

WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE BERICHTE

FZR-377

April 2003

ISSN 1437-322X



Archiv-Ex.:

Andrea Geißler

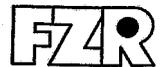
**Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität
in Uranabraumhalden**

Herausgeber:
Forschungszentrum Rossendorf e.V.
Postfach 51 01 19
D-01314 Dresden
Telefon +49 351 26 00
Telefax +49 351 2 69 04 61
<http://www.fz-rossendorf.de/>

Als Manuskript gedruckt
Alle Rechte beim Herausgeber

FORSCHUNGSZENTRUM ROSSENDORF

WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE BERICHTE



FZR-377

April 2003

Andrea Geißler

**Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität
in Uranabraumhalden**

Diplomarbeit

Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität in Uranabraumhalden

Von der Fakultät für Geowissenschaften, Geotechnik und Bergbau
der Technischen Universität Bergakademie Freiberg
angenommene

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Geoökologin

vorgelegt von

Andrea Geißler

geboren am 10.10.1978 in Freital

Gutachter: Prof. Dr. Michael Schlömann

Dr. Sonja Selenska-Pobell

Tag der Verteidigung: 24. Januar 2003

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche ordentlich kenntlich gemacht.

Dresden, den 11.12.2002

Andrea Geißler

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. M. Schlömann für die Betreuung meiner Diplomarbeit danken.

Mein herzlicher Dank gilt der Leiterin der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie des Forschungszentrums Rossendorf, Frau Dr. S. Selenska-Pobell, für ihre persönliches Engagement und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung.

Des weiteren möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Frau K. Flemming.

Außerdem möchte ich noch dem Forschungszentrum Rossendorf und vor allem dem Institut für Radiochemie danken, dass sie diese Arbeit möglich gemacht haben.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Schwester.

Zusammenfassung

Die Böden, Sedimente und Drainagewässer von Uranabfallhalden und Uran „mill tailings“ sind mit Metallen und Radionukliden kontaminiert. Bakterielle Aktivitäten können die Mobilität und Migration von toxischen Metallen und Radionukliden beeinflussen und so zur Bioremediation beitragen. Um die biogeochemischen Prozesse, die in diesen Umgebungen auftreten zu verstehen, ist es notwendig die bakterielle Diversität und Aktivität zu untersuchen.

Eine kultur-unabhängige Methode wurde verwendet, um die bakterielle Diversität in drei urankontaminierten Gebieten zu untersuchen. Die drei untersuchten Bodenproben wurden in der Haberlandhalde in der Nähe von Johanngeorgenstadt (Deutschland), dem Uran „mill tailings“ in Gunnison, Colorado (USA) und dem Uran „mill tailings“ in Shiprock, New Mexiko (USA) aus unterschiedlichen Tiefen entnommen. Die 16S rDNA-Fragmente wurden von der mittels direkter Lyse isolierten Gesamt-DNA unter Verwendung der universellen Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} amplifiziert und kloniert. Mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) wurde eine Typisierung der Klone vorgenommen und jeweils ein Vertreter aller RFLP-Typen, die mehr als einmal in der Klonbibliothek vorkamen, wurde sequenziert und analysiert.

Trotz der Kontamination wurde eine beachtliche bakterielle Diversität nachgewiesen und es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der natürlichen bakteriellen Gemeinschaften in diesen drei Umgebungen. In der untersuchten Probe der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt waren vor allem α -Proteobakterien und Vertreter von *Holophaga/Acidobacterium* zahlenmäßig dominant. Die Verteilung der Bakterien in der Probe des Uran „mill tailings“ Gunnison war zu der in Johanngeorgenstadt ähnlich, jedoch wurden hier neben α -Proteobakterien und Vertretern von *Holophaga/Acidobacterium* vor allem γ -Proteobakterien nachgewiesen. Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft in der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock war signifikant verschieden. Nur wenige Vertreter von *Holophaga/Acidobacterium* und α -Proteobakterien wurden gefunden. Populationen von *Bacilli*, sowie γ -Proteobakterien und grüne schwefelfreie Bakterien waren in dieser Probe dominant.

Abstract

The soils, sediments and drainage waters of uranium mining waste piles and uranium mill tailings are contaminated with a high quantity of metals and radionuclides. Bacterial activities can influence the mobility and migration of toxic metals and radionuclides in these environments and contribute to the bioremediation. To understand the biogeochemical processes occurring in these environments it is important to investigate the bacterial diversity and activity.

A culture-independent molecular approach has been applied to investigate the bacterial diversity in three uranium contaminated sites. The three analysed soil samples has been collected from the uranium waste pile Haberland near Johanngeorgenstadt (Germany), from the uranium mill tailings in Gunnison, Colorado (USA) and from the uranium mill tailings in Shiprock, New Mexico (USA). The 16S rDNA fragments which has been isolated through direct lysis of the whole-DNA were amplified by the use of the universal primers 16S_{43f} and 16S_{1404r} and cloned. With restriction fragment length polymorphism (RFLP) were the clones screened and one representative of all RFLP types that occurred more than once in the clone library was sequenced and analysed.

In spite of the contamination a considerable diversity and significant differences in the composition of the natural bacterial communities in these three sites have been found. In the sample collected from the waste pile Haberland near Johanngeorgenstadt α -Proteobacteria and representatives of the *Holophaga/Acidobacterium* were numerically predominant. The distribution of bacteria in the sample collected from uranium mill tailings Gunnison was very similar to those found in the Haberland waste pile, but there were found besides α -Proteobacteria and representatives of *Holophaga/Acidobacterium* a lot of γ -Proteobacteria. The structure of the bacterial community in the sample collected from the uranium mill tailings Shiprock was significantly different. Only some representatives of the *Holophaga/Acidobacterium* and α -Proteobacteria were represented. Large populations of *Bacilli*, γ -Proteobacteria and green non sulfur bacteria were dominant in this sample.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	II
Danksagung.....	III
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Schwermetallen... 1	1
1.2 Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität.....	4
1.3 Ziel der Arbeit.....	8
1.4 Analyseschema.....	9
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	11
2.1 Chemikalien, Lösungen, Enzyme, Kits und Primer.....	11
2.2 Standortbeschreibung und Probenentnahme.....	13
2.2.1 Haberlandhalde Johanngeorgenstadt.....	13
2.2.2 Uran „mill tailings“ Gunnison.....	14
2.2.3 Uran „mill tailings“ Shiprock.....	15
2.3 Isolierung der Gesamt-DNA aus Bodenproben.....	17
2.4 Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente von der Gesamt-DNA.....	18
2.5 Agarosegel-Elektrophorese.....	19
2.6 Klonierung der 16S rDNA-Fragmente in <i>Escherichia coli</i>	19
2.7 PCR-Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente (Inserts) mit plasmidspezifischen Primern.....	20
2.8 RFLP-Analyse der 16S rDNA-Fragmente.....	21
2.9 DNA-Sequenzierung.....	22
2.10 Phylogentische Analyse der 16S rDNA Sequenzen.....	24
3 ERGEBNISSE.....	25
3.1. Haberlandhalde Johanngeorgenstadt.....	25
3.1.1 Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe JG37 und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone.....	25
3.1.2 Vollständige Analyse der erhaltenen 16S rDNA Fragmente und Erstellung	

	phylogenetischer Dendrogramme.....	26
3.2.	Uran „mill tailings“ Gunnison.....	35
3.2.1.	Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe GUBH2 und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone.....	35
3.2.2.	Sequenzanalyse und Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft der erhaltenen predominanten 16S rDNA-Fragmente	36
3.3	Uran „mill tailings“ Shiprock.....	41
3.3.1	Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe Sh765B und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone.....	41
3.3.2	Sequenzanalyse und Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft der erhaltenen predominanten 16S rDNA Fragmente.....	41
4	DISKUSSION.....	48
4.1	Methodischer Ansatz.....	48
4.2	Einflüsse experimenteller Faktoren auf die Diversitätsanalyse.....	50
4.3	Vergleich der bakteriellen Diversität in Uranabfallhalden (Johanngeorgenstadt) und Uran „mill tailings“ (Gunnison, Shiprock).....	53
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	60
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	61

