1998): Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature.* 392: 801-805.

BOSCHKER H. T. S. und MIDDELBERG J. J. (2002): Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Micobiol Ecol.* 40: 85-95.

BROSIUS J., PALMER M. L., KENNEDY P. J., NOLLER H. F. (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 75: 4801-4805.

BRUNS F. (2007): Vergleich von Mikroorganismengemeinschaften aus arktischen und antarktischen Habitaten. Diplomarbeit: Universität Osnabrück.

BULL I. D., PAREKH N. R., HALL G. H., INESON P. und EVERSHERD R. P. (2000): Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature.* 405: 175-178.

CÉBRON A. & GARNIER J. (2005): *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Reserarch.* 39: 4979-4992.

CROSSMAN Z. M., INESON P. und EVERSHERD R. P. (2005): The use of  $^{13}\text{C}$  labelling of bacterial lipids in characterisation of ambient methane-oxidising bacteria in soils. *Org Geochem.* 36: 769-778.

CROSSMAN Z. M., WANG Z.-P., INESON P. und EVERSHERD R. P. (2006): Investigation of the effect of ammonium sulphate on populations of ambient methane oxidising bacteria by  $^{13}\text{C}$ -labelling and GC/C/IRMS analysis of phospholipid fatty acids. *Soil Biol Biochem.* 38: 983-990.

DAIMS H., NIELSEN P. H., NIELSEN J. L., SCHLEIFER K.-H. und WAGNER M. (2001): In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5273-5284.

DE LA TORRE J.R., WALKER C.B., INGALLS A.E., KÖNNEKE M., STAHL D.A. (2007): Cultivation of ammonium oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol.* 10: 810-818.

DE MENDOZA D. und CRONAN JR. J. E. (1983): Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem Sc.* 8: 49-52.

DERANGE V. & BARDIN R. (1995): Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 6: 2093-2098.

DIAB S. & SHILO M. (1988): Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp and *Nitrobacter* sp. *Arch Microbiol.* 150: 387-393.

EHRICH S., BEHRENS D., LEBEDEVA E., LUDWIG W. and BOCK E. (1995): A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationships. *Arch Microbiol.* 164: 16-23.

EUROPÄISCHE UNION (1991): Richtlinie des Rates über die Behandlung von kommunalem Abwasser (91/271/EWG). Anhang 1. Anforderungen an kommunale Abwässer. Tabelle 2.

FOESEL B.U., GIESEKE A., SCHWERMER C., STIEF P., KOCH L., DE LA TORRE J.R., VAN RIJN J., MINZ D., DRAKE H.L., SCHRAMM A. (2007): *Nitrosomonas* Nm143-like ammonia oxidizers and *Nitrospira marina*-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiol Ecol.* 63 (2): 192-204.

FREITAG T.E. & PROSSER J.I. (2003): Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1359-1371.

FUKUOKA M., FUKUMORI Y. & YAMANAKA T. (1987): *Nitrobacter winogradsky* cytochrome a1c1 is an iron-sulfur molybdoenzyme having hemes a and c. *J Biochem.* 102: 525-530.

GALLERT C. & WINTER J. (2005): Biologische Abwasserreinigung. In: *Angewandte Mikrobiologie*. Springer Verlag, Heidelberg. 489-509.

GREEN C. T. und SCOW K. M. (2000): Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydro J.* 8: 126-141.

HAMBURG WASSER (2010): [www.hamburgwasser.de](http://www.hamburgwasser.de)

HAMBURG WASSER (2010): Beseitigung von kommunalem Abwasser. Lagebericht 2008. [www.hamburgwasser.de](http://www.hamburgwasser.de)

- HARMS H., KOOPS H.-P., MARTINY H. und WULLENWEBER W. (1981): D-Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and polyhedral inclusions in *Nitrosomonas* spec. Arch Microbiol. 128: 280-281.
- HATZENPICHLER R., LEBEDEVA E.V., SPIECK E., STOECKER K., RICHTER A., DAIMS H., WAGNER M. (2008): A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proc Natl Acad Sci USA. 105: 2134-2139.
- HEAD I. M., HIORNS W. D., EMBLEY T. M., MCCARTHY A. J. und 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.
- HENZE M., HARREMOËS P., LA COUR JANSEN J. und ARVIN E. (1997): Wastewater treatment, Springer-Verlag, Berlin.
- HIRAYAMA H., TAKAI K., INAGAKI F., YAMATO Y., SUZUKI M., NEALSON K.H., HORIKOSHI K. (2005): Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. Extremophiles. 9: 169-184.
- HOLLOCHER T. C., TATE M. E. und NICHOLAS D. J. D. (1981): Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. J Biol Chem. 256: 10834-10836.
- HOVANEC T. A., TAYLOR L. T., BLAKIS A. und DELONG, E. F. (1998): *Nitrospira*-Like bacteria associated with Nitrite oxidation in freshwater aquaria. Appl Environ Microbiol. 64: 258-264.
- HUTCHENS E., RADAJEWSKI S., DUMONT M. G., McDONALD I. R. und MURRELL J. C. (2004): Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. Environ Microbiol. 6: 111-120.
- ITOI S., EBHARA N., WASHIO S. und SUGITA H. (2007): Nitrite-oxidizing bacteria, *Nitrospira*, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish *Carassius auratus*. Aquaculture. 264: 297-308.
- ICSP (2008): Judicial commission of the international committee on systematics of prokaryotes. Status of strains that contravene Rules 27 (3) and 30 of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 81. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 1755-1763.
- IUPAC-IUB (1976): Nomenclature of lipids. Eur J Biochem. 1977, 79: 11-21.
- JETTEN M., WAGNER M., FUERST J., VAN LOOSDRECHT M., KUENEN G. und STROUS M. (2001): Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ("anammox") process. Curr Opin Biotechnol. 12: 283-288.

JURETSCHKO S., TIMMERMANN G., SCHMID M., SCHLEIFER K.-H., POMMERENING-RÖSER A., KOOPS H.-P. und WAGNER M. (1998): Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. Appl Environ Microbiol. 64: 3042-3051.

KANOKRATANA P., CHANAPAN S., POOTANAKIT K. und EURWILAICHITR L. (2004): Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. J Basic Microbiol. 44: 430-444.

KEUTER S., JOZSA P.-G., ALAWI M., QUANTZ G., WOLBECK R., DÖBBER J., WATERMANN B., KLOTH D., SAND W., SCHRÖTZ J., KRUSE M., SPIECK E. (2009): Entwicklung neuartiger Trägermaterialien für die Wasseraufbereitung und Kreislaufführung in Marikultur-Produktionsanlagen der Fischzucht Projekt-Phase II – Zwischenbericht August 2009. DBU gefördertes Projekt. (Projekt AZ 23821/02).

KEUTER S., KRUSE M., LIPSKI A. und SPIECK E. (2011): Relevance of *Nitrospira* for nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system and physiological features of a *N. marina*-like isolate. Environ Microbiol. eingereicht.

KIM Y. H., CHO J. H., LEE Y. W. und LEE W. K. (1997): Development of a carrier for adhesion of nitrifying bacteria using a thermodynamic approach. Biotechnol Tech. 11(11): 773-776.

KIM D.J. & KIM S.H. (2006): Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. Water Res. 40: 887-894.

KNIEF, C., K. ALTENDORF und A. LIPSKI (2003): Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of <sup>13</sup>C-labeled fatty acids. Environ Microbiol. 5: 1155-1167.

KNOWLES R. (1982): Denitrification. Microbiol Rev. 46: 43-70.

KNOWLES R. (2000): Nitrogen Cycle. In: Lederberg, J. (Hrsg.) Encyclopedia of microbiology. Academic Press, San Diego. 379-391.

KÖNNEKE M., BERNHARD A.E., DE LA TORRE J.R., WOLKER C.B., WATERBURY J.B., STAHL D.A. (2005): Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature. 437: 543-546.

KOHRING L. L., RINGELBERG D. B., DEVEREUX R., STAHL D. A., MITTELMAN M. W. und WHITE D. C. (1994): Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulphate-reducing bacteria. FEMS Microbiol Letters. 119: 303-308.

KUENEN J.G. (2008): Anammox bacteria: from discovery to application. Nature. 6: 320-326.

KUMAR S., NICHOLAS D. J. D. und WILLIAMS E. H. (1983): Definitive  $^{15}\text{N}$  NMR evidence that water serves as a source of „O“ during nitrite oxidation by *Nitrobacter agilis*. FEMS Microbiol Letters. 152: 71-74.

LABRENZ M., JOST G. & JÜRGENS K. (2007): Distribution of abundant prokaryotic organisms in the water column of the central Baltic Sea with an oxic–anoxic interface. Aquatic Microb Ecol. 46: 177-190.

LANE D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E., S., and M., G. (eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, pp. 115-175.

LARSEN P., NIELSEN J.L., SVENDSEN T.C., NIELSEN P.H. (2008a): Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge. Water Res. 42: 2814-2826.

LARSEN P., NIELSEN J.L., OTZEN D., NIELSEN P.H. (2008b): Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. Appl Environ Microbiol. 74 (5): 1517-1526.

LAW J. H. (1971): Biosynthesis of cyclopropane rings. Acc Chem Res. 4: 199-203.

LEBEDEVA E. V., ALAWI M., FIENCKE C., NAMSARAEV B., BOCK E. & SPIECK E. (2005): Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. FEMS Microbiol Ecol. 54: 297-306.

LEBEDEVA E. V., ALAWI M., MAIXNER F., JOZSA P.-G., DAIMS H. and SPIECK E. (2008): Physiological and phylogenetical characterization of a new lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium “*Candidatus Nitrospira bockiana*” sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 242-250.

LEBEDEVA, E. V., OFF S., ZUMBRÄGEL S., KRUSE M., SHAGZHINA A., LÜCKER S., MAIXNER F., LIPSKI A., DAIMS H. & SPIECK E. (2011): Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. FEMS Microbiol Ecol. 75: 195-204.

LIPSKI A. und ALTENDORF K. (1997): Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. System Appl Microbiol. 20, 448-457.

LIPSKI A., SPIECK E., MAKOLLA A. und ALTENDORF K. (2001): Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity. System Appl Microbiol. 24: 377-384.

LIPSKI A. (2006): Detection of autotrophic sulphur- and iron-oxidizing bacteria using labelled fatty acid methyl esters (FAMES). In: Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis. CAB International 2006. 8: 132-145.

LÓPEZ-GARCÍA P., PHILIPPE H., GAILL F. und MOREIRA D. (2003): Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental micro-colonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100: 697–702.

LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FORSTER W., BRETTSCHE I., GERBER S., GINHART A. W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KOENIG A., LISS T., LUESSMANN R., MAY M., NONHOFF B., REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A. und SCHLEIFER K.-H. (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371.

LÜCKER S., WAGNER M., MAIXNER F., PELLETIER E., KOCH H., VACHERIE B., RATTEI T., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., SPIECK E., LE PASLIER D. und DAIMS H. (2010): A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *PNAS*. 107:13479-13484.

MAIKAK B. L., COLE J. R., LILBURN G., PARKER JR. C. T., SAXMAN P. R., FARRIS R. J., GARRITY G. M., OLSEN G. J., SCHMIDT T. M. und TIEDJE J. M. (2001): The RDP-II (Ribosomal Database Project) *Nucleic Acids Res.* 29, 173-174.

MAIXNER F., NOGUERA D.R., ANNESER B., STOECKER K., WEGL G., WAGNER M., DAIMS H. (2006): Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ Microbiol.* 8: 1487-1495.

MAIXNER F., WAGNER M., LÜCKER S., PELLETIER E., SCHMITZ-ESSER S., HACE K., SPIECK E., KONRAT R., LE PASLIER D., DAIMS H. (2008): Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium ‘*Candidatus Nitrospira defluvii*’. *Environ Microbiol.* 10:3043–3056.

MAIXNER F. (2009): The ecophysiology of nitrite-oxidizing bacteria in the genus *Nitrospira*: Novel aspects and unique features. Dissertation, Department of Microbial Ecology, University of Vienna (Austria).

MANSCH R. & BOCK E. (1998): Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation.* 9: 47-64.

MANZ W., AMANN R. I., LUDWIG W., WAGNER M. und SCHLEIFER K.-H. (1992): Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst Appl Microbiol.* 15: 593-600.

MARSHALL K. (1996): Adhesion as a strategy for access to nutrients. In: Fletcher M (ed.) *Bacterial adhesion – molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, NY: 59-87.

MEINCKE M., BOCK E., KASTRAU D. und KRONECK, P. M. H. (1992): Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch Microbiol.* 158: 127–131.

MESSING, J. (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101: 20-78.

MUYZER G., DE WAAL E.C., UITTERLINDEN A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59: 695-700.

NICHOLS P. D., GUCKERT J. B. & WHITE D. C. (1986). Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *J Microbiol Methods.* 5: 49-55.

NOGUEIRA R. & MELO L.F. (2006): Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 95: 169-175.

NYBERG K., SCHNÜRER A., SUNDH I. JARVIS Å. & HALLIN S. (2006): Ammonia-oxidizing communities in agricultural soil incubated with organic waste residues. *Biol Fertil Soils.* 42: 315-323.

OLSON T. C. & HOOPER A. B. (1983): Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: An extracytoplasmatic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 19: 47-50.

ORSO S., GOUY M., NAVARRO E. und NORMAND P. (1994): Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 83-86.

PARK H.-D. und NOGUERA D.R. (2008): *Nitrospira* community composition in nitrifying reactors operated with two different dissolved oxygen levels. *J Microbiol Biotechnol.* 18 (8): 1470-1474.

PEL R., OLDENHUIS R., BRAND W., VOS A., GOTTSCHAL J. C. und ZWART K. B. (1997): Stable isotope analysis of a combined nitrification-denitrification sustained by thermophilic methanotrophs under low-oxygen conditions. *Appl Environ Microbiol.* 63: 474-481.

PETERSEN S. O., KLUG M. J. (1994): Effects of sieving, storage and incubation temperature on the phospholipids fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl Environ Microbiol.* 60 (7): 2421-2430.

POMBO S. A., PELZ O., SCHROTH M. H. & ZEYER J. (2002): Field-scale <sup>13</sup>C-labeling of phospholipid fatty acids (PLFA) and dissolved inorganic carbon: tracing acetate assimilation and mineralization in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *FEMS Microbiol Ecol.* 41: 259-267.