ANHANG A und B

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BDT	BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EMBL	European Molecular Biology Laboratorie
FZR Rossendorf	Forschungszentrum Rossendorf
GUBH2	Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Gunnison
ICP-MS	Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma)
JG37	Bodenprobe des Probepunktes B aus 3-4 m der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt
LB-Agar	Luria Bertani-Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
Seralpur-Wasser	Reinstwasser
Sh765B	Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UMTRA	Uranium Mill Tailings Redial Action
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
UV	Ultraviolett (ultravioletter Spektralbereich)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Metallen.....	2
Abb. 1.2: Sekundärstruktur der prokaryotischen srRNA's.....	6
Abb. 1.3: Analyseschema.....	10
Abb. 2.1: Karte des UMTRA Standortes Gunnison.....	15
Abb. 2.2: Karte des UMTRA Standortes Shiprock.....	16
Abb. 3.1: RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym <i>HaeIII</i>	26
Abb. 3.2: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe JG37 erhaltenen predominanten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen.....	29
Abb. 3.3: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe JG37 erhaltenen individuellen bakteriellen 16S rDNA Sequenzen	32
Abb. 3.4: Anzahl der Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37.....	35
Abb. 3.5: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe GUBH2.....	38
Abb. 3.6: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe GUBH2 erhaltenen predominanten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen.....	40
Abb. 3.7: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe Sh765B.....	44
Abb. 3.8: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe Sh765B erhaltenen predominanten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen	46
Abb. A1: Karte der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt.....	2
Tab. 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.....	11
Tab. 2.2: Verwendete Enzyme bzw. Kits sowie deren Hersteller.....	12
Tab. 2.3: Zusammenstellung der verwendeten Puffer, Nährmedien sowie sonstigen Lösungen.....	12
Tab. 2.4: Für die Amplifizierung und Sequenzierung verwendete Primer.....	13
Tab. 2.5: Ergebnisse der analytischen Untersuchung der Bodenproben von Johanngeorgenstadt (JG37), Gunnison (GUBH2) und Shiprock (Sh763B) mittels ICP-MS [ppm].....	17
Tab. 3.1: Zuordnung der predominanten 16S rDNA Klone der Bodenprobe JG37 der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt.....	27
Tab. 3.2: Anzahl der Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37.....	34

Tab. 3.3: Zuordnung der predominanten 16S rDNA Klone der Bodenprobe GUBH2 des Uran „mill tailings“ Gunnison.....	36
Tab. 3.4: Zuordnung der predominanten 16S rDNA Klone der Bodenprobe Sh765B des Uran „mill tailings“ Shiprock.....	42
Tab. 4.1: Verteilung der bakteriellen Populationen in % in der untersuchten Uranabfallhalde und der Uran „mill tailings“.....	54
Tab. B1: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37.....	4
Tab. B2: Zuordnung der individuellen 16S rDNA Klone der Bodenprobe JG37 der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt.....	4
Tab. B3: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe GUBH2.....	7
Tab. B4: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe Sh765B.....	7

1 Einleitung

Das Industriezeitalter ist gekennzeichnet durch Umweltverschmutzung. Ein Beispiel ist der Uranbergbau und die Extraktion von Uran aus Erzen. Dabei kommt es zu einer Verschmutzung der Umwelt mit Radionukliden und toxischen Metallen.

Die Extraktion des Urans aus Erzen wurde unter der Verwendung verschiedener chemischer und mikrobiologischer Leaching-Techniken durchgeführt und die Rückstände der Erzaufbereitung in sogenannten „mill tailings“ abgelagert (Helling, 1999). Die „mill tailings“ enthalten radioaktive Elemente wie Uran und deren Zerfallsprodukte (Radium, Thorium, die nicht extrahiert wurden), sowie viele Schwermetalle wie Selen, Molybdän, Arsen, Cadmium, Chrom, Quecksilber, Blei, Kupfer, Nickel und Zink (Francis, 1990). Auch die Böden, Sedimente und Abflusswässer dieser Umgebungen sind mit diesen gefährlichen Stoffen, die auch eine potentielle Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen, kontaminiert.

Mikrobiologische Prozesse beeinflussen die Mobilität von Radionukliden und Metallen in unterschiedlicher Weise und können für die Bioremediation dieser Umgebungen genutzt werden. Für das Verständnis der biogeochemischen Prozesse in mit Radionukliden und Schwermetallen belasteten Gebieten ist es notwendig die Diversität und Aktivität der dort vorkommenden Bakterien zu untersuchen.

Bisher konnten aus diesen stark verschmutzten Gebieten verschiedene Bakterien isoliert werden (Cerdá et al., 1993; Schippers et al., 1995). Da aber nur wenige der natürlichen Bakterienpopulationen kultivierbar sind, wurde die bakterielle Diversität in diesen Umgebungen auch mittels molekulargenetischer Methoden untersucht (Chang et al., 2001; Holmes et al., 2002; Ivanova et al., 2000; Selenska-Pobell et al., 2001; Selenska-Pobell, 2002).

1.1 Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Schwermetallen

Bakterien verfügen über verschiedene Mechanismen um mit Radionukliden und Schwermetallen in Wechselwirkung zu treten. Diese Mechanismen ermöglichen ihnen die Existenz in kontaminierten Habitaten. Einige der wichtigsten Mechanismen, mit denen die Bakterien Metalle und Radionuklide umwandeln und deren Mobilität oder Immobilisierung beeinflussen können, sind a) Biosorption, b) mikrobiell katalysierte Chemisorption von

Metallen, c) Bioakkumulation, d) Biotransformation und e) Biomineralisation (Lloyd & Macaskie, 2002; Abb. 1.1). Diese werden im folgenden näher erläutert:

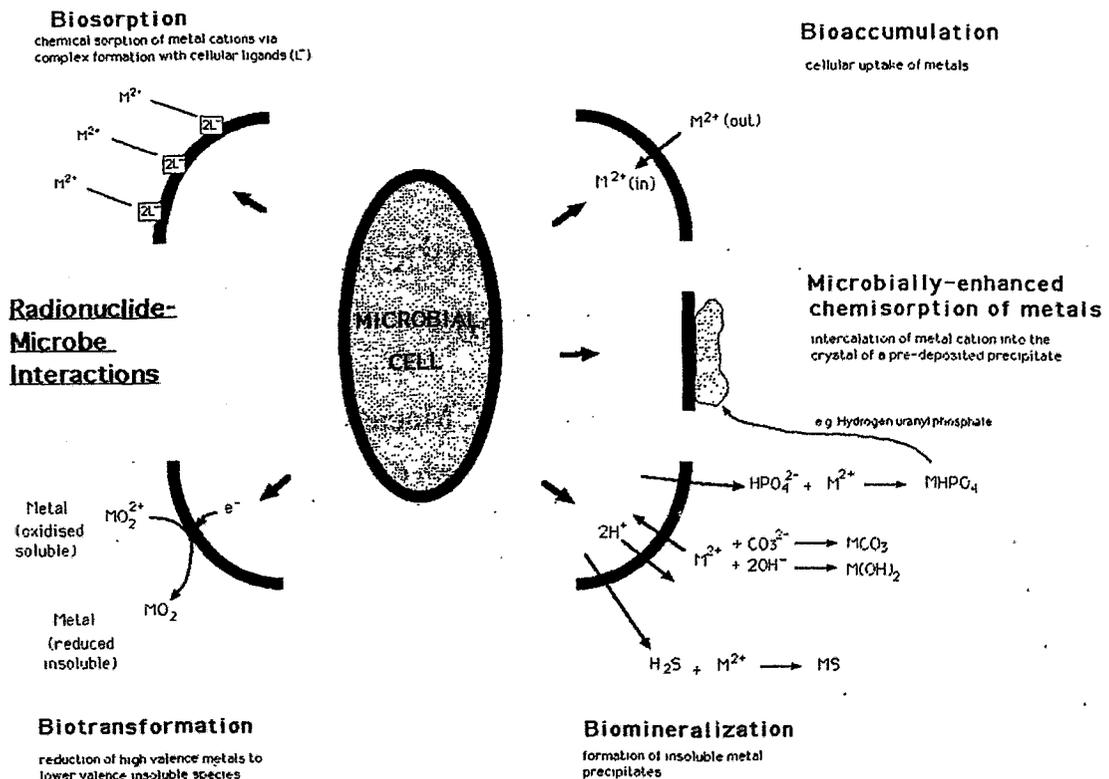


Abb. 1.1: Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Metallen (Lloyd & Macaskie, 2002)

a) Biosorption

Biosorption beschreibt die vom Stoffwechsel unabhängige Sorption von Metallen und Radionukliden an der Biomasse. Lebende und tote Biomasse kann Schwermetalle und Radionuklide sorbieren. Liganden, an denen die Metalle binden sind z.B. Carboxyl-, Hydroxyl- und Phosphat-Gruppen (Lloyd & Macaskie, 2002; Merroun & Selenska-Pobell, 2001; Raff et al., 2000; Raff, 2002).

b) Mikrobiell erhöhte Chemisorption von Metallen

Mikroben fällen dabei zuerst ein Biomineral eines Metalls, welches dann als Ausgangspunkt für die Ablagerung des gewünschten Metalls dient.

Die Sporen einiger *Bacillus* Stämme katalysieren die Oxidation von löslichen Mn(II)- zu schwerlöslichen Mn(III, IV)-Oxiden (Francis & Tebo, 2002). Die Manganoxide werden an

der Sporenoberfläche ausgefällt. Die stark geladene und reaktive Oberfläche der gebildeten Manganoxide beeinflusst die chemische Verteilung in der Umgebung durch Oxidation von organischen und anorganischen Komponenten genauso wie durch das Binden von Schwermetallen und Radionukliden aus der Lösung (Hem, 1978)

c) Bioakkumulation

Unter diesem Mechanismus versteht man die stoffwechselabhängige Aufnahme von Metall-Ionen und einigen Radionukliden als chemisches Ersatzmittel in die Zelle unter Nutzung von Transportsystemen (Lloyd & Macaskie, 2002). Die Metallspezies können in der Zelle gebunden, präzipitiert, in intrazellularen Strukturen oder Organellen lokalisiert oder translokalisiert an spezifische Strukturen in Abhängigkeit von dem Element und dem Organismus vorkommen (Gadd, 2002).

Die Aufnahme von Cadmium (Purchase et al., 1997) und Cäsium (Lloyd & Macaskie, 2000) wurden beispielsweise untersucht.

d) Biotransformation

Biotransformation beinhaltet die Bioreduktion und Biooxidation.

Die mikrobielle Oxidation von Schwermetallen und Radionukliden spielt bei der mikrobiellen Erzlaugung eine wichtige Rolle und ermöglicht die Gewinnung aus erzarmen Gesteinen, die auf klassischem Weg nicht verhüttet werden können (Fritsche, 1999). Bakterien wie *Acidothiobacillus ferrooxidans* oxidieren Fe(II) zu Fe(III). Das mikrobiell gebildete Fe(III) wirkt als Oxidationsmittel auf ein breites Spektrum von Metallsulfiden und auch schwerlöslichen Uranoxiden (indirekte Laugung). Dies führt zu einer indirekten Auflösung der Metallsulfide (Bosecker, 1997) und Mobilisierung der Metalle. *Acidothiobacillus ferrooxidans* ist auch bei der direkten Oxidation von Uran (U(IV)) beteiligt (DiSpirito & Tuovinen, 1982).

Die Reduktion einiger Elemente (z.B. U(VI)) von einer höheren zu einer niedrigeren Oxidationsstufe oder zur elementaren Form beeinflusst deren Löslichkeit und resultiert in ihrer Fällung (Francis, 1998). Bei der Abwesenheit von Sauerstoff nutzen Mikroorganismen alternative Elektronenakzeptoren. Neben Nitrat, Sulfat oder Kohlenstoffdioxid können von spezialisierten Organismen auch Metalle (Fe(III) und Mn(IV)) und Radionuklide (U(VI)) als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden (Lovley, 2002).

Zahlreiche Studien wurden zu Fe(III)-reduzierenden *Shewanella*-Spezies und der Familie *Geobacteraceae* durchgeführt (Lovley, 2002; Lloyd & Macaskie, 2002). *Geobacter metallireducens* oxidiert organische Verbindungen zu Kohlendioxid und reduziert direkt unlösliche Fe(III)-Oxide (Lovely et al., 1993a; Nevin & Lovley, 2000). Außerdem kann es durch die Reduktion von U(VI) Energie gewinnen (Lovely, 2002). Das wasserstoff- und acetatoxidierende Bakterium *Geobacter sulfurreducens* (Caccavo et al., 1994) und das zu *Holophaga/Acidobacterium* gehörende Bakterium *Geothrix fermentans* (Lonergan et al., 1996) sind zur dissimilatorischen Metallreduktion (z.B. Fe(III)) fähig. Viele dissimilatorisch metallreduzierende Bakterien können auch Uran (U(VI)) reduzieren. Sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* wie z.B. *Desulfovibrio vulgaris* reduzieren zwar U(VI), können aber dabei keine Energie gewinnen (Lovley et al., 1993b). Bisher wurde nur bei dem sulfatreduzierendem Bakterium *Desulfotomaculum reducens* nachgewiesen, dass dieses durch die Reduktion von Cr(VI), Mn(IV), Fe(III) und U(VI) wachsen kann (Tebo & Obraztsova, 1998).

e) Biomineralisation

Metalle und Radionuklide können mit enzymatisch-erzeugten Liganden z.B. Phosphaten, Sulfiden und Carbonaten ausgefällt werden (Lloyd & Macaskie, 2002). *Citrobacter* sp. setzt durch eine zellgebundene Phosphatase anorganische Phosphate frei, die mit Schwermetallen als zellgebundene Metallphosphate ausfallen (Jeong et al., 1997). In reduzierenden Umgebungen erzeugen sulfatreduzierende Bakterien wie z.B. *Desulfovibrio* sp. (Lloyd & Macaskie, 2002) oder *Klebsiella planticola* Cd-1 (Sharma et al., 2000) durch die dissimilatorische Sulfatreduktion Schwefelwasserstoff. Cd(II) kann beispielsweise mit dem gebildeten Schwefelwasserstoff als schwer lösliches Cadmiumsulfid (CdS) ausfallen (Sharma et al., 2000).

1.2 Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität

Bakterien kommen in vielfältiger Form in nahezu allen Lebensräumen der Erde vor. Durch die Entwicklung verschiedener Stoffwechselwege oder genetischer Regulationsmechanismen haben sie sich an ungewöhnliche Umweltbedingungen angepasst, wo das Leben von Tieren und Pflanzen unmöglich ist. Vor allem in Böden und Sedimenten wurde eine enorme bakterielle Diversität beobachtet.

Für die Untersuchung dieser komplexen und sehr diversen mikrobiellen Populationen reichen herkömmliche Kultivierungs- und Identifizierungsverfahren nicht aus. Früher beschränkte sich die Studie der bakteriellen Diversität in Uranabfallhalden vorwiegend auf kultivierbare Bakterien (Francis et al., 1991; Cerdá et al., 1993; Schippers et al., 1995). Auf diese Art und Weise erhält man eine weitreichende phäno- und genotypische Charakterisierung bzw. Identifizierung einzelner mikrobieller Spezies. Dadurch das >99% der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen nicht kultivierbar sind (Amann et al., 1995), wird die bakterielle Diversität unterschätzt. Die Gründe für die geringe Kultivierbarkeit von Bakterien sind mangelndes Wissen über deren Nährstoffanforderungen und andere Lebensnotwendigkeiten. Viele Mikroorganismen leben in Lebensgemeinschaften, wobei sie durch die Interaktion mit anderen Mikroorganismen beeinflusst werden. Durch die Entwicklung und Nutzung molekulargenetischer Methoden wurde eine große prokaryotische Diversität beobachtet (Chandler et al., 1997; Dojka et al., 2000; Hugenholtz et al., 1998a; Pace et al., 1997).

Für die molekulare Analyse der Diversität der natürlichen bakteriellen Gemeinschaften ist es notwendig die Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Ribonucleinsäure (RNA) aus Umweltproben zu extrahieren. Die für die phylogenetische Analyse meist verwendeten Gene sind die der RNA der kleinen Untereinheiten der Ribosomen (16S rRNA). Daraus entwickelte sich ein phylogenetisches System, welches auf 16S rRNA Sequenzen beruht, wobei die Ähnlichkeit zwischen ribosomalen Sequenzen ein Maß für die phylogenetische und evolutionäre Beziehung ist (Woese, 1987). Die 16S rRNA Gene enthalten hoch konservierte Regionen, die in allen Mikroorganismen vorkommen, sowie variable und hypervariable Regionen, welche für die Unterscheidung zwischen verschiedenen Gattungen und Spezies genutzt werden können (Abb. 1.2).

Auf der Grundlage der vergleichenden ribosomalen RNA Sequenzanalyse wurde ein universaler Stammbaum entwickelt, der die drei großen Organismengruppen (Domänen) Bacteria, Archaea und Eucarya enthält. In der Domäne Bacteria wurden bisher 36 Phyla beschrieben, von denen 13 noch ohne dazugehöriges Isolat sind (Hugenholtz et al., 1998b).