POMMERENING-RÖSER A., RATH G. & KOOPS H.-P. (1996): Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Syst Appl Microbiol.* 19: 344-351.

PURKHOLD U., POMMERENING-RÖSER A., JURETSCHKO S., SCHMIDT 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.

- QUINN P. J. (1981): The fluidity of cell membranes and its regulation. *Prog Biophy Mol Biol.* 38: 1-104.
- RADAJEWSKI S., INESON P., PAREKH N. R. und MURELL J. C. (2000): Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature.* 403: 646-649.
- RODRÍGUEZ Y., BALLESTER A., BLÁZQUEZ M. L., GONZÁLEZ F. & MUÑOZ J. A. (2003): Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite and sphalerite. *Geomicrobio J.* 20: 131-141.
- ROHWEDDER W. K. (1985): Mass spectrometry of lipids labelled with stable isotopes. *Prog Lipid Res.* 24: 1-18.
- ROHWERDER T., SAND W. and LASCU C. (2003): Short Communication Preliminary evidence for a sulphur cycle in Movile Cave, Romania. *Acta Biotechnol.* 23: 101-107.
- ROHWERDER T., GEHRKE T., KINZLER K. and SAND W. (2003): Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulphide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 239-248.
- RUSSEL N. J. (1984): Mechanisms of thermal adaption in bacteria: blueprints für survival. *T Bioch Sc.* 9: 108-112.
- RUSSELL N. J. und FUKUNAGA N. (1990): A comparsion of thermal adaption of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 75: 171-182.
- SAITOU R. R. und NEI M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Ecol Evol.* 4: 406-425.
- SASSER M. (1990): Identification of bacteria through fatty acids analysis. In: *Methods on Phytobacteriology.* Klement Z., Rudolph K. and Sands D. C. (eds). Budapest, Hungary. Akademiai Kiado, 199-204.
- SCHLEPER C. JURGENS G. und JONUSCHEIT M. (2005): Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol.* 3(6): 479-488.
- SCHMIDT E. L. und BELSER L. W. (1994): Autotrophic Nitrifying Bacteria. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., and Bottomley, P.J.(ed.), In: *Methods of Soil Analysis. Part 2-Microbiological and Biochemical Properties.* Soil Science Society of America, Madison, USA,159–177.
- SCHRAMM A., DE BEER D., VAN DEN HEUVEL J. C. OTTENGRAF S., AMANN R. (1999): Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* ssp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and use of microsensors. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3690-3696.

- SIKORSKI J. (2008): Populations under microevolutionary scrutiny: what will we gain? *Arch Microbiol.* 189: 1-5.
- SINENSKY M. (1974): Homeoviscous adaption – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad USA.* 71 (2): 522-525.
- SOKAL R. R., ROHLF F. J. (1981): *Biometry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 2: 229-231.
- SOROKIN D. Y., MUYZER G., BRINKHOFF T., KUENEN J. G. und JETTEN M. S. (1998): Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. *Arch Microbiol.* 170: 345-352.
- SOUTHWICK P.L., ERNST L.A., TAURIELLO E.W., PARKER S.R., MUJUMDAR R.B., MUJUMDAR S.R., CLEVER H.A. & WAGGONER A.S. (1990): Cyanine dye labeling reagents carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry.* 11: 418–430.
- SPIECK E. und BOCK E. (2005): The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, Springer-Verlag, New York. 2: 149-153.
- SPIECK E., HARTWIG C., MCCORMACK I., MAIXNER F., WAGNER M., LIPSKI A., and DAIMS H. (2006): Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol.* 8: 405-415.
- SPIECK E., JOZSA P.-G., ALAWI M., BRILL F., QUANTZ G., BETH S., WOLBECK R., WATERMANN B. (2007): Entwicklung neuartiger Trägermaterialien für die Wasseraufbereitung und Kreislaufführung in Marikultur-Produktionsanlagen der Fischzucht. Abschlussbericht Projekt-Phase I. DBU gefördertes Projekt. (Projekt AZ 23821).
- STARKENBURG S. R., ARP D. J. und BOTTOMLEY P. J. (2008b): Expression of a putative nitrite reductase and the reversible inhibition of nitrite-dependent respiration by nitric oxide in *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Environ Microbiol.* 10: 3036-3042.
- STRECKER M. E. SICKINGER R. S., ENGLISH J. M. und BOCK E. (1994): Calvin Cycle genes in *Nitrobacter vulgaris* T3. *FEMS Microbiol Lett.* 120: 45-50.
- STROUS M., FUERST J. A., KRAMER E. H. M., LOGEMANN S., MUYZER V., VAN DE PAS-SCHOONEN K. T., WEBB R., KUENEN J. G. und JETTEN M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* 400: 446–449.

STRUNK O., GROSS O., BEICHEL B., MAY M., HERMANN S., STRUCKMANN., NONHOFF B., LENKE M., GINHARDT A., VILBIG A., LUDWIG T., BODE A., SCHLEIFER K.-H. and LUDWIG W. (1998): ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB>. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Germany.

SUGITA H., NAKAMURA H. und SHIMADA T. (2005): Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture*. 243: 403-409.

SUNDERMEYER-KLINGER H., MEYER V., WARNINGHOFF B. und BOCK E. (1984): Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*. Evidence for a nitrate reductase system. *Arch Microbiol*. 140: 153.158.

TAKAHASHI R., OHMORI T., WATANABE K. und TOKUYAMA T. (1993): Phosphoenolpyruvate carboxylase of ammonia oxidizing chemoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *J Ferm Bioeng*. 76: 232-234.

TAL Y., WATTS J. E. M., SCHREIER, S. B., SOWERS, K. R. und SCHREIER, H. J. (2003): Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture*. 215: 187-202.

TAMURA K., DUDLEY J., NEI M. & KUMAR S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24 (8):1596-1599.

TARRE S. & GREEN M. (2004): High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. *App Environ Microbiol*. 70 (11): 6481-6487.

THAUER, R.K., JUNGERMANN, K., und DECKER, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*. 41: 100-180.

TEIXERA P., AZEREDO J., OLIVEIRA R. und CHIBOWSKI E. (1998a): Interfacial interactions between nitrifying bacteria and mineral carriers in aqueous media determined by contact angle measurements and thin layer wicking. *Coll Surf B: Biointerfaces*. 12: 69-75.

TEIXERA P., OLIVEIRA R. (1998b): The importance of surface properties in the selection of supports for nitrification in airlift bioreactors. *Bioproc Engin*. 19: 143-147.

TESKE A., ALM E., REGAN J. M., TOZE S., RITTMANN B. E., STAHL D. A. (1994): Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite oxidizing bacteria. *J Bacteriol*. 176: 6623-6630.

TRINKWASSERVERORDNUNG (2001): Trinkwasserverordnung; Abschnitt 2: Beschaffenheit des Wassers für den menschlichen Gebrauch; § 7 Indikatorparameter; Anlage 3.

UTAKER J. B., BAKKEN L., JIANG Q. Q. und NES I. F., (1995): Phylogenetic analysis of seven new isolates of ammonia-oxidizing bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Sys Appl Microbiol.* 18: 549-559.

VAN DER MEER M. T. J., SCHOUTEN S., SINNINGHE DAMSTÉ J. S. und WARD D. M. (2007): Impact of carbon metabolism on <sup>13</sup>C signatures of cyanobacteria and green non-sulfur-like bacteria inhabiting a microbial mat from an alkaline siliceous hot spring in Yellowstone National Park (USA). *Environ Microbiol.* 9(2): 482-491.

VANPARYS B., SPIECK E., HEYLEN K., WITTEBOLLE L., GEETS J., BOON N., DE VOS P. (2006): The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Sys App Microbiol.* 30: 297-308.

VLASCEANU L., POPA R. und KINKLE B. K. (1997): Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *App Environ Microbiol.* 63: 3123-3127.

WAGNER M., RATH G., KOOPS H.-P., FLOOD J. & AMANN R. (1996): In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Technol.* 34: 237-244.

WARD B. B. und CARLUCCI A. F. (1985): Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in culture and in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 50: 194-201.

Watson S. W. (1971a): Taxonomic consideration of the family Nitrobacteraceae Buchanan: Requests for opinions. *Int J Syst Bacteriol.* 21: 254-270.

WATSON S. W. und WATERBURY J. B. (1971b): Characteristics of two nitrite oxidizing bacteria *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Arch Microbiol.* 77: 203-230.

WATSON S. W., BOCK E., VALOIS F. W., WATERBURY J. B. und SCHLOSSER U. (1986): *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol.* 144: 1-7.

WATSON S. W., BOCK E., HARMS H., KOOPS H. P., HOOPER A. B. (1989): Nitrifying bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 3: 1808-1834.

WEBER F. J. und DE BONT J. A. M. (1996): Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1286: 225-245.

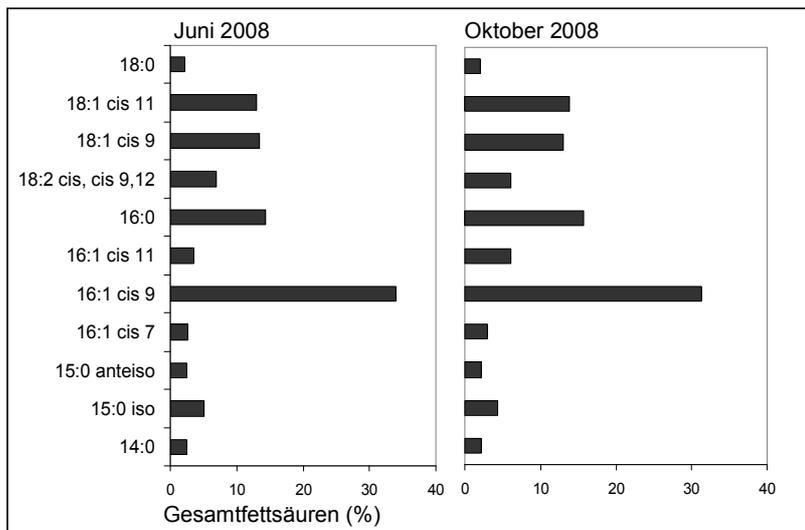
WEBSTER N.S., TAYLOR M.W., BEHNAM F., LÜCKER S., RATTEI T., WHALAN S., HORN M., WAGNER M. (2009): Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environ Microbiol.* 10.1111/j: 1462-2920.

- WEIDLER G. W., DORNMAYR-PFAFFENHUEMER M., GERBL F.W., HEINEN W., STAN-LOTTER H. (2007): Communities of Archaea and Bacteria in subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol.* 73: 259-270.
- WINOGRADSKY S. (1890): Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst Pasteur.* 4: 213-331.
- WINSLOW C. E. A., BROADHURST J., BUCHANAN R. E. JR., KRUMMWIEDE C., ROGERS L. A. & SMITH G. H. (1917): The families and genera of the bacteria. Preliminary report of committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol.* 2: 505-566.
- WOESE C. R., STACKEBRANDT E., WEISBURG W. G., PASTER B. J., MADIGAM M. T., FOWLER V. J., HAHN C. M., BLANZ P., GUPTA R., NEALSON K. H., & FOX G. E. (1984a): The phylogenetic 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 phylogenetic of the purple bacteria: the beta subdivision. *Syst Appl Microbiol.* 5: 327-336.
- WOESE C. R., WEISBURG W. G., HAHN C. M., PASTER B. J., ZABLEN L. B., LEWIS B. J., MACKE T. J., LUDWIG W. & STACKEBRANDT E. (1985): The phylogeny of the purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst Appl Microbiol.* 6: 25-33.
- ZAIKOVA E., WALSH D.A., STILWELL C.P., MOHN W.W., TORTELL P.D., und HALLAM S.J. (2010): Microbial community dynamics in a seasonally anoxic fjord: Saanich Inlet, British Columbia. *Environ Microbiol.* 12: 172-191.

## 7. Anhang

### 7.1 Markierungen Belebtschlamm

Die Proben für die Experimente mit Belebtschlamm stammen aus Dradenau vom Klärwerksverbund Hamburg (Deutschland). Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Prozentanteile an Gesamtzellfettsäuren, aus der Lipidextraktion gleich nach Probenahme des Original Belebtschlammes.



**Abbildung 32:** PLFA-Analyse der Belebtschlamm-Proben aus dem Jahr 2008 direkt nach den Probenahme

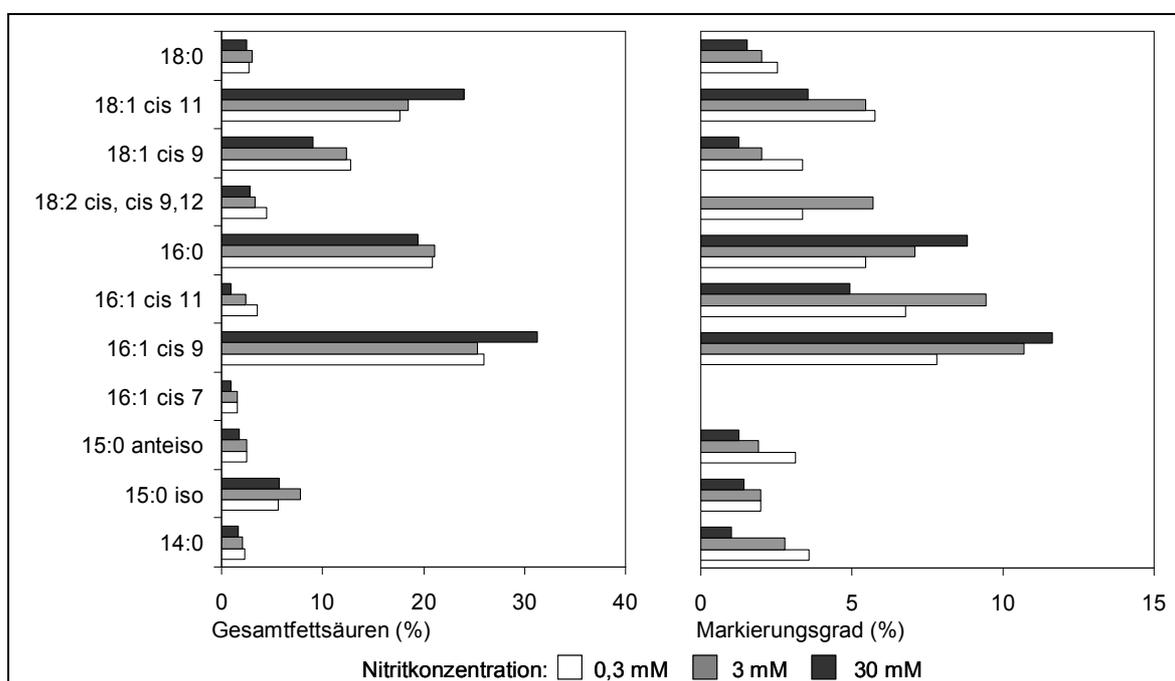


**Abbildung 33:** PLFA-Analyse der Belebtschlamm-Proben aus dem Jahr 2009 direkt nach den Probenahme.

In Abbildung 32 sind die Gesamtzellfettsäuren der Probenahmen vom Juni 2008 und Oktober 2008 dargestellt. Abbildung 33 zeigt die Gesamtzellfettsäuren der Probenahmen vom Januar 2009, Mai 2009 und August 2009.

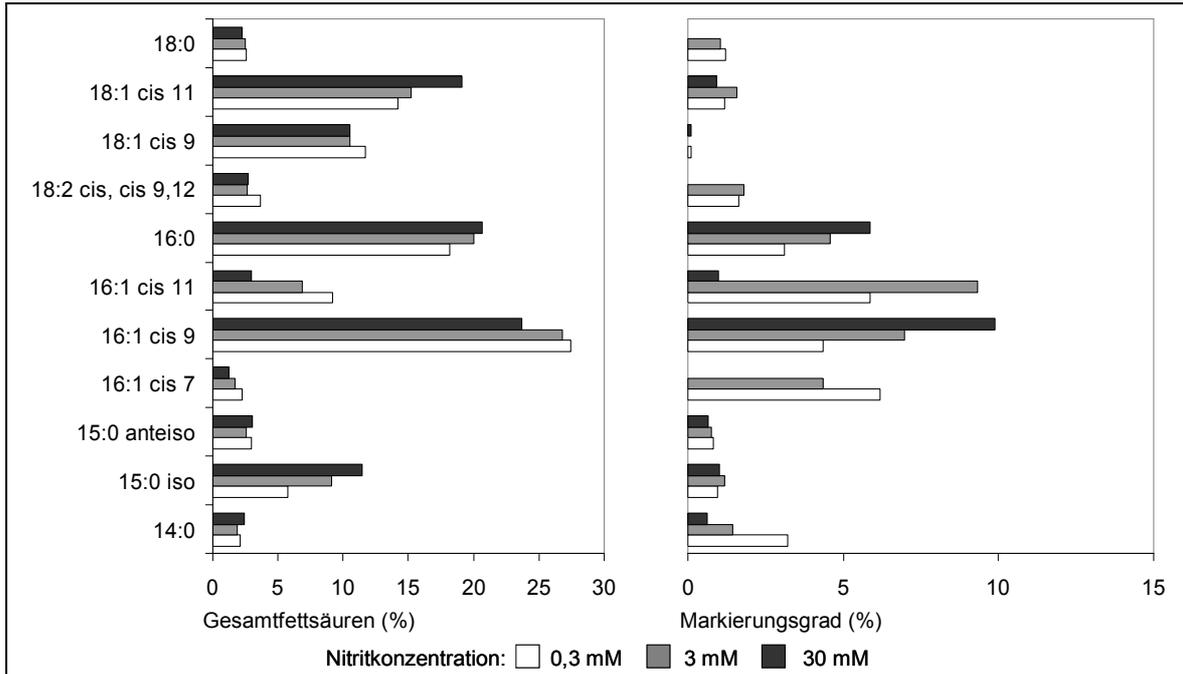
### 7.1.1 Markierung Juni 2008

Nachfolgende Abbildungen (Abb. 34 – 39) zeigen die Ergebnisse zu den Experimenten der FAME-SIP Analysen aus Belebtschlamm nach der Inkubation. Die Probe wurde im Juni 2008 aus dem Belebungsbecken entnommen. Die Inkubationstemperaturen lagen zwischen 4°C und 32°C, mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 30 mM. Jede Abbildung zeigt die identifizierten Fettsäuren einer Inkubationstemperatur mit den dazugehörigen Nitritkonzentrationen. Die Prozentanteile der Gesamtzellfettsäuren (linke Grafik) und die Prozentanteile der Markierungsgrade (rechte Grafik) sind in Balkendiagrammen durch verschiedene Graustufen dargestellt, welche die unterschiedlichen Nitritkonzentrationen bei der Inkubation ausdrücken.

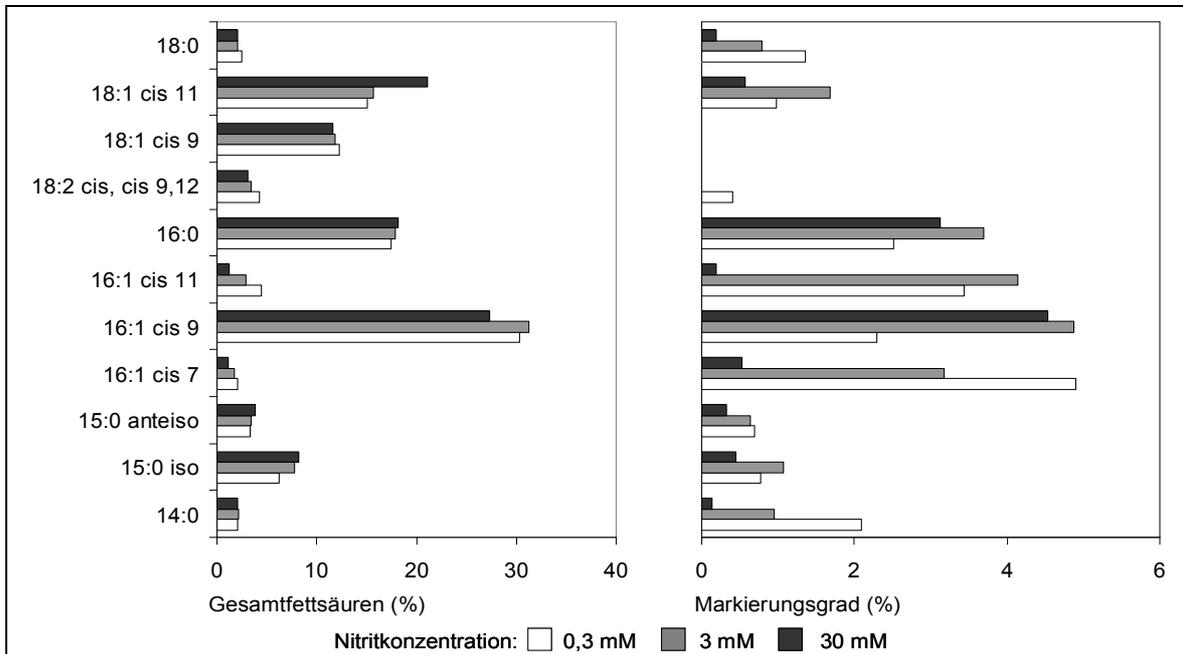


**Abbildung 34:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 32°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

## Anhang

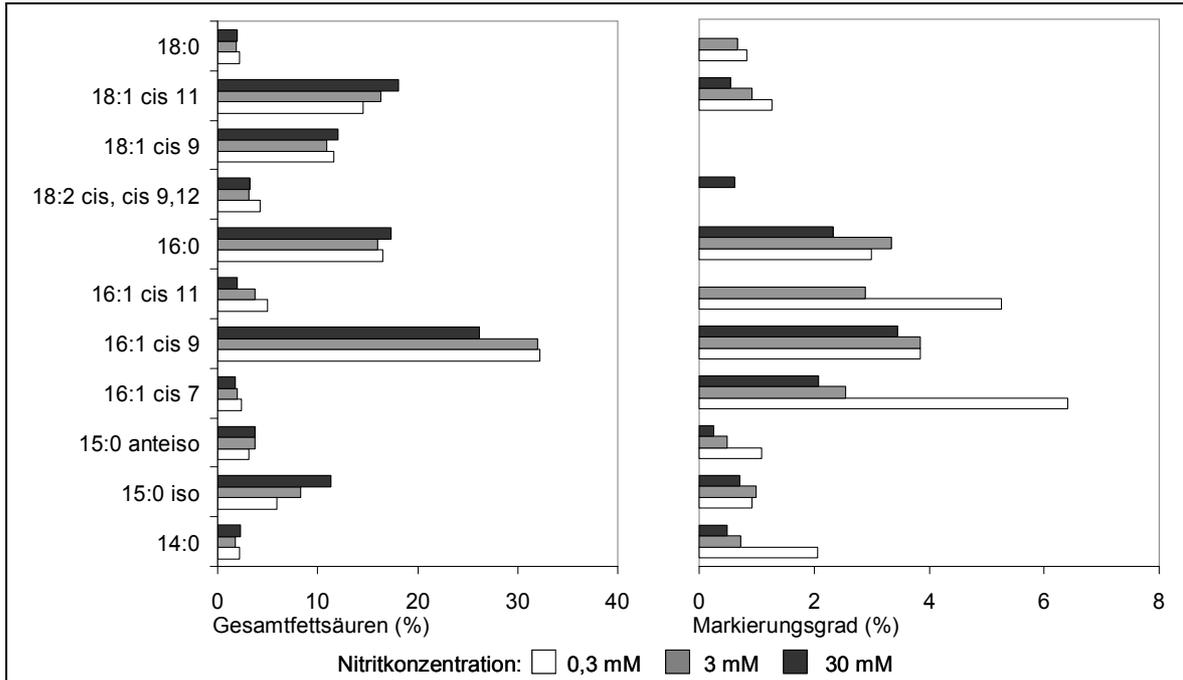


**Abbildung 35:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

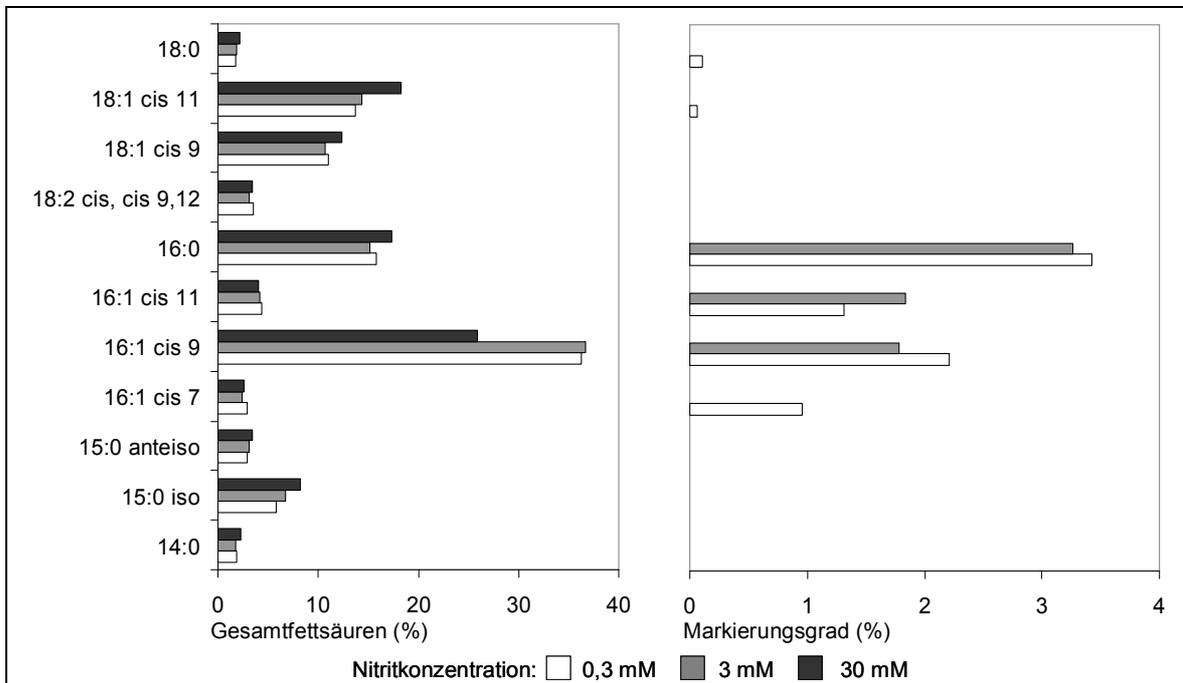


**Abbildung 36:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 22°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