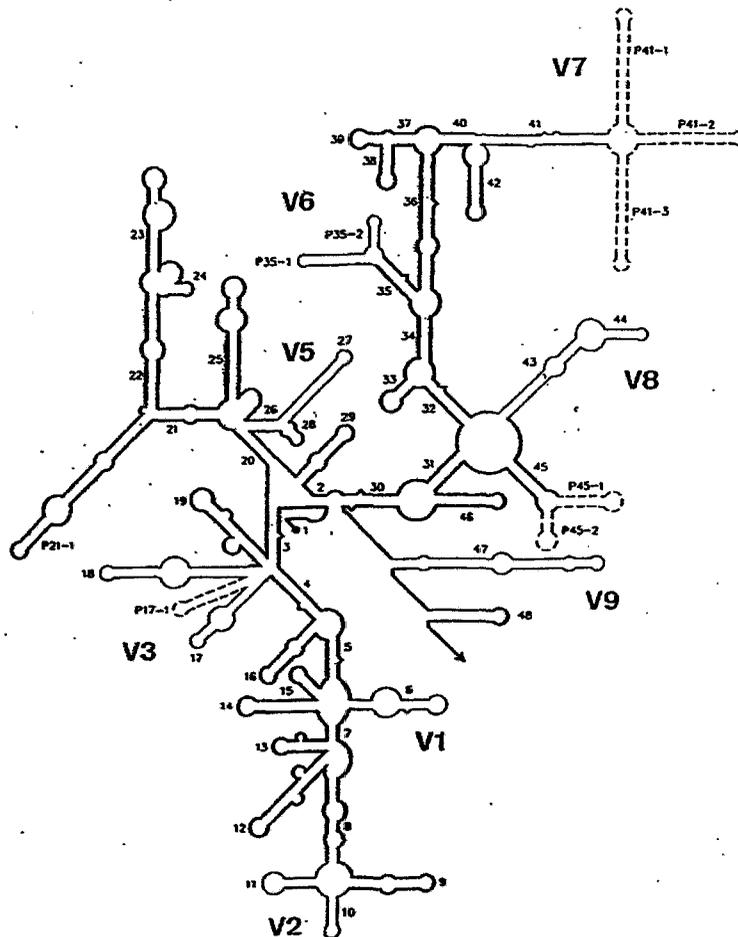


Abb. 1.2: Sekundärstruktur der prokaryotischen srRNA's (Neefs et al., 1991)

Untersuchungen der bakteriellen Diversität, die auf der Analyse der 16S rRNA Gene aus der Gesamt-DNA von Umweltproben beruhen, haben den entscheidenden Vorteil, dass auch nicht kultivierbare Organismen dieses Lebensraumes erfasst werden können. Die Einführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction), die Entwicklung zahlreicher Amplifizierungs- und Sequenzierprimer und der Einsatz von Methoden zur automatischen DNA-Sequenzierung machten die 16S rRNA- bzw. 16S rDNA-Analyse zu einer Standardmethode.

Ausgangspunkt ist die Extrahierung der Gesamt-DNA. Aus ihr können die 16S rRNA codierenden Gene amplifiziert und anschließend kloniert werden (Chandler et al., 1997, Kuske et al., 1997; Ludwig et al., 1997). Die direkte Sequenzierung zahlreicher rDNA-Inserts

ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Ähnliche 16S rDNA-Fragmente können durch die Analyse der Inserts rekombinanter Klone mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) identifiziert werden, was zu einer Beschleunigung der Analyse führt (Dojka et al., 1998). Nur die Inserts ausgewählter Klone werden sequenziert.

Bei der RFLP-Analyse schneiden die Restriktionsenzyme (Endonukleasen) die doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb von palindromen Erkennungssequenzen. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Abschnitte, die beim Auftragen auf ein Gel ein spezifisches RFLP-Muster darstellen. Die Namen der Restriktionsenzyme leiten sich von dem Bakterium ab, aus dem sie isoliert wurden.

Bei der Verwendung der PCR für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Umweltproben, besonders Bodenproben, muss man bestimmte Faktoren beachten. Durch die Extraktionsverfahren kann es dazu kommen, dass die PCR durch das Vorhandensein von Inhibitoren (z.B. Huminstoffe und Schwermetalle) behindert wird. Es können auch PCR-Artefakte wie z.B. Sequenzchimären auftreten, die durch die gleichzeitige Amplifizierung von homologen Genen entstehen. Dies kann zu einer Beschreibung von nicht-existierenden Spezies oder sogar zur Fehlinterpretation der bakteriellen Diversität führen. Die Zahl der Zyklen für die Amplifizierung und die Template-Konzentration beeinflussen die Bildung von Chimären (Qiu et al., 2001).

Normalerweise sollte die Amplifizierung von homologen, aber nicht identischen rDNA-Sequenzen mit der gleichen Effizienz erfolgen. Es zeigte sich aber, dass es zu einer selektiven Amplifizierung von einigen Templates in einer Mischung von mehr als einem Template kommen kann (Suzuki & Giovannoni, 1996).

Bisher wurden molekulare Methoden zur Analyse der bakteriellen Diversität nicht nur in landwirtschaftlichen Gebieten (Felske et al., 1998; Kuske et al., 1997) und extremen Umgebungen wie z.B. tiefen terrestrischen (Boivin-Jahns et al., 1996) und marinen Gebieten (Reed et al., 2002) und in heißen Quellen (Hugenholtz et al., 1998a), sondern auch in Umgebungen, die mit organischen und anorganischen Stoffen kontaminiert sind (Dojka et al., 1998; Nogales et al., 2001; Stein et al., 2001) angewandt.

Bei der direkten molekularen Analyse der bakteriellen Diversität in Bodenproben der Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt und des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz wurden

eine hohe Diversität und signifikante Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften dieser Standorte beobachtet (Selenska-Pobell et al., 2002).

In dem mit Uran kontaminierten „mill tailings“ Shiprock wurden mittels gruppenspezifischer 16S rDNA Primer oder enzymespezifischer Primer sulfatreduzierende Bakterien (Chang et al., 2001), ammoniakoxidierende β -Proteobakterien (Ivanova et al., 2000) und Mitglieder der Familie *Geobacteraceae* untersucht (Holmes et al., 2002).

1.3 Ziel der Arbeit

Bakterien spielen eine signifikante Rolle bei der Transformation und Migration von Metallen in der Natur (Kapitel 1.1). Uranabfallhalden und Uran „mill tailings“ repräsentieren eine extrem komplexe und mit Radionukliden und anderen Schwermetallen hoch verschmutzte Umgebung, in der verschiedene Bakteriengruppen in eine Vielzahl von Metall-Bio-Umwandlungsprozessen wie Oxidation, Reduktion, Sorption und sogar der Aufnahme involviert sind. Diese Prozesse beeinflussen die Mobilität von Metallen, welche ein wichtiger Faktor für ihre Migration und Toxizität sind.

Bei der Analyse von Bodenproben der Haberlandhalde in Johanngeorgenstadt, die aus einer Tiefe bis 3 m entnommen wurden, wurde eine hohe bakterielle Diversität und die Predominanz der α -Proteobakterien, *Holophaga/Acidobacterium* und der Actinobakterien festgestellt (Selenska-Pobell et al., 2002).

Ein Ziel der Arbeit soll sein zu untersuchen, ob bei der Analyse der bakteriellen Diversität einer Bodenprobe dieses Standortes aus größeren Tiefen bis 4 m (JG37) ebenfalls die Predominanz dieser Bakterien beobachtet wird.

Es wurden signifikante Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften in Bodenproben der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt und des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz festgestellt (Selenska-Pobell et al., 2002). Diese beobachteten Unterschiede liegen wahrscheinlich in dem unterschiedlichen geologischen Ursprung und der unterschiedlich starken Kontamination der Bodenproben mit Radionukliden und Schwermetallen begründet. Um dies zu überprüfen, wurde jeweils eine Bodenprobe von zwei weiteren Uran „mill tailings“ (Gunnison und Shiprock) hinsichtlich der bakteriellen Diversität untersucht.

Viele der in diesen Umgebungen vorkommenden Bakterien sind derzeit aufgrund der oben genannten Gründe nicht kultivierbar. Deshalb wurde eine kultur-unabhängige direkte molekulare Methode, basierend auf der 16S rRNA Gen Analyse gewählt, um die bakterielle Diversität in diesen extremen Umgebungen zu untersuchen. Es wurde unter Verwendung der universellen Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} eine 16S rDNA-Klonbibliothek angelegt. Bei der Erstellung der 16S rDNA Klonbibliothek für die Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock wurde ein degenerierter 16S_{43f}-Primer verwendet, um zu überprüfen, ob damit mehr Bakteriengruppen erfasst werden können. Die amplifizierten 16S rDNA-Fragmente (Inserts) wurden durch eine RFLP-Analyse mittels der häufig schneidenden Restriktionsenzyme *MspI* und *HaeIII* typisiert. Ein Vertreter aller RFLP-Typen, die mehr als einmal in der Klonbibliothek auftraten, wurde sequenziert und analysiert. Um zu überprüfen, ob mit der Analyse der Inserts der Klone mit häufig vorkommenden (predominanten) RFLP-Profilen die bakterielle Diversität ausreichend gut beschrieben wird, wurden von der Klonbibliothek der Bodenprobe JG37 der Haberlandhalde in Johanngeorgenstadt auch die Inserts aller Klone mit individuellen RFLP-Profilen sequenziert.