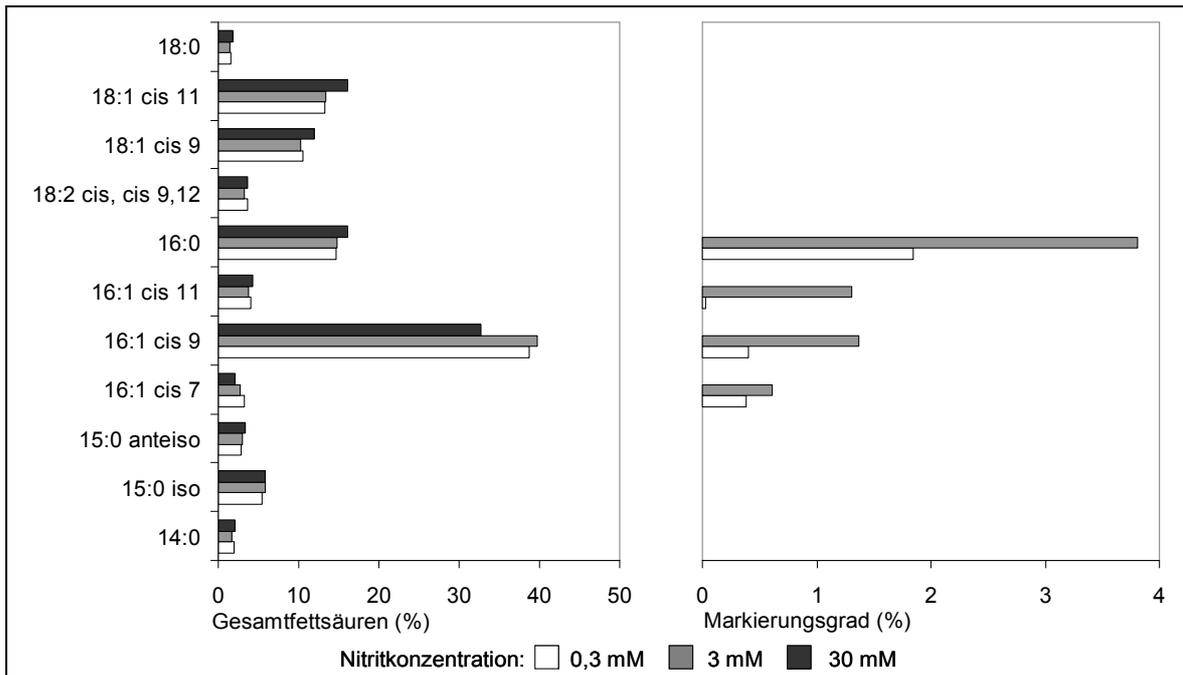
## Anhang



**Abbildung 37:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



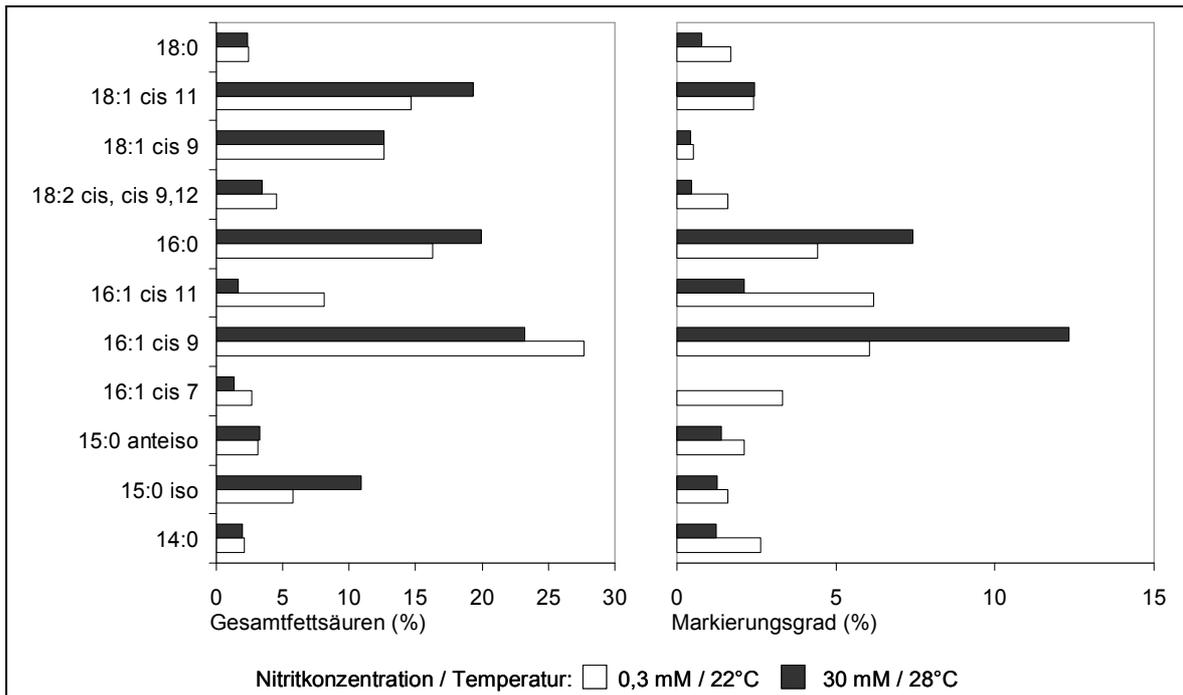
**Abbildung 38:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 39:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Juni 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 4°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

### 7.1.2 Markierung Oktober 2008

Nachfolgende Abbildung (Abb. 40) zeigt die Ergebnisse zu der Markierung aus Belebtschlamm vom Klärwerksverbund Hamburg (Deutschland). Die Originalprobe stammt vom Oktober 2008. Die Inkubationstemperaturen lagen bei 22 °C mit einer Nitritkonzentration von 0,3 mM (weiße Balken) und bei 28°C mit Nitritkonzentration von 30 mM (schwarze Balken). Die Darstellung der Abbildungen erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben. Aufgrund der geringen Datenmenge, sind die Inkubationen in einer Abbildung zusammengefasst, somit stehen die Farben (schwarz und weiß) der Balken zusätzlich für die Temperatur.

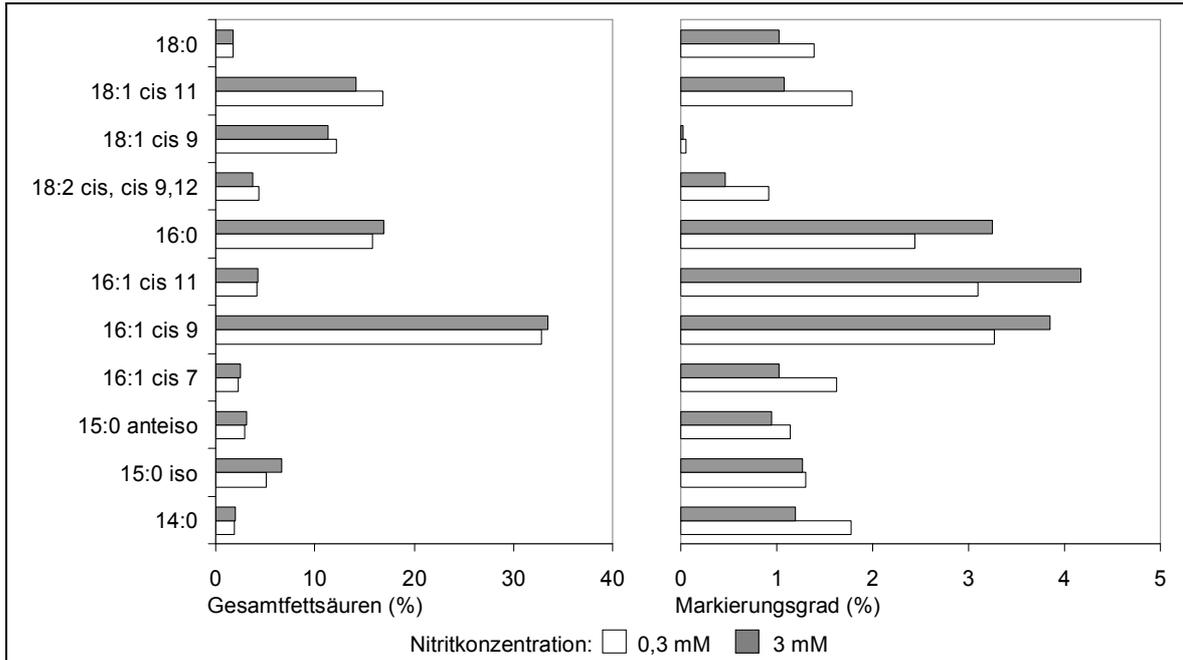


**Abbildung 40:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Oktober 2008 bei einer Inkubationstemperatur von 22°C mit 0,3 mM Nitrit und 28°C mit 30 mM Nitrit.

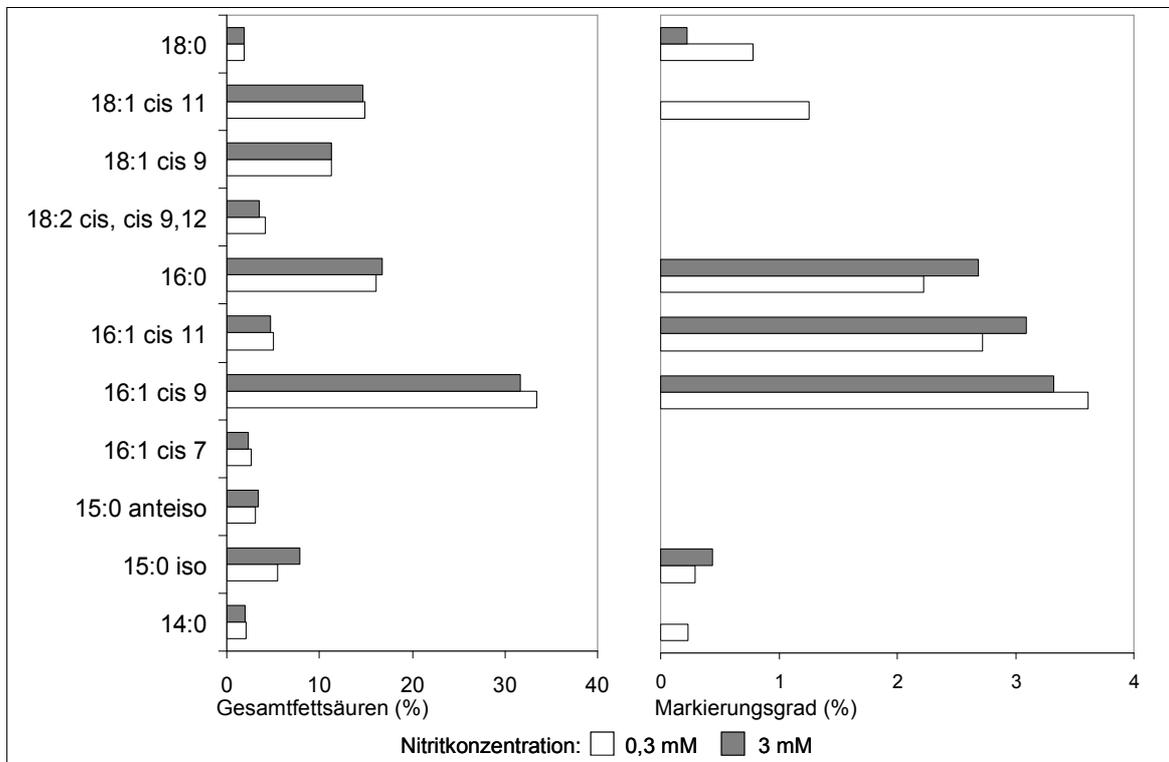
### 7.1.3 Markierung Januar 2009

Nachfolgende Abbildungen (Abb. 41 – 43) zeigen die Ergebnisse zu den Markierungsexperimenten aus Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage des Klärwerkverbundes Hamburg (Deutschland). Die Probe stammt vom Januar 2009. Die Inkubationstemperaturen lagen zwischen 10°C und 22°C, mit Konzentrationen an Nitrit von 0,3 mM (weiße Balken) und 3 mM (graue Balken). Die Darstellung der Abbildungen erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben.

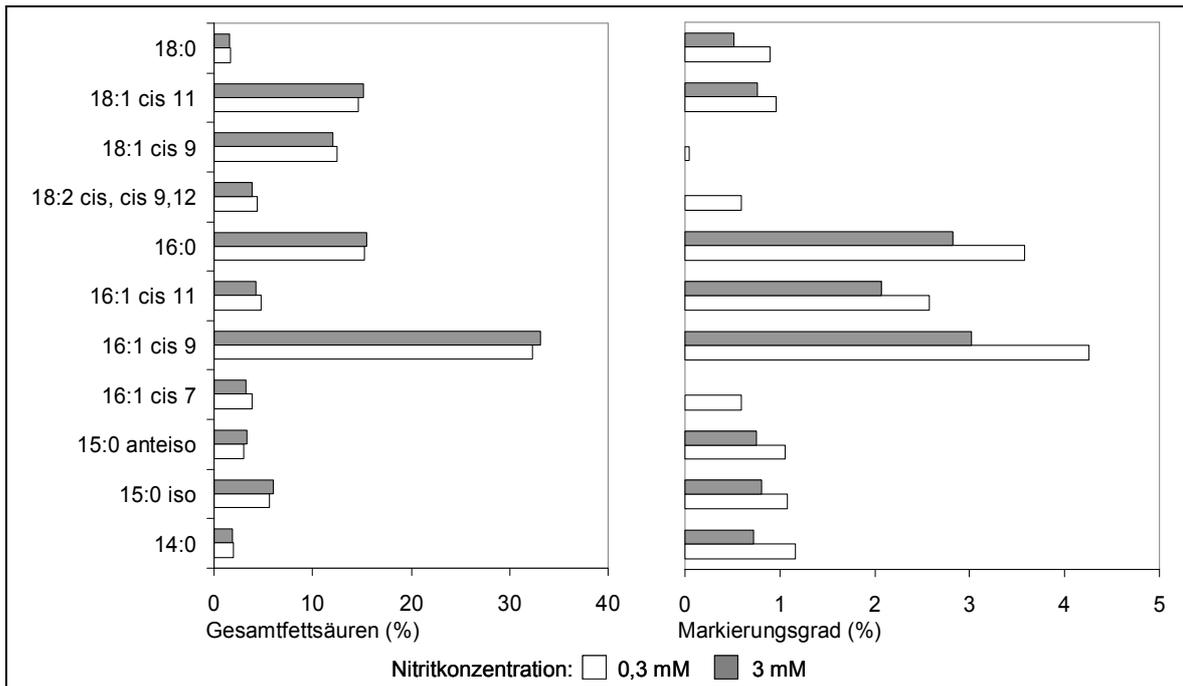
## Anhang



**Abbildung 41:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Januar 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 22°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 42:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Januar 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