Die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen wurden unter der Nutzung von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mit verfügbaren Sequenzen verglichen und phylogentisch analysiert.

1.4 Analyseschema

In der Abb. 1.3 sind alle im folgendem Kapitel Materialien und Methoden beschriebenen Arbeitsschritte zusammenfassend dargestellt.

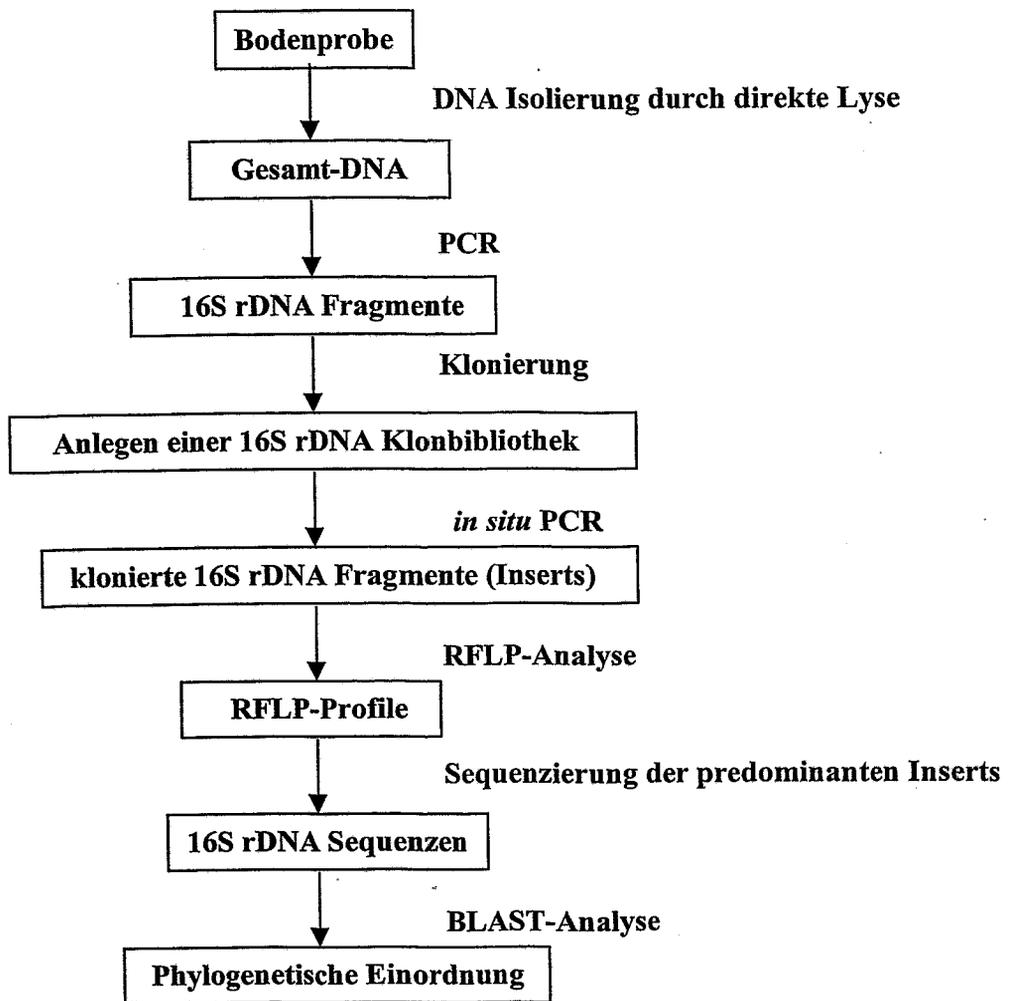


Abb. 1.3: Analyseschema

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Enzyme, Kits und Primer

Die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller sind in der folgenden Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Agar (granuliert)	Difco, Detroit, USA
Agarose (Ultra pure)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Promega, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Chemical Co., St Louis, USA
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Promega, Mannheim, Deutschland
Kanamycindisulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
1 KBplus Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid ultra pure	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Na ₂ -EDTA	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Difco, Detroit, USA
PEG-6000	Merck, Darmstadt, Deutschland
POP6-Gel	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Seralpur-Wasser	FZR Rossendorf, Deutschland
Small DNA Low Melt Agarose	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Sucrose	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Template Suppression Reagent (TSR)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Trisaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Difco, Detroit, USA
VE-Wasser	FZR-Rossendorf, Deutschland
X-Gal(5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Promega, Mannheim, Deutschland
Xylencyanolblau	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Die Gewinnung des Seralpur-Wassers (Reinstwasser) und des VE-Wassers (vollentsalztes Wasser) erfolgte mit einem Seraldest SD Wasservollentsalzer (Seral, Ransbach-Baumbach,

Deutschland) oder einer Seralpur Delta UV/UF-Anlage (Seral, Ransbach-Baumbach, Deutschland).

Die verwendeten Enzyme und Kits sind zusammenfassend aufgeführt (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Verwendete Enzyme bzw. Kits sowie deren Hersteller

Substanz/Kit	Hersteller
ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
AmpliTag Gold Polymerase und PCR-Puffer II	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix (BDT)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Hae</i> III, entsprechender Puffer und BSA	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>Msp</i> I, entsprechender Puffer und BSA	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>Taq</i> DNA Polymerase und Storage Puffer B	Promega, Mannheim, Deutschland
TOPO TA Cloning™-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Quick Step™2 PCR Purification Kit	Edge Biosystems, Gaithersburg, USA

Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Nährmedien sowie sonstiger Lösungen sind im folgenden tabellarisch zusammengestellt (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Zusammenstellung der verwendeten Puffer, Nährmedien sowie sonstigen Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
Enzym Storage Puffer B (Promega)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0 bei 25°C) 100 mM Natriumchlorid 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT 50% Glycerol 1% Triton X-100
GeneAmp10x PCR-Puffer	10 mM Tris-Salzsäure pH 8,3 500 mM Kaliumchlorid
Kilobasenleiterstandard	3 µl 1 KBplus Ladder [1 µg/µl] 6 µl Stopp-Mix (3x) 21 µl Seralpur-Wasser
LB(Luria-Bertani)-Agar	5,0 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5,0 g Natriumchlorid 7,5 g Agar (granuliert) ad 475 ml VE-Wasser 30 min autoklavieren bei 120 °C nach Autoklavieren auf ca. 50 °C abkühlen 2 ml Kanamycin (12,5 mg/ml)

Substanz	Zusammensetzung
Nukleotidsvorratslösung	dATP 12,5 mM dTTP 12,5 mM dGTP 12,5 mM dCTP 12,5 mM
Stopp-Mix (3x)	4M Harnstoff 50,000 g Sucrose 50 mM Na ₂ -EDTA 0,250 g Bromphenolblau 0,250 g Xylencyanolblau mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen
Tris-Borat-EDTA-Puffer (5x) (TBE-Puffer)	108,0 g Tris 55,0 g Borsäure 7,44 g Na ₂ -EDTA mit VE-Wasser auf 2 l auffüllen

Alle für die Amplifizierung und Sequenzierung verwendeten Primer wurden von MWG Biotech AG in Ebersberg (Deutschland) hergestellt (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Für die Amplifizierung und Sequenzierung verwendete Primer

Primer	Sequenz	<i>E. coli</i> Position
16S _{43f}	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'	16S rDNA ₄₃₋₆₃
16S _{1404r}	5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'	16S rDNA ₁₄₀₄₋₁₃₈₇
16S _(deg.43f)	5'-(ACT)(AG)(GT)GC(GCT)T(AT)A(GCT) (AG)CATGCAAGTC-3'	16S rDNA ₄₃₋₆₃
16S _{342f}	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTGGG-3'	16S rDNA ₃₄₂₋₃₆₁
16S _{802r}	5'-TACCAGGGTATCTAATC-3'	16S rDNA ₈₀₂₋₇₈₆
16S _{984r}	5'-GTAAGGTTCTTCGCGT-3'	16S rDNA ₉₈₄₋₉₆₉
PE-T7	5'-AATTGTAATACGACTCACTATAG-3'	
PE-Sp6	5'-TATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'	
M13(-40)f	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	
M13r	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	

2.2 Standortbeschreibung und Probenentnahme

2.2.1 Haberlandhalde Johanngeorgenstadt

Johanngeorgenstadt (Deutschland) befindet sich im südwestlichen Teil Sachsens, im Westerzgebirge. Die Haberlandhalde liegt im Norden der Stadt Johanngeorgenstadt an der Haberlandmühle in der Nähe des Flusses Schwarzwasser. Auf der Halde wurden für die Verarbeitung nicht verwertbare Erze abgelagert. Die untersuchte Bodenprobe wurde im

August 1998 durch Bohrung im Mittelbereich des Haldenufußes am Probenpunkt B in einer Tiefe von 3 - 4 m entnommen (Abb. A1) und erhielt die Bezeichnung JG37. Die Konservierung der Probe erfolgte mittels Stickstoffspülung und Inliner. Bis zur Bearbeitung wurde die Probe bei -80 °C gelagert. In der Abteilung der Analytik des Forschungszentrums (FZR) Rossendorf (Deutschland) wurde die Probe hinsichtlich ihrer Uran- und Metallgehalte mittels Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS) untersucht (Tab. 2.5). Die Untersuchung ergab, dass diese Probe im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Proben der Uran „mill tailings“ Gunnison und Shiprock deutlich stärker vor allem mit Uran und Eisen kontaminiert ist. Im Vergleich zu natürlichen Böden (1 ppm – Morris & Raisewell, 2002) ist die Urankonzentration etwa 70 mal größer.

2.2.2 Uran „mill tailings“ Gunnison

Das Uran „mill tailings“ Gunnison befindet sich in der Nähe der Stadt Gunnison in Gunnison County, Colorado (USA) in einem weit ausgedehnten Schwemmtal, welches von vier Tälern zerschnitten und von Bergen höher als 4000 m umrandet ist. Die ausgedehnte frühere Überflutungsfläche befindet sich zwischen dem Gunnison River und dem Tomichi Creek. Die Breite des Schwemmlandes schwankt zwischen 22 m bis zu mehr als 40 m. Der Standort ist semiarid mit einem jährlichen Niederschlag von 28 cm und einem jährlichen Schneefall von 147 cm (<http://www.doegjpo.com>). In der Aufbereitungsanlage von Gunnison wurden von 1957 bis 1962 die Erze der Los Ochos claims (südöstlich von Gunnison) verarbeitet. Der Standort wurde in das Uranium Mill Tailings Remedial Action (UMTRA) Programm aufgenommen, um die dort ablaufenden biogeochemischen Prozesse zu untersuchen und die Ergebnisse für die Sanierung dieses und anderer Standorte zu nutzen.

Die untersuchte Bodenprobe GUBH2 wurde im Oktober 1999 in der Nähe des Brunnens 0125 unter Nutzung eines Grabenbaggers entnommen (Abb. 2.1). Vor jeder Probenahme wurde die Schaufel des Baggers gründlich gereinigt. Die Probe wurde aus einer bis zur Grundwasseroberfläche ausgegrabenen Grube (2,5 bis 3,5 m tief) entnommen (<http://www.doegjpo.com>) und schnellstmöglich unter Einfluss von Ar-Gas verfrachtet (verminderter Sauerstoffeinfluss). Dadurch wird der Kontakt mit der Atmosphäre minimiert. Im Labor wurde sie in sterile Röhrchen überführt und bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Ergebnisse der Analytik (Tab. 2.5) zeigen, dass diese Probe im Vergleich zu der Probe von Johanngeorgenstadt deutlich weniger stark mit Eisen, Mangan, Cobalt, Nickel, Kupfer, Zinn, Arsen, Cadmium, Quecksilber und Uran kontaminiert ist. Im Vergleich zu den Hintergrundwerten (Spalte 4, Tab. 2.5) wurden aber erhöhte Konzentrationen an Eisen, Mangan und Uran festgestellt.

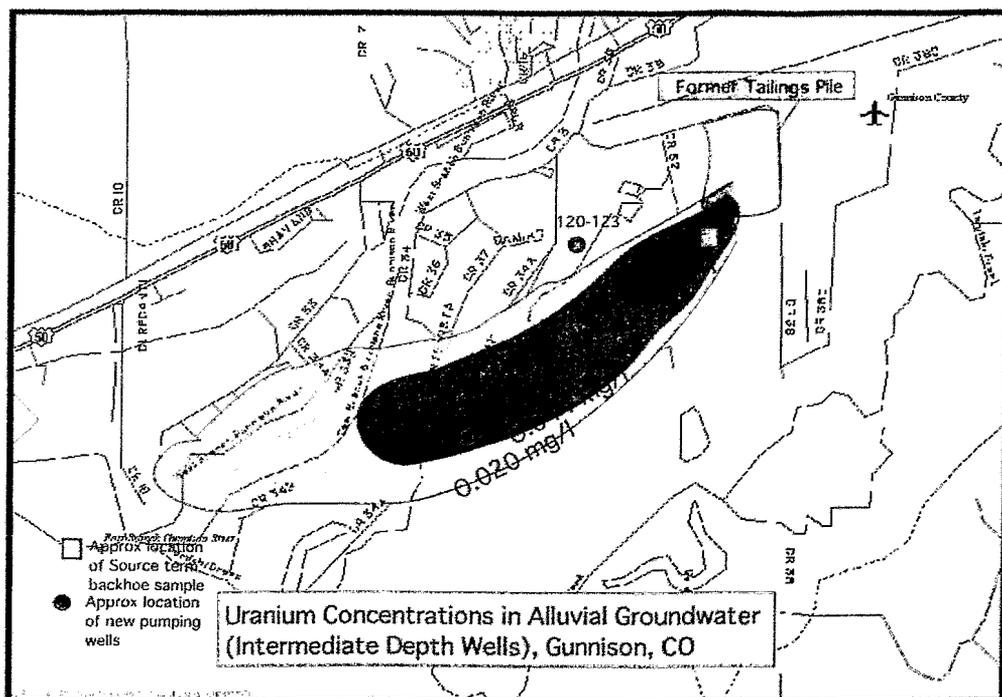


Abb. 2.1: Karte des UMTRA Standortes Gunnison (<http://www.doegjpo.com>)

2.2.3 Uran „mill tailings“ Shiprock

Das Uran „mill tailings“ Shiprock befindet sich im Navajo Nationalland in San Juan County im Nordosten von New Mexico (USA). Der Standort liegt südlich des San Juan River am südöstlichen Rand der Stadt Shiprock und wurde auch in das UMTRA Projekt aufgenommen. Der Untersuchungsbereich befindet sich auf nicht verfestigten angeschwemmten Terrassenablagerungen unterlegt von Mancos Schiefer (Chang et al., 2001). Der Standort ist arid mit einem jährlichen Niederschlag von 17 cm und jährlichen Schneefall von 10 cm. Es wurden dort ungefähr 1,2 Millionen Kubikmeter kontaminiertes Material in einer 29 Hektar großen Deponie im unteren Teil der Terrasse an der gleichen Stelle abgelagert, wo sich das

frühere Uran „mill tailings“ befand (<http://www.doegjp.com>). Die Uranaufbereitungsanlage wurde von 1954 bis 1968 betrieben.

Die untersuchte Bodenprobe Sh765B wurde im April 2000 von den UMTRA Mitarbeitern am Probenpunkt 765 (Abb. 2.2) unter Verwendung eines Grabenbaggers aus einer Tiefe von neun Metern entnommen ([Kapitel 2.2.2 und http://www.doegjp.com](http://www.doegjp.com)).