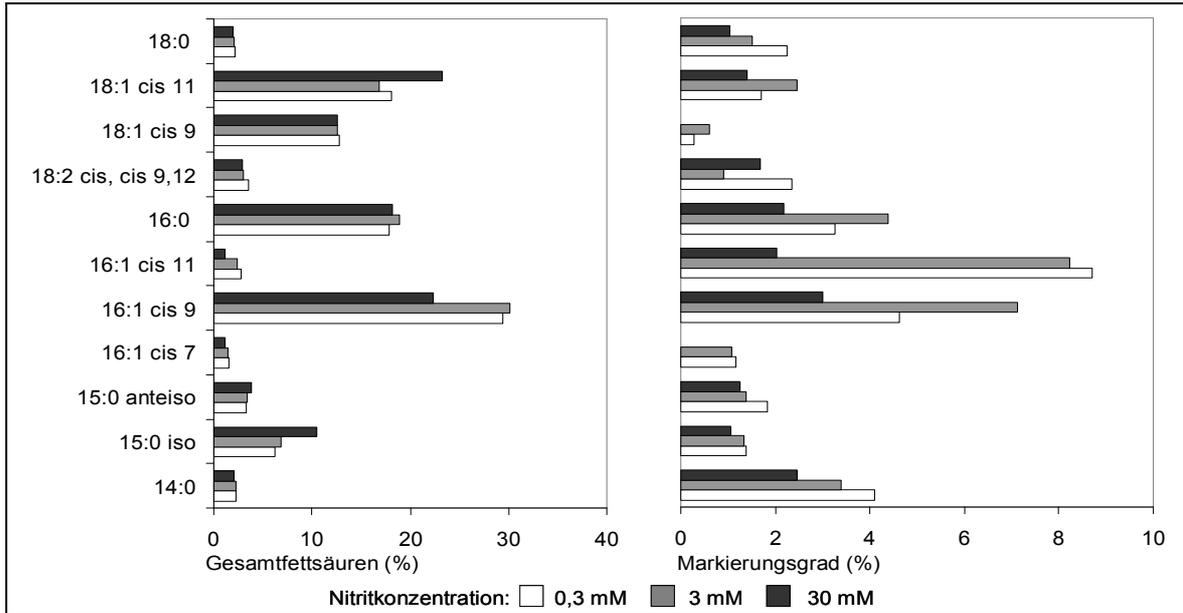


**Abbildung 43:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Januar 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

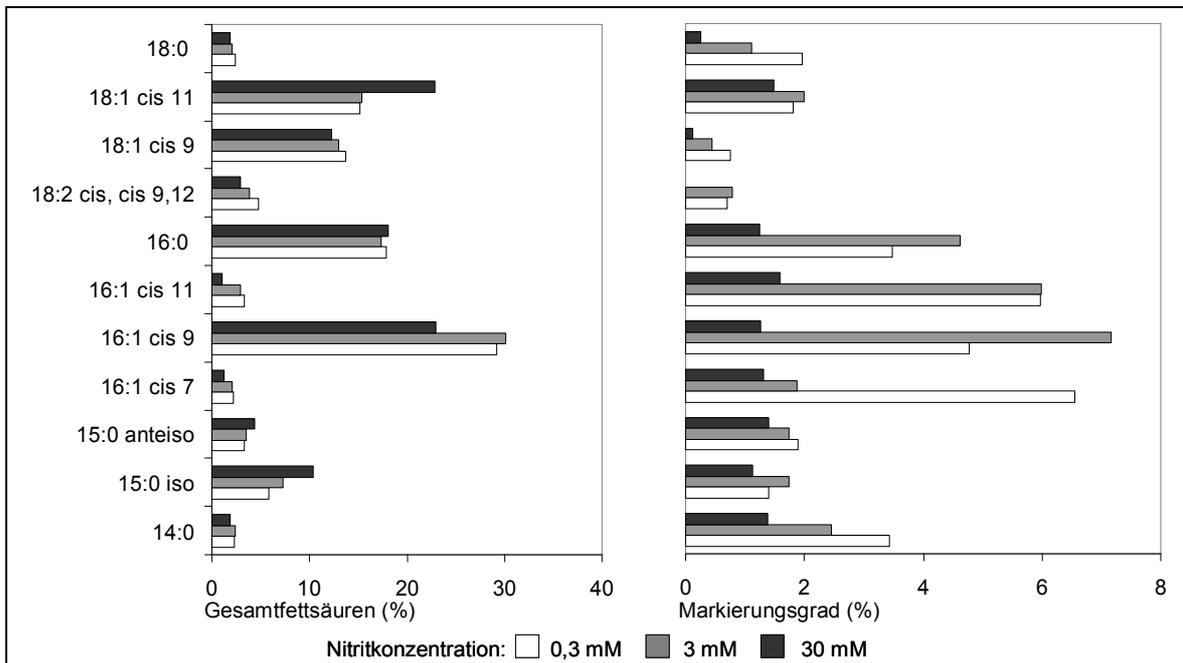
#### 7.1.4 Markierung Mai 2009

Nachfolgende Abbildungen (Abb. 44 – 46) zeigen die Ergebnisse zu der FAME-SIP Analyse aus Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage in Hamburg (Deutschland). Die Probe stammt vom Mai 2009. Die Inkubationstemperaturen lagen zwischen 17°C und 28°C, mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 30 mM. Die Darstellung der Abbildungen erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben.

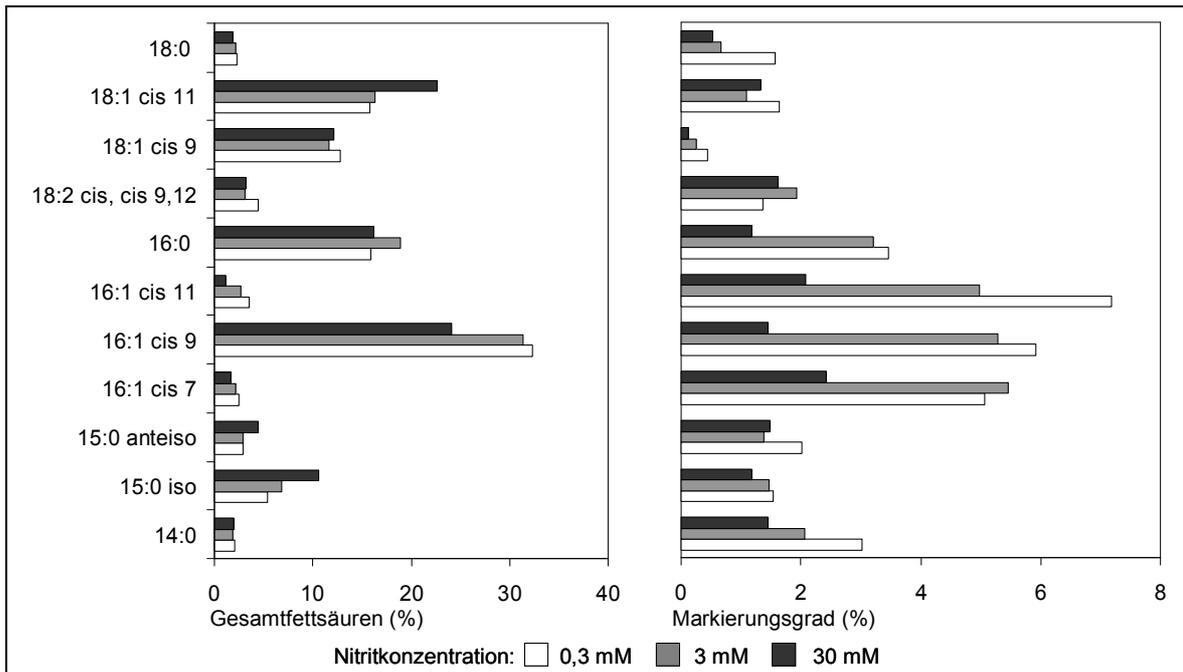
## Anhang



**Abbildung 44:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Mai 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 45:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Mai 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 22°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

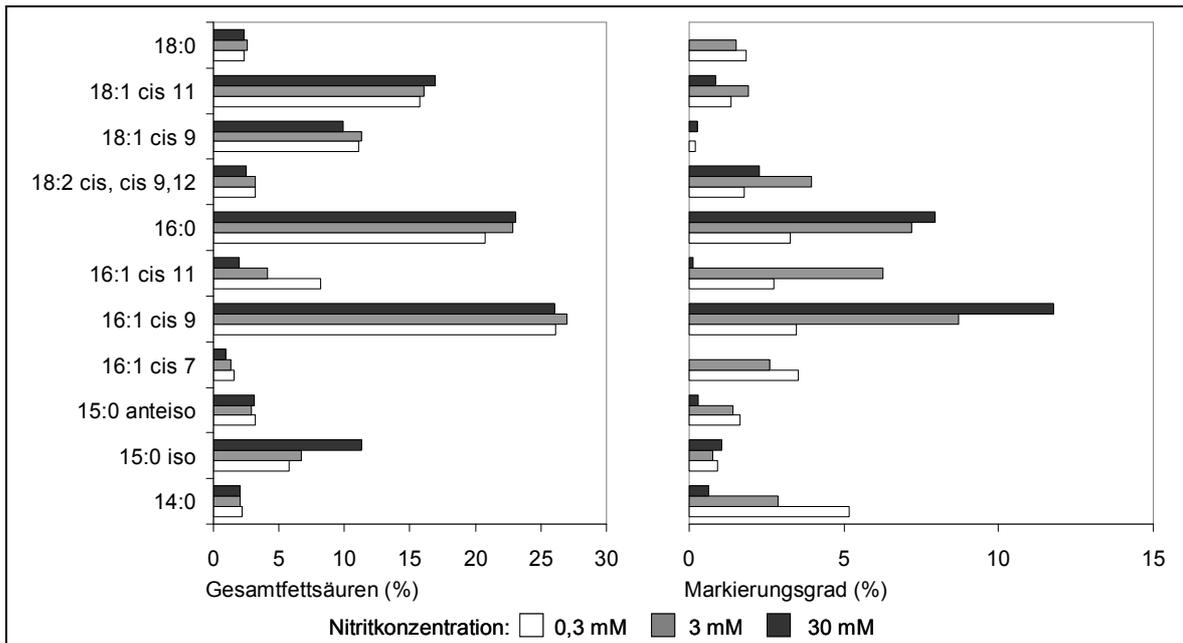


**Abbildung 46:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom Mai 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

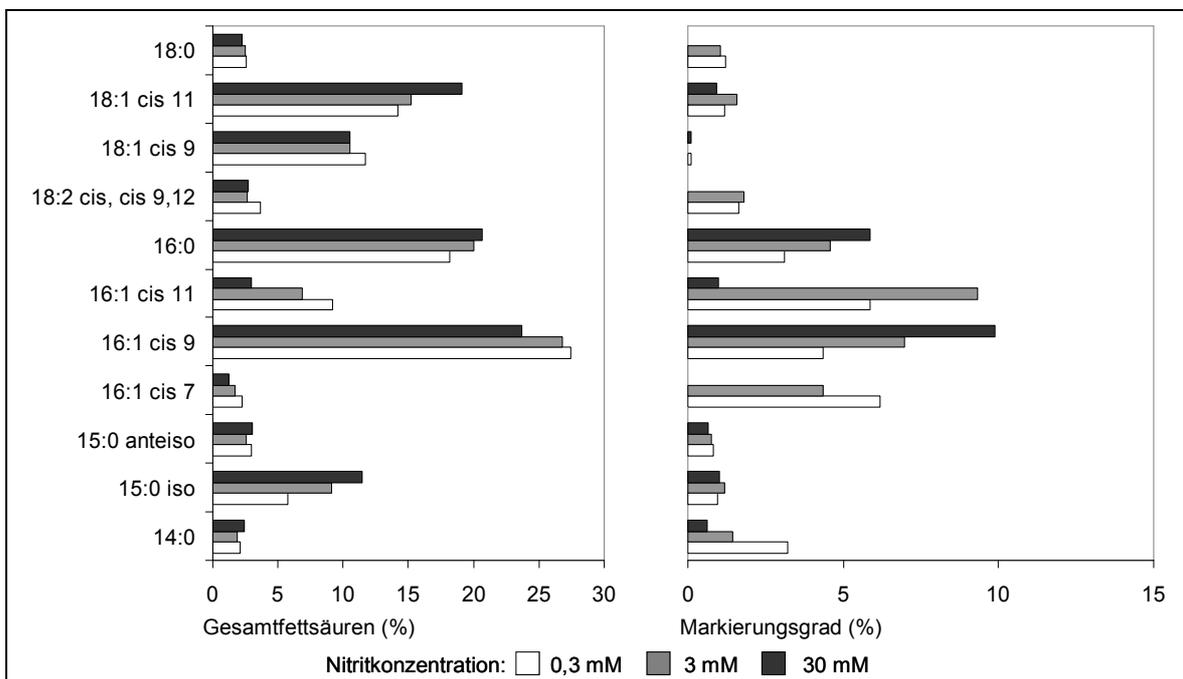
### 7.1.5 Markierung August 2009

Nachfolgende Abbildungen (Abb. 47 – 51) zeigen die Ergebnisse zu den Markierungsexperimenten aus Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage in Hamburg (Deutschland). Die Original-Probe stammt vom August 2009. Die Inkubationstemperaturen lagen zwischen 10°C und 32°C, mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 30 mM. Die Darstellung der Abbildungen erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben.

## Anhang

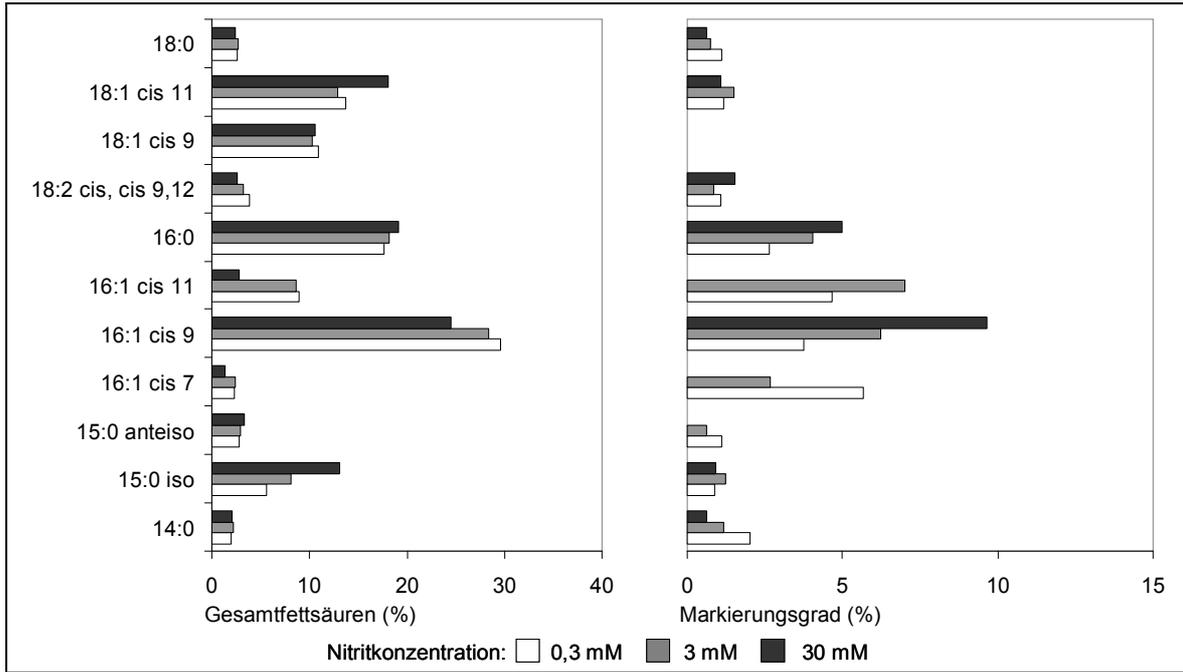


**Abbildung 47:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom August 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 32°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

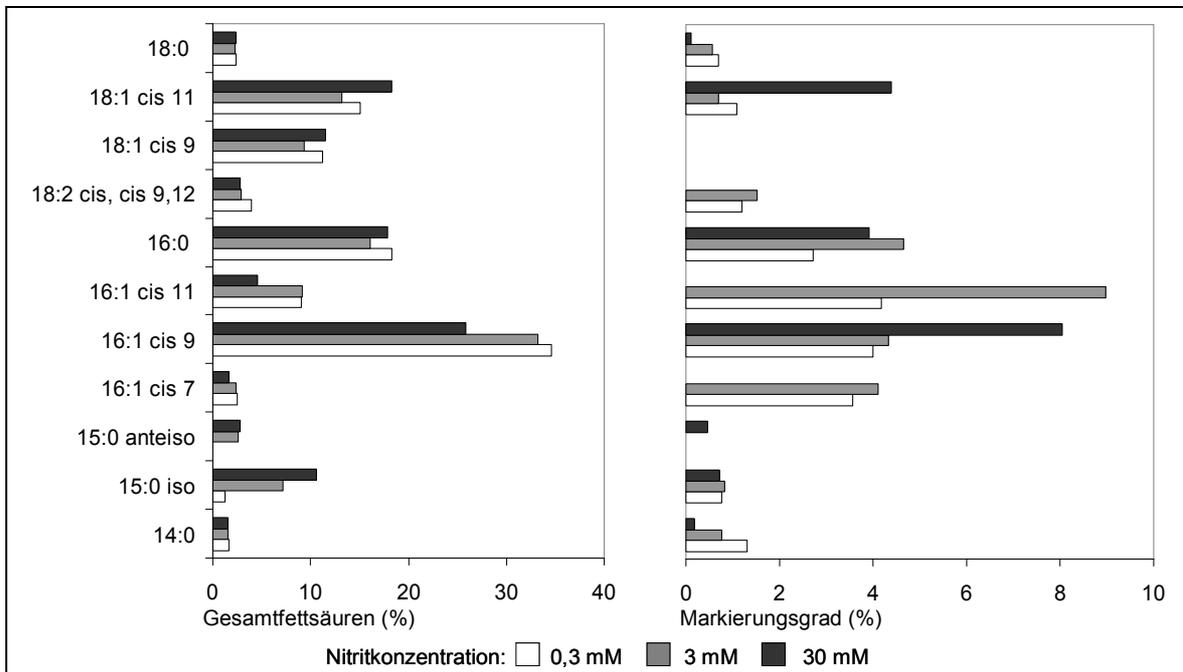


**Abbildung 48:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom August 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

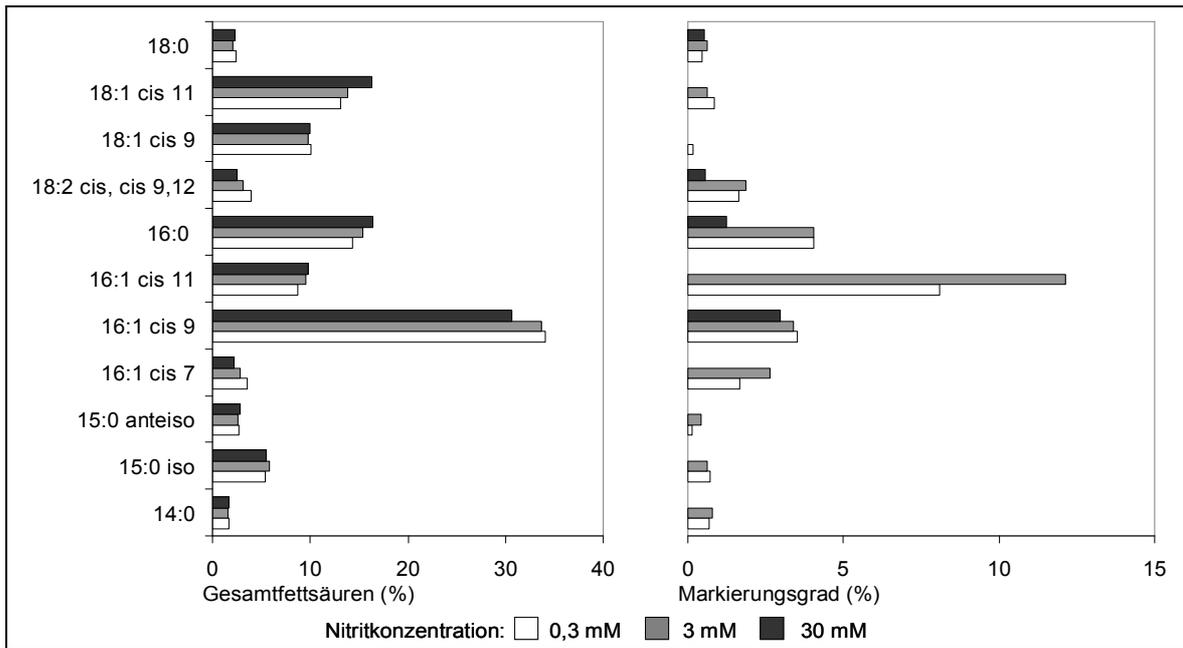
## Anhang



**Abbildung 49:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom August 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 22°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 50:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom August 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

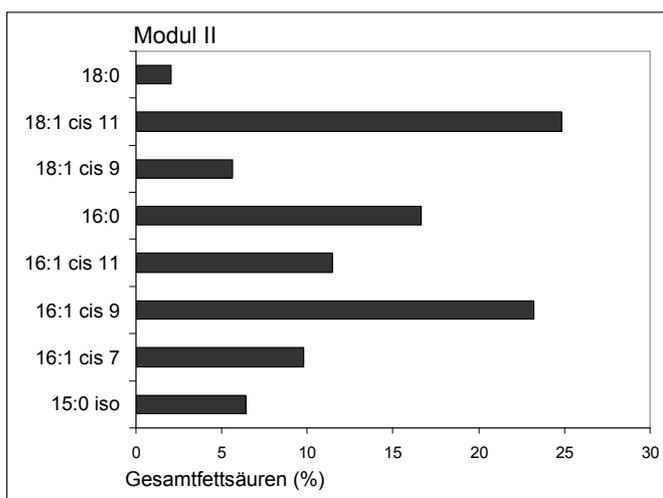


**Abbildung 51:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Belebtschlammprobe vom August 2009 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.

## 7.2 Markierungen Biofilter Fischfarm

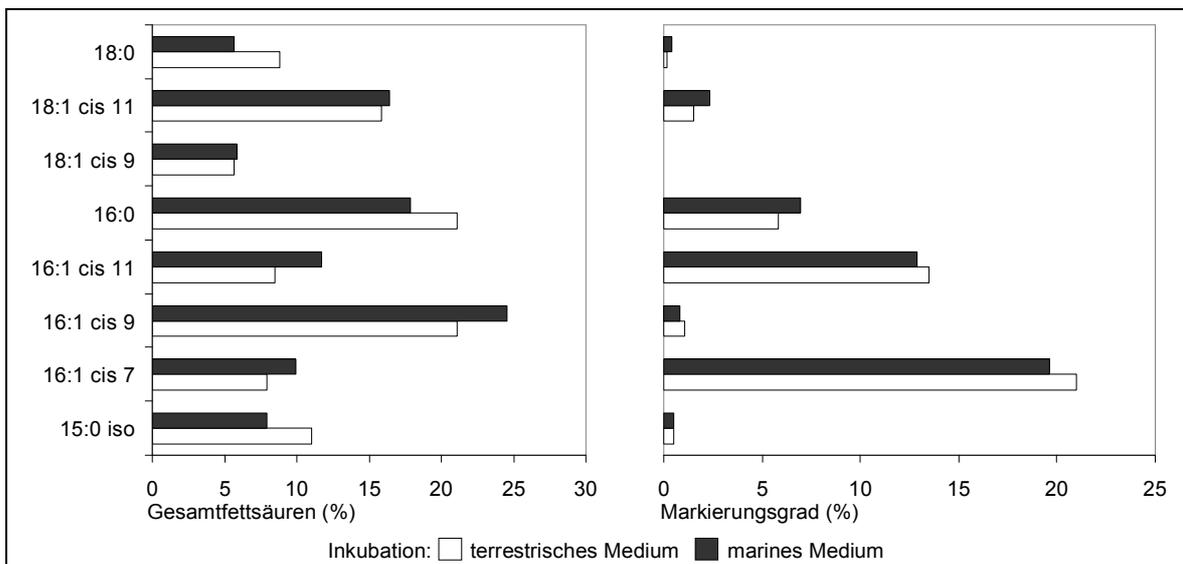
### 7.2.1 Markierung Biofiltersystem Modul II (Büsum)

Nachfolgende Abbildungen (52 und 53) zeigen die Ergebnisse zu der Markierung von Biofiltermaterial aus der marinen Fischfarm Büsum (Deutschland).



**Abbildung 52:** PLFA-Analyse des Biofiltermaterials vom Modul II (Büsum) direkt nach der Probenahme.

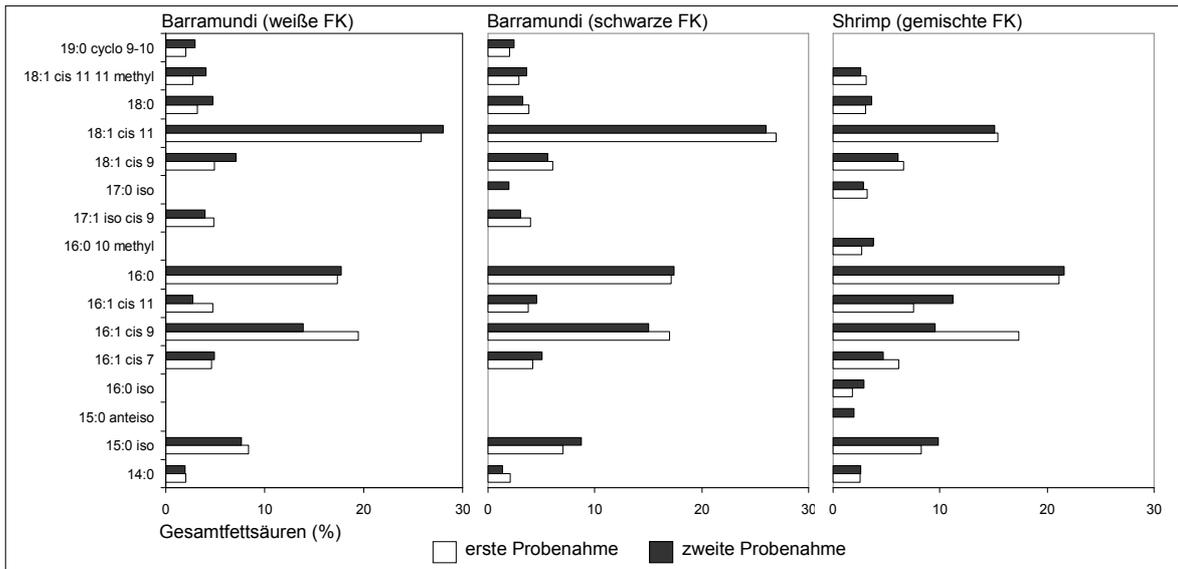
In Abbildung 52 sind die Prozentanteile der Gesamtzellfettsäuren aus der PLFA-Analyse direkt nach Probenahme dargestellt. Die Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse der Probe aus Büsum nach der Inkubation. Die Inkubationstemperatur lag bei 17°C, mit Nitritkonzentration von 3 mM. Die Darstellung der Abbildung erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben, wobei hier die unterschiedlichen Balken (schwarz und weiß) in den Diagrammen die unterschiedlichen Medien ausdrücken.



**Abbildung 53:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der schwarzen Füllkörper von Modul II in Büsum bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit 3 mM Nitrit.