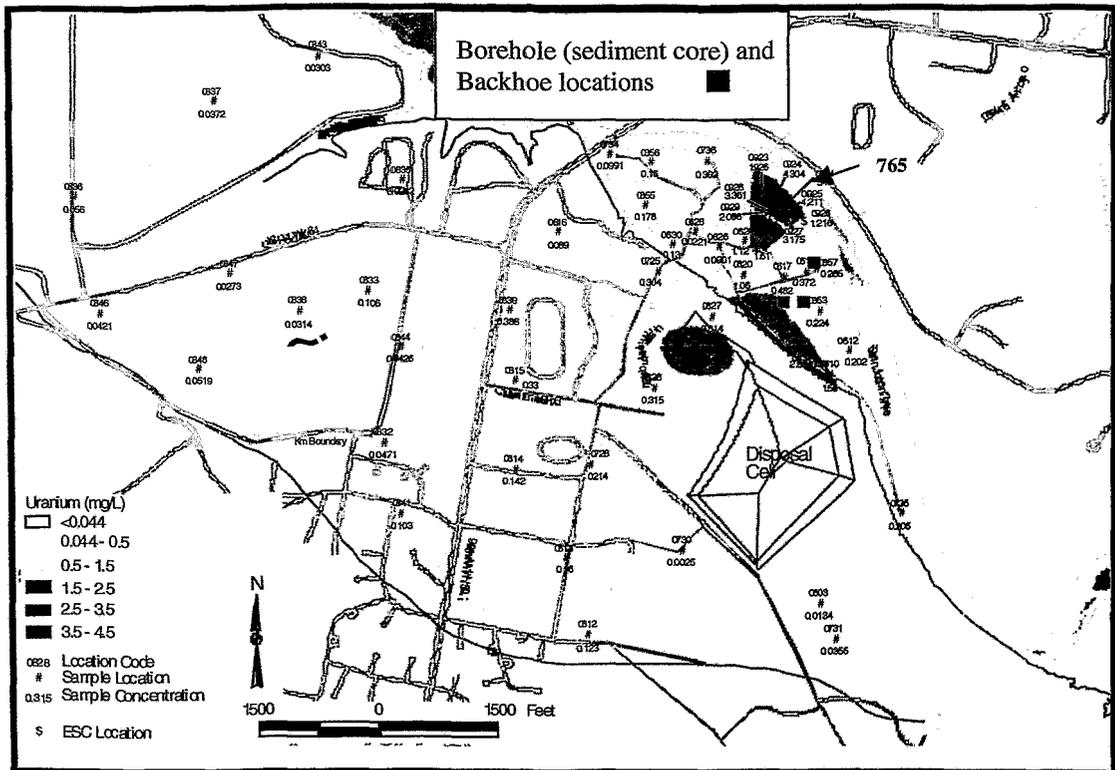


Abb. 2.2: Karte des UMTRA Standortes Shiprock (<http://www.doegjp.com>)

Die Bodenprobe 763B (Hinterland) wurde von der Abteilung der Analytik des Institutes für Radiochemie (FZR Rossendorf) mittels ICP-MS untersucht (Tab. 2.5). In der Schwemmfläche, wo sich die Entnahmestelle der untersuchten Probe Sh765B befindet, wurden erhöhte Konzentrationen von Mangan, Cadmium und Uran festgestellt (Spalte 5, Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Ergebnisse der analytischen Untersuchung der Bodenproben von Johanngeorgenstadt (JG37), Gunnison (GUBH2) und Shiprock (Sh763B) mittels ICP-MS¹⁾ [ppm]

Element	JG37 ²⁾ B3-4m	GUBH2 ³⁾ 2,5-3,5m	Gunnison ⁴⁾	Shiprock ⁵⁾	Sh763B ⁶⁾
Al	18700	29600			11540
Ca	1050	8140			1724
Cr	79,4	21,2			3,35
Fe	52000	26500	1390		5978
Mn	1030	382	60,3	723	253,6
Co	39,9	10,5			2,72
Ni	72,4	13,2			<0,5
Cu	110	14,1			4,72
Zn	476	134			17,24
As	418	19		4,20	3,79
Sr	12,2	141			56,19
Ag	0,223	0,0716			0,335
Cd	4,11	2,77		1,17	0,053
Sn	24	2,63			0,117
Hg	1,45	<0,5			<0,001
Pb	46,7	31,5			13,86
Th	1,96	2,9			0,3749
U	69,7	3,31	0,2	35,6	1,483

¹⁾ Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma), ²⁾ Bodenprobe der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt, ³⁾ Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Gunnison, ⁴⁾ Ergebnisse vom Hinterlandstandort 550 aus <http://www.doegjpo.com>, ⁵⁾ Maximale Bodendaten der Schwemmfläche aus <http://www.doegjpo.com>, ⁶⁾ Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock (Hintergrundwert)

2.3 Isolierung der Gesamt-DNA aus Bodenproben

Die Gesamt-DNA wurde mittels direkter Lyse isoliert. Die direkte Lyse umfasst folgende Schritte 1.) Lyse der mikrobiologischen Zellen; 2.) Trennung der DNA von anderen Zellbestandteilen (z.B. Proteine und Polysaccharide) und Bodenpartikeln und 3.) Fällung der DNA (Reinigung). Die DNA der Bodenprobe JG37 wurde unter Verwendung der Methode von Selenska & Klingmüller (1991) isoliert. Hierbei erfolgte die Fällung der extrahierten DNA mittels PEG-6000 und die abschließende Reinigung mittels CsCl Dichtegradienten Zentrifugation. Bei den anderen beiden Proben (Sh765B und GUBH2) wurde die abschließende Reinigung unter Verwendung der Nucleobond Cartridge Typ AXG-100 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) anstatt mittels CsCl-Dichtegradienten durchgeführt.

2.4 Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente von der Gesamt-DNA

Zur Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente der isolierten Gesamt-DNA der Bodenproben wurde eine PCR unter Verwendung der universellen Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} (Tab. 2.4) durchgeführt. Ein Amplifikationszyklus umfasst folgende Schritte: 1.) Trennung der beiden Stränge der Template-DNA bei 94 °C (Denaturierung), 2.) Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA (Annealing) und 3.) Kettenverlängerung durch die *Taq*-Polymerase bei deren Temperaturoptimum von 72 °C (Elongation). Für die Bodenprobe Sh765B wurde anstatt des 16S_{43f}-Primers ein degenerierter 16S_(deg.43f) Primer verwendet (Tab. 2.4), der nach den Ergebnissen von Marchesi et al. (1998) konstruiert und wie alle Primer von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert wurde.

Das Gesamtvolumen der PCR-Mischung betrug 10 µl und setzte sich aus 0,9 µl Template-DNA, 1 µl GeneAmp10x PCR-Puffer II, 1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,1 µl Nukleotidvorratslösung (je 12,5mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP), je 0,4 µl Primer (10 µM) und 0,1 µl *AmpliTaq* Gold Polymerase (5 U/µl) zusammen. Alle Komponenten bis auf die Template-DNA wurden als „Master-Mix“ zusammen pipettiert, auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verteilt und dann die Template-DNA hinzugegeben. In der Negativkontrolle wurde keine Template-DNA in den PCR-Ansatz gegeben. Die PCR-Amplifizierung wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Um die mit einem spezifischen Antikörper inaktivierte *AmpliTaq* Gold Polymerase zu aktivieren, bestand der erste Schritt des PCR-Programmes aus einem „hot start“ von 7 min bei 95 °C, bei dem der Antikörper denaturierte und die *Taq* freigab. Es folgten dann fünf Zyklen bestehend aus 1 min 30 s bei 95 °C, 40 s touch down mit 1 °C pro Zyklus von 59 °C auf 55 °C, 1 min 30 s bei 72 °C, 25 Zyklen mit 1 min bei 94 °C (Denaturierung), 40 s bei 55 °C (Annealing), 1 min 30 s bei 72 °C (Polymerisation) und einem abschließenden Schritt mit 20 min bei 72 °C (Extension).

2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte wurden 2 µl des Reaktionsansatzes mit 2 µl dreifach konzentriertem Stopp-Mix und 2 µl VE-Wasser versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die optimale Agarose-Konzentration (in der Regel 0,5–2,0%) hängt von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Für die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen PCR-Fragmente (circa 1600 bp) wurden 1,2%ige Agarose-Gele verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose (Ultra pure) in 0,5xTris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) gegeben und durch kurzes Kochen in der Mikrowelle gelöst. Unter Verwendung eines Gelschlittens (Perfect blue™ Gelsystem Maxi M, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und eines Kammes (24 Zähne, 1,0 mm breit) wurde ein Gel mit Taschen gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses mit 0,5xTBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt.

Um die Größe der DNA-Fragmente zu überprüfen wurde ein Kilobasenleiterstandard (1 KBL plus) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte nach Beladung des Gels im elektrischen Feld für 1h 30 min bei 4 V/cm (Netzgerät Bio-Rad PowerPac200, Bio-Rad Laboratories, Hercules).

Um die DNA in Agarosegelen sichtbar zu machen, wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese in einem Ethidiumbromid-Färbepad (0,01%) 10 min lang gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich in die Doppelhelix der DNA ein (Interkalation) und wird durch UV-Bestrahlung zur Fluoreszenz angeregt. Um die spezifische Färbung des Hintergrunds zu reduzieren wurde das Gel anschließend noch kurz in VE-Wasser entfärbt. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Transluminator im Gel print 2000i (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland), wobei das Gel für 19 Sekunden UV-Licht von 312 nm ausgesetzt wurde.