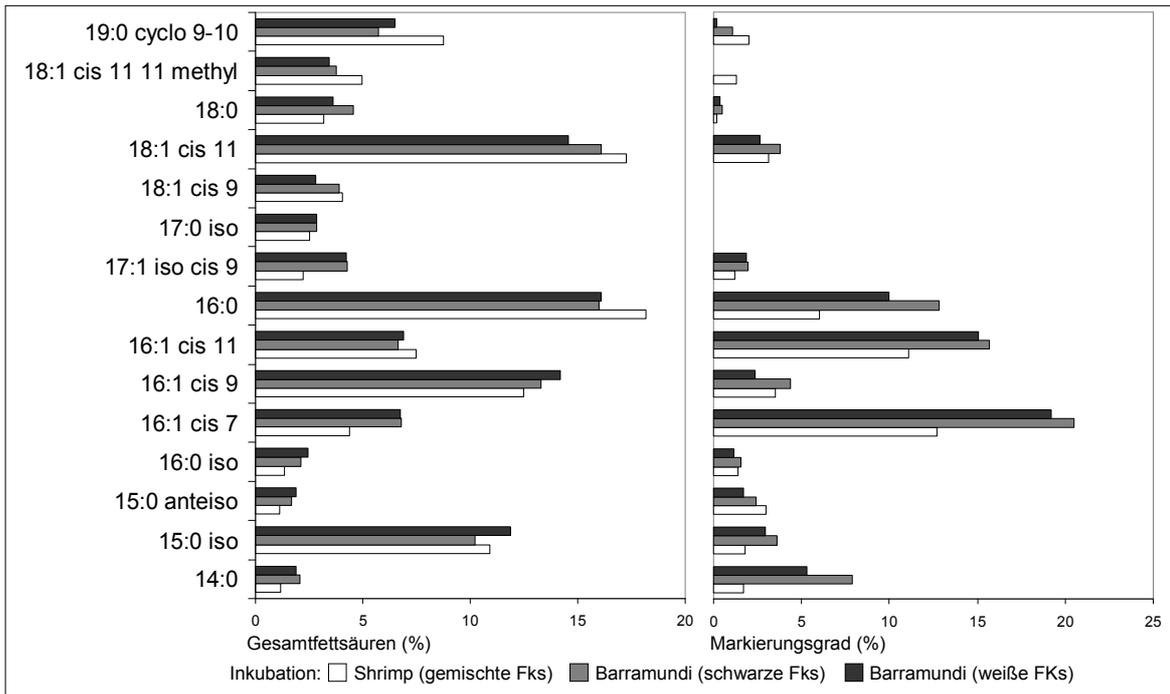
### 7.2.2 Markierung Biofiltersystem der marinen Fischfarm (Strande)

Nachfolgende Abbildungen (54 – 61) zeigen die Ergebnisse zu der Markierung des Biofiltermaterials aus dem Barramundi-Biofilter und Shrimp-Biofilter der marinen Fischfarm Strande (Deutschland). In Abbildung 54 sind die Prozentanteile der Gesamtzellfettsäuren aus den PLFA-Analysen direkt nach den Probennahmen dargestellt. Von links nach rechts werden die einzelnen Biofilter-Systeme wie folgt gezeigt, Barramundi (weiße FK), Barramundi (schwarze FK) und Shrimp (gemischte FK).

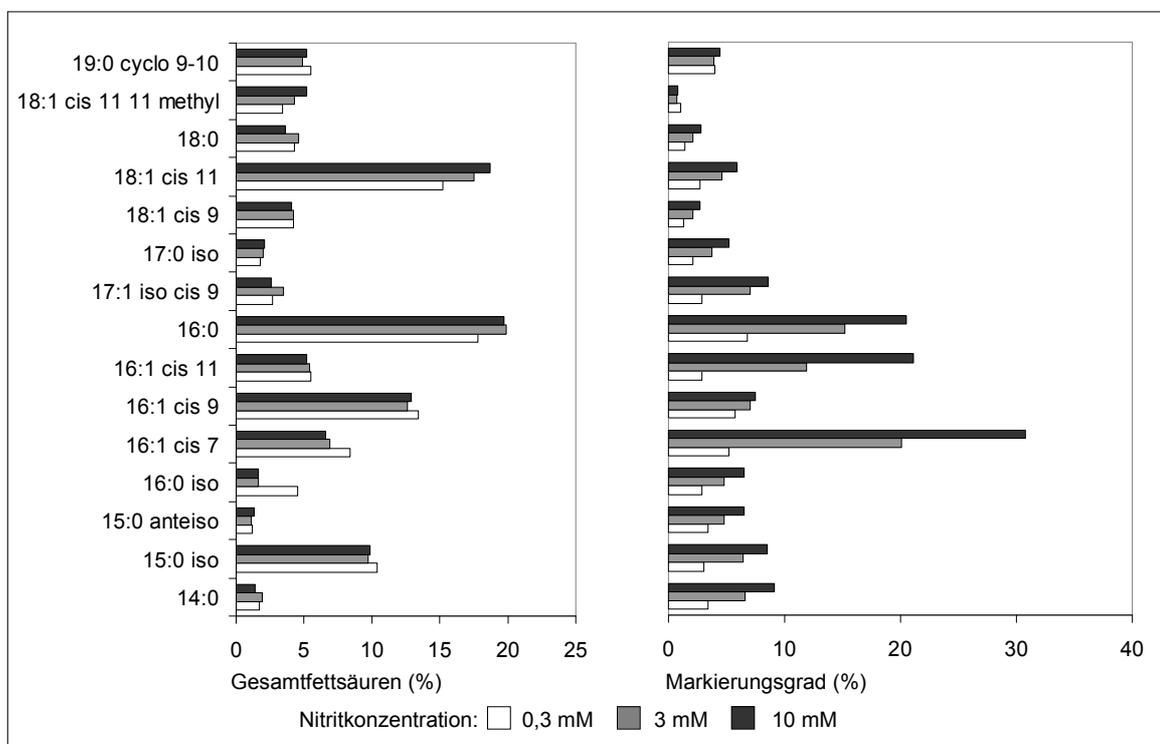


**Abbildung 54:** PLFA-Analysen des Biofiltermaterials aus Strande. Analysen direkt nach den Probenahmen aus den Biofiltern Barramundi (weiße FK), Barramundi (schwarze FK) und Shrimp (gemischte FK). Nach den ersten Probenahmen wurden die Biofilter bei 26°C mit 3 mM Nitrit inkubiert (Abb. 55), für die zweiten Probenahmen fanden die Inkubationen bei unterschiedlichen Temperaturen und Nitritkonzentrationen statt (Abb. 56 – 61).

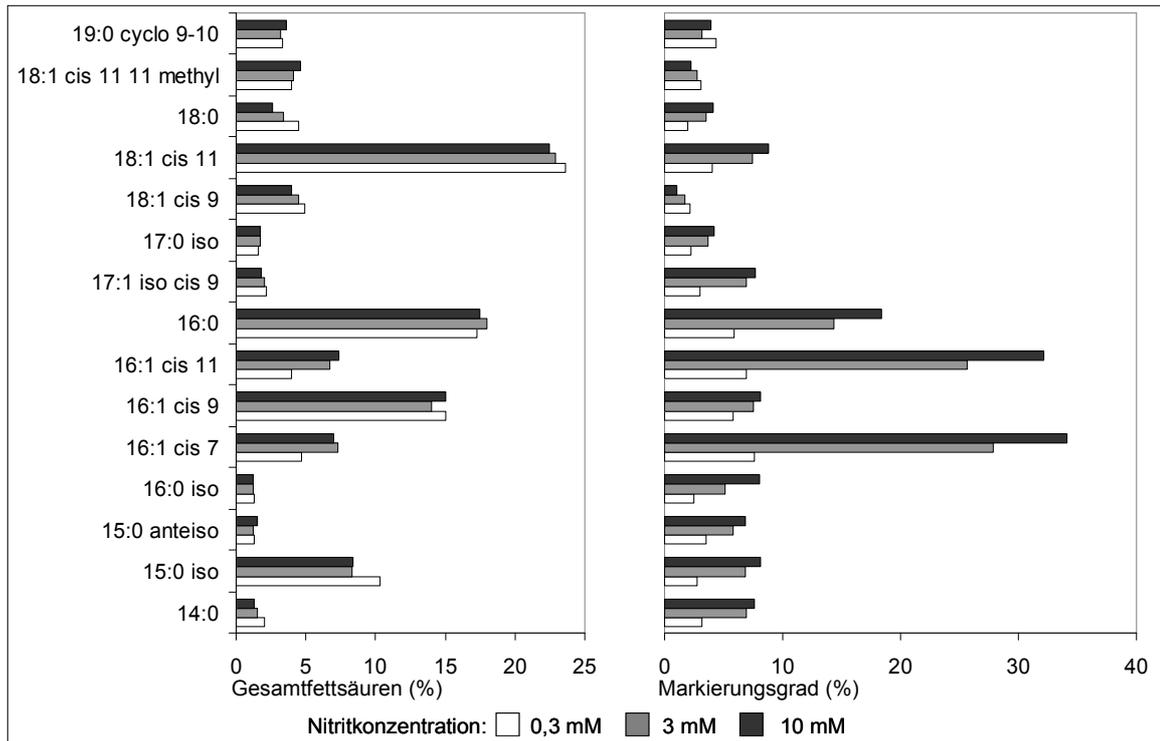
Für die Markierungen dieser Original-Biofilter wurden folgende Parameter angewendet. Die Inkubationstemperatur für den ersten Inkubationsansatz dieses Systems lag bei 26°C, mit einer Nitritkonzentration von 3 mM und erfolgte nach der ersten Probenahme (Abb. 55). Im zweiten Ansatz wurden für die zweite Probenahme Temperaturen von 17°C und 28°C mit Nitritkonzentrationen von 0,3 mM – 10 mM (Abb. 56 – 61) gewählt. Die Darstellung der Abbildungen erfolgt, wie schon unter 7.1.1 beschrieben. Wobei die dargestellten Balken in Abbildung 55 die drei Biofiltersysteme zeigen und nicht die Nitritkonzentration. Die Abbildungen 56 bis 61 sind nach Inkubationstemperatur und Biofiltersysteme aufgeteilt, die Farbgebung der Balken weist in den Diagrammen auf die Nitritkonzentration hin.



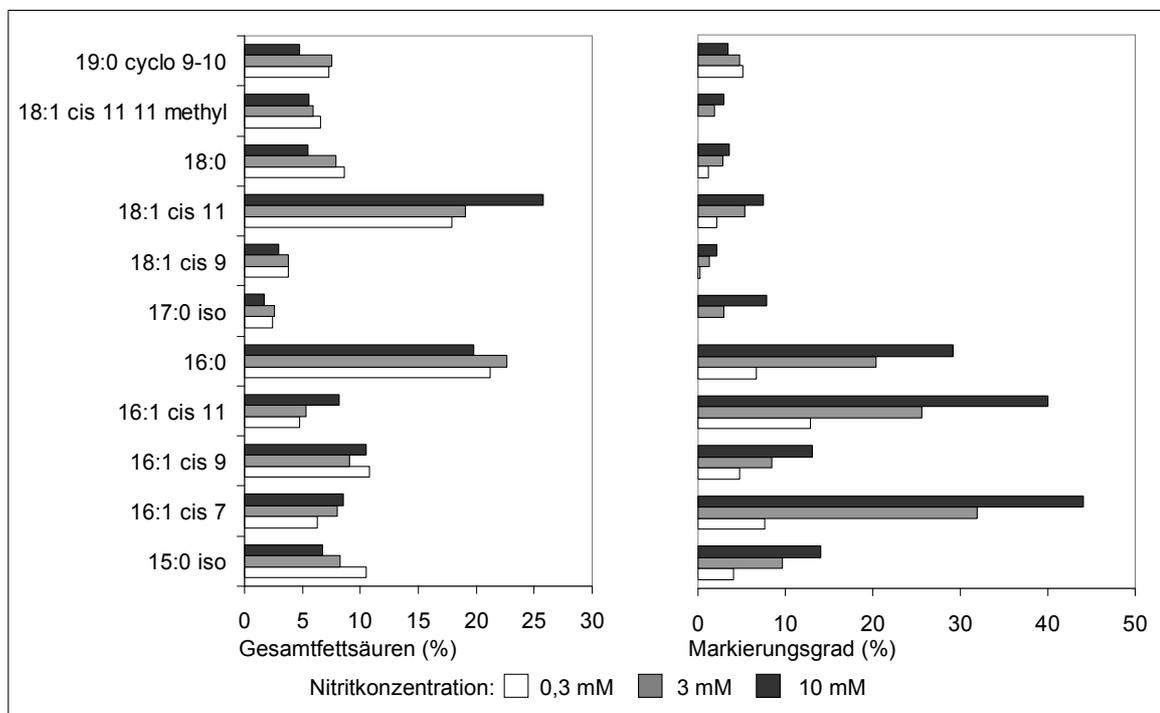
**Abbildung 55:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der Proben aus Strande mit gemischten Füllkörpern (FK) in den Shrimp-Proben, weiße Fk und schwarze Fk in den Barramundi-Proben, bei einer Inkubationstemperatur von 26°C, mit 3 mM Nitrit.



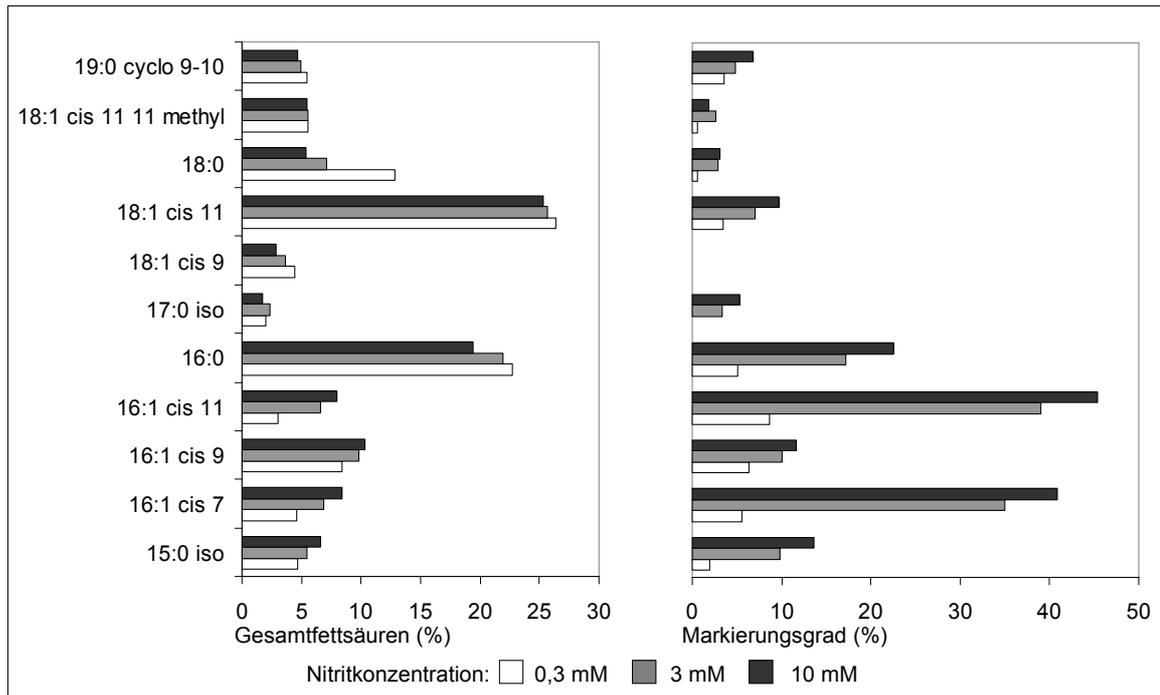
**Abbildung 56:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der schwarzen Füllkörper aus dem Barramundi-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