2.6 Klonierung der 16S rDNA-Fragmente in *Escherichia coli*

Unter Klonierung versteht man die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor. Um die amplifizierten 16S rDNA-Fragmente der Gesamt-DNA zu analysieren, wurde eine Klonierung durchgeführt, bei der eine Klonbibliothek mit mehr als 100 Klonen entstand. Jeweils ein 16S rDNA-Fragment wurde in einen Vektor (Plasmid) eingebracht und von einer kompetenten *E.coli*-Zelle aufgenommen. Somit enthält jeder Klon der Klonbibliothek ein 16S rDNA-Fragment, das von einem 16S rRNA Gen einer bakteriellen Zelle amplifiziert wurde. Die *AmpliTaq* Gold Polymerase fügt bei der PCR unspezifisch durch ihre templateunabhängige Transferaseaktivität einen 3'-dA-Überhang an. Bei der Klonierung von

PCR-Produkten kann man diesen Überhang ausnutzen, indem ein Plasmid mit dT Überhang verwendet wird. Auf Grund dessen wurde für die Klonierung der PCR-Produkte der 16S-Region der TOPO TA Cloning™-Kit verwendet. Die Durchführung der Ligation und Transformation erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem pCR™II-Topo-Cloning-Vektor (3,9 kb).

Die Transformanden wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur Blau-Weiß-Selektion wurden zuvor 40 µl Isopropylthiogalactosid (IPTG, 40 mg/ml) und 32 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 50 mg/ml) einplattiert. X-Gal dient dabei als Substrat für das Enzym β-Galactosidase, dessen Synthese in *E. coli* durch das Lactose-Analogon IPTG induziert wird. Die β-Galactosidase spaltet das Substrat in Galactose und ein Indonyl-Derivat, welches zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo oxidiert wird. Die Blau-Weiß-Selektion basiert darauf, dass beim Einbau der Fremd-DNA in den Plasmiden die dort codierte Teilaktivität der β-Galactosidase-Aktivität zerstört wird, so dass das Substrat X-Gal nicht gespalten werden kann und die rekombinanten *E. coli*-Klone deshalb farblos sind (Fritsche, 1999). Bei nichtrekombinanten *E. coli*-Klonen wird X-Gal gespalten und sie erscheinen als blaue Klone. Es wurden jeweils 85 µl des Reaktionsgemisches auf drei Platten einplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 150 weiße Klone wurden am nächsten Morgen mit je einem sterilen Zahnstocher entnommen und auf neue LB-Agarplatten überimpft. Diese Platten wurden erneut über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von diesen Platten wurden dann mittels Pick 2 ml steriles LB-Medium+Kanamycin angeimpft. Die Kulturen wurden wiederum über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zur Aufbewahrung der Klone wurde 1 ml der Übernachtskulturen zu jeweils 1 ml sterilem Glycerol gegeben. Die Glycerolkultur wurde gut vermischt und bei -80 °C eingefroren.

2.7 PCR-Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente (Inserts) mit plasmidspezifischen

Primern

Zur Überprüfung der Größe der klonierten 16S rDNA-Fragmente wurde eine *in situ* PCR mit den plasmidspezifischen Primern M13(-40)f und M13r durchgeführt. Als Templates dienten die Übernachtskulturen der vereinzelt Klone in LB-Medium+Kanamycin. Das Template wurde direkt aus dem Kultur-Röhrchen entnommen (*in situ* PCR). Das totale Volumen dieser PCR-Mischung betrug 20 µl und setzte sich aus 0,9 µl Übernachtskultur, 2 µl Enzym Storage Puffer B (10fach), 1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,2 µl Nukleotidvorratslösung (je 12,5 mM dATP,

dTTP, dGTP und dCTP), je 0,7 µl Primer (10 µM), sowie 0,2 µl *Taq* DNA Polymerase (5U/µl) zusammen. Die Amplifizierung wurde mit dem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) nach folgendem PCR-Protokoll durchgeführt: 3 min bei 95 °C („hot start“), gefolgt von fünf Zyklen mit 1 min 30 s bei 95 °C, touch down von 40 s (1 °C pro Zyklus von 59 °C auf 55 °C) und 1 min 30 s bei 72 °C, sowie 25 Zyklen mit 1 min bei 94 °C, 40 s bei 55 °C und 1 min 30 s bei 72 °C und abschließend 20 min bei 72 °C. Der Erfolg der Amplifikationen wurde auf einem 1,2%igen Agarosegel überprüft (Kapitel 2.5).

2.8 RFLP-Analyse der 16S rDNA-Fragmente

Die PCR-Produkte, die mittels der Primer M13(-40)f und M13r gewonnen wurden (Kapitel 2.7), wurden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Das Restriktionsenzym *MspI* schneidet innerhalb der Erkennungssequenz 5'-C[↓]CGG-3' und *HaeIII* innerhalb der Erkennungssequenz 5'-GG[↓]CC-3'. Der Verdauansatz enthielt entsprechend des Gehaltes 1,5 – 4,5 µl PCR-Produkt, 1 µl Restriktionsenzym *MspI* oder *HaeIII* [10U/µl], 1 µl entsprechenden Puffer, 0,1 µl Bovine Serum Albumin (BSA [10 µg/µl]) und wurde mit sterilem Seralpur-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Wasserbad bei 37 °C. Nach circa 16 h wurde der Ansatz mit 2 µl dreifach konzentriertem Stopp-Mix versetzt. Der gesamte Ansatz wurde auf ein Verdaugel aufgetragen, um die verdauten Fragmente zu separieren. Für die Herstellung des Verdaugels (3,5%) wurde Small DNA Low Melt Agarose in 0,5xTBE-Puffer durch Erhitzen aufgelöst. Das Gel wurde dann mindestens für 1h bei 70 °C inkubiert. Nach der Beladung des Gels erfolgte die Auftrennung der Fragmente in einem elektrischen Feld für 5 h bei 3,4 V/cm (Netzgerät Bio-Rad PowerPac 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules). Das Gel wurde dann für 30 min in einem 0,01%igem Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt und anschließend für circa 5 min in VE-Wasser entfärbt, um Hintergrundsignale zu minimieren. Die Auswertung des Gels erfolgte mittels Gel print 2000i (MWG-Biotech, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 312 nm für eine Zeit von 22 Sekunden.

Die *MspI*-Profile jeder Klonbibliothek wurden visuell miteinander verglichen und gleiche und ähnliche Profile zu RFLP-Gruppen zusammengefasst. Beim Verdau mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* wurden alle Vertreter einer *MspI*-RFLP-Gruppe nebeneinander aufgetragen, um mögliche Unterschiede zwischen den Profilen besser zu erkennen. Das Insert eines Vertreters jeder RFLP-Gruppe wurde für die Sequenzierung ausgewählt. Die Klone,

deren Inserts ein häufig vorkommendes RFLP-Profil erzeugten, wurden als predominant bezeichnet. Sie waren zwar zahlenmäßig in der Klonbibliothek dominant, aber man kann nicht davon ausgehen, dass die Klonhäufigkeit in der Bibliothek der tatsächlichen bakteriellen Häufigkeit an diesem Standort entspricht.

2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion beruht auf dem Kettenabbruch bei der Replikation des Templates infolge der Zugabe von Didesoxynucleotiden (Didesoxymethode nach Sanger). Dazu wurde der ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Neben den 2'-Desoxynucleotiden (dNTP's) werden auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynucleotide (ddNTP's) zugegeben. Bei der PCR wird nach den Gesetzen der Statistik entweder ein dNTP oder ein ddNTP eingebaut. Beim Einbau eines ddNTP's kommt es aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe zum Abbruch der Reaktion. Die vier verschiedenen ddNTP's sind jeweils mit einem anderen Farbstoff markiert.

Für die Sequenzierung wurden von den ausgewählten Klonen neue *in situ* PCR's durchgeführt (Kapitel 2.7). Es wurden zwei PCR-Ansätze mit jeweils 20 µl angesetzt und auf Erfolg der Amplifikation überprüft (Kapitel 2.5). Bei erfolgreicher Amplifikation wurden beide Ansätze vereinigt und unter Verwendung des Quick Step™2 PCR Purification Kit gereinigt. Diese Reinigung von Salzen, Primern, Einzelstrang DNA, dNTP's, Enzymen und anderen niedermolekularen Bestandteilen ist für den Einsatz der Amplifikate bei der Sequenzierreaktion notwendig. Die