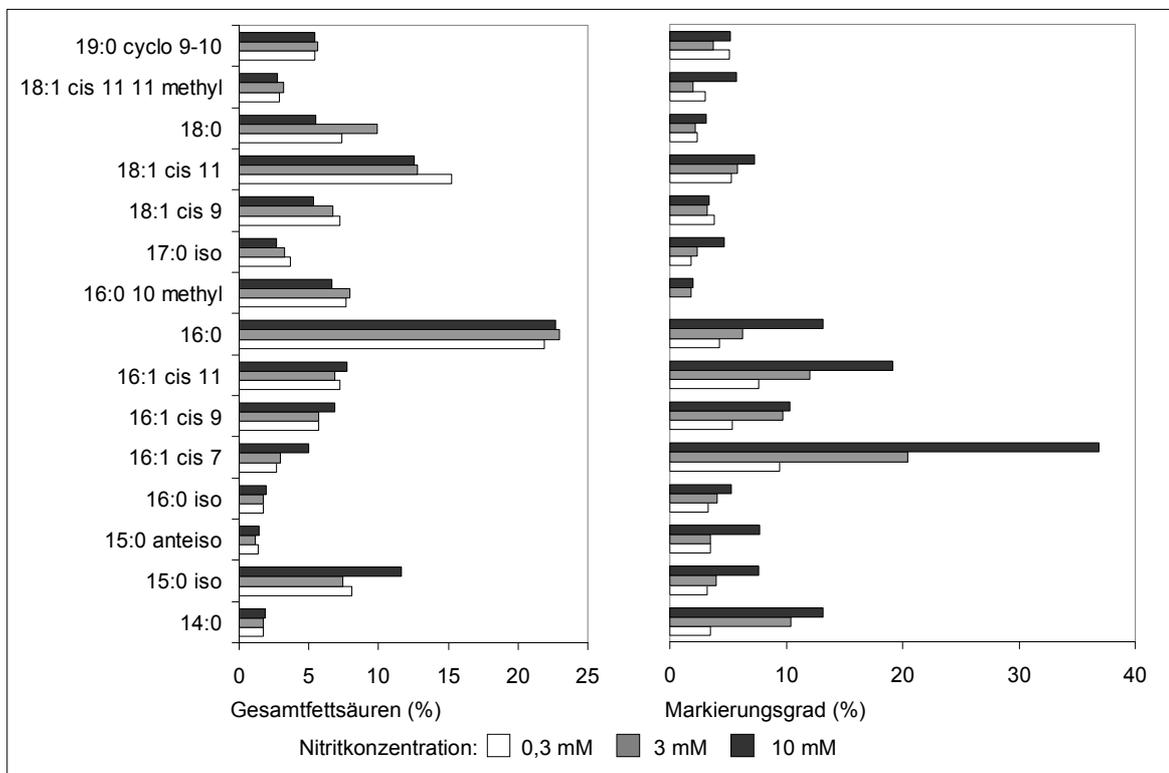
**Abbildung 57:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der schwarzen Füllkörper aus dem Barramundi-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



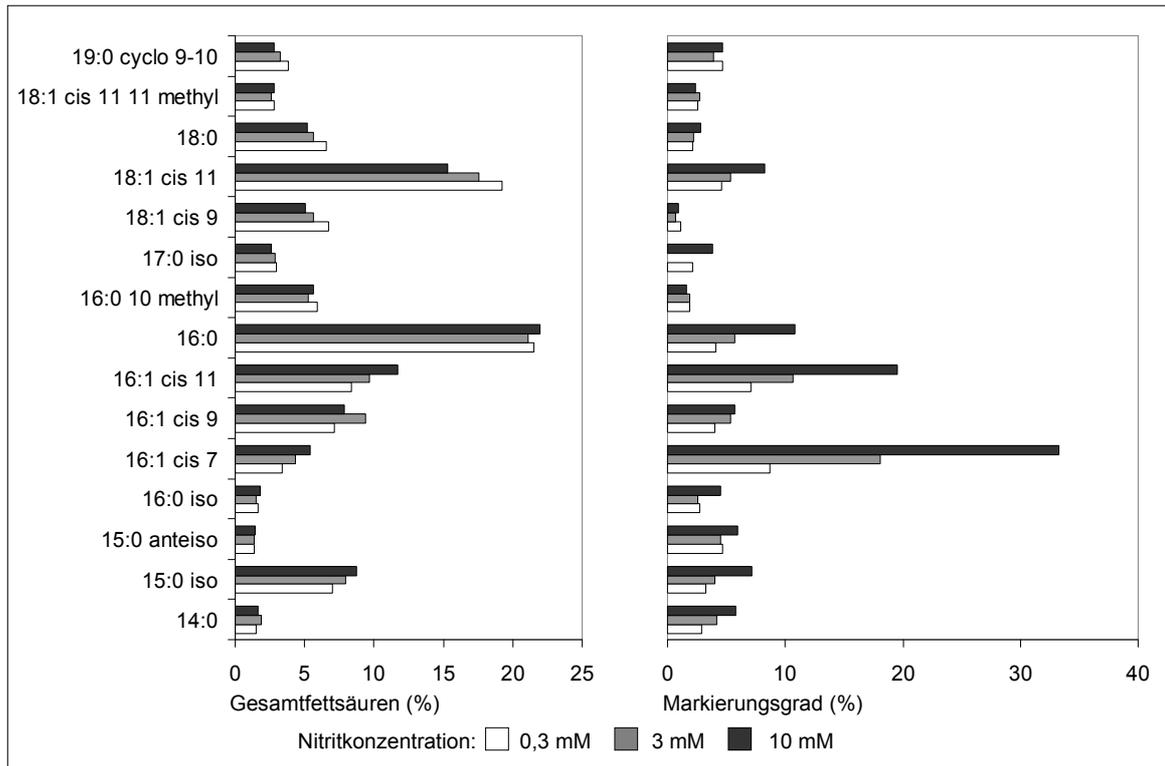
**Abbildung 58:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der weißen Füllkörper aus dem Barramundi-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 59:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der weißen Füllkörper aus dem Barramundi-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 60:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der gemischten Füllkörper aus dem Shrimp-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 28°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen.



**Abbildung 61:** Prozentanteil an Gesamtfettsäuren (linke Grafik) und Markierungsgrad in Prozent (rechte Grafik) der gemischten Füllkörper aus dem Shrimp-Biofilter bei einer Inkubationstemperatur von 17°C, mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen

### 7.3 Statistische Analysen zur Markierung von Fettsäuren

Nachfolgende Formel (Gl. 3) beschreibt die Berechnung der kritischen Werte einer Student-*t*-Verteilung ( $t_s$ ) (SOKAL und ROHLF, 1981):

$$t_s = \frac{M_1 - \overline{M}_2 - (\mu_1 - \mu_2)}{s_2 \times \sqrt{\frac{n_2 + 1}{n_2}}} \quad \text{Gl. 3}$$

wobei:

$M_1$  = berechneter Markierungsgrad einer markierten Fettsäure

$\overline{M}_2$  = Mittelwert der natürlichen Abundanzen einer Messreihe

$(\mu_1 - \mu_2)$  = für diesen Grenzwert gilt die Nullhypothese

$s_2$  = Standardabweichung der Messreihe

$n_2$  = Anzahl der Messreihen

Mit Hilfe dieses kritischen Wertes, kann in Abhängigkeit der Freiheitsgrade die Wahrscheinlichkeit  $p$  angegeben werden, mit der eine Fettsäure tatsächlich markiert ist. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) besteht im vorliegenden Fall in der Annahme, dass es sich bei der natürlichen Abundanz einer analysierten Fettsäure um eine unmarkierte Fettsäure handelt somit ist  $H_0: (\mu_1 - \mu_2) = 0$ .

Um den Schwellenwert berechnen zu können, für den Zeitpunkt an dem eine Fettsäure mit  $p < 0,1$ , also mit einer 90 %igen Wahrscheinlichkeit markiert wurde, wurde die Formel nach  $M_1$  (Gl. 4) umgestellt. Für  $\mu$  gilt weiter die Nullhypothese, dieser kann somit entfallen.

$$M_1 = t_s \times s_2 \times \sqrt{\frac{n_2 + 1}{n_2}} + \overline{M}_2 \quad \text{Gl. 4}$$

#### 7.4 Statistische Analysen zur Signifikanz von Gesamzellfettsäuren

Nachfolgende Formel (Gl. 5) beschreibt die Berechnung der kritischen Werte einer Student- $t$ -Verteilung ( $t_s$ ) (SOKAL und ROHLF, 1981):

$$t_s = \frac{\overline{P}_1 - \overline{P}_2 - (\mu_1 - \mu_2)}{s_2 \times \sqrt{\frac{n_2 + 1}{n_2}}} \quad \text{Gl. 5}$$

wobei:

$\overline{P}_1$  = Mittelwert der Prozentanteile Messreihe  $^{13}\text{C}$

$\overline{P}_2$  = Mittelwert der Prozentanteile Messreihe  $^{12}\text{C}$

$(\mu_1 - \mu_2)$  = für diesen Grenzwert gilt die Nullhypothese

$s_2$  = Standardabweichung der Messreihe

$n_2$  = Anzahl der Messreihen

### Danksagung

Bei meinem Betreuer Prof. Dr. André Lipski möchte ich mich für Möglichkeit bedanken an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Vor allem möchte ich Dir für die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Evert P. Bakker möchte ich für die Möglichkeit danken an Tagungen teilnehmen zu können und für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgruppe der mikrobiellen Ökologie der Universität Osnabrück danke ich für den schönen Start in Osnabrück. Insbesondere bei Friederike, Juliane und Quynh, denkt immer daran „Kellerkinder halten zusammen“.

Der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg von PD Dr. Eva Spieck möchte ich für die Kooperation danken. Besonders bei Sabine und Sabine für die schöne Zeit in Hamburg.

Der Abteilung Ökologie der Universität Osnabrück und den Freunden der Ökologie möchte ich für die besondere Zeit danken, die ich mit Euch verbringen durfte. Vor allem bei Antje, Melanie und Till, ich habe mich so Willkommen gefühlt und sehr gern mit Euch „Bäume umarmt“.

Ich möchte mich bei der Abteilung Lebensmittelmikrobiologie der Universität Bonn bedanken, besonders bei Rommy für Ihre Unterstützung.

Bei Dr. Simone Diestel (Abteilung Biochemie, ITW, Universität Bonn) möchte ich mich für die Möglichkeit der Nutzung des Fluoreszenz-Mikroskops bedanken.

Vorliegende Arbeit wurde von der ZKFG der Universität Osnabrück gefördert, an dieser Stelle möchte ich mich für diese Förderung bedanken.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die vielen Aufmunterungen, die unerschöpfliche Geduld und das Ertragen meiner Launen bedanken.

Meiner Schwester möchte ich für die liebevolle Unterstützung danken.

Der letzte und zugleich wichtigste Dank gilt meinen Eltern, ihr habt immer an mich geglaubt und mir das Gefühl gegeben, dass ich alles schaffen kann. Danke für Eure bedingungslose Liebe.

**Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung und etwaige frühere Promotionsverfahren**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren nicht an der inhaltlichen und materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, oder eine Arbeit als Dissertation vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Myriam Kruse  
Geboren am: 20. April 1976  
Geboren in: Bremen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Werdegang:

1982 – 1987                    Grundschule Etelsen

1987 – 1989                    Orientierungsstufe Langwedel

1989 – 1991                    Hauptschule Langwedel  
Abschluss: qualifizierter Hauptschulabschluss

1991 – 1993                    BBS Verden: Berufsfachschule Wirtschaft  
Abschluss: erweiterter Sekundarabschluss I

1993 – 1996                    Ausbildung zur Zahnarzthelferin  
Abschluss: Berufsabschluss

1996 – 1999                    BBS Verden: Fachgymnasium Wirtschaft  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

1999 – 2004                    Carl von Ossietzky Universität Oldenburg:  
Diplomstudiengang: Marine Umweltwissenschaften  
Abschluss: Diplom Umweltwissenschaftlerin

2004 – 2006                    Angestellt in der freien Wirtschaft

seit Oktober 2006            Universität Osnabrück:  
Promotion in der Mikrobiologie

## Beiträge und Publikationen

### *Beiträge zu Fachtagungen*

KRUSE M., SPIECK E., LIPSKI A. and BAKKER E. P.: Characterization of nitrite oxidizing bacteria of the genus *Nitrospira* in complex ecosystems by means of fatty acid profiles in combination with 16S rRNA cloning. Posterpräsentation auf der VAAM Jahrestagung, Bochum, 08.-11.03.2009

KRUSE, M., SPIECK E., LIPSKI A. and BAKKER E. P.: Identification of nitrite oxidizing bacteria of the genus *Nitrospira* by <sup>13</sup>C labeling of fatty acid profiles in complex ecosystems. Posterpräsentation auf der 1<sup>st</sup> International Conference on Nitrification, Louisville, Kentucky, 05.-10.07.2009

KEUTER, S., KRUSE M., LIPSKI A. and SPIECK E.: Exploring nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system by characterization of a new *Nitrospira*. Posterpräsentation auf der 13<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, USA, 22.-27.08.2010

KRUSE, M., BAKKER E. P., SPIECK E. and LIPSKI A.: Characterization of a new *Nitrospira* in competition to known nitrite oxidizing taxa of activated sludge samples from waste water treatment plant. Posterpräsentation auf der VAAM Jahrestagung, Karlsruhe 03.-06.04.2011

### *Publikationen*

LEBEDEVA, E. V., OFF S., ZUMBRÄGEL S., KRUSE M., SHAGZHINA A., LÜCKER S., MAIXNER F., LIPSKI A., DAIMS H. & SPIECK E. (2011): Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. FEMS Microbiol Ecol. 75: 195-204.

KEUTER S., KRUSE M., LIPSKI A. & SPIECK E. (2011): Relevance of *Nitrospira* for nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system and physiological features of a *N. marina*-like isolate. Environ Microbiol. eingereicht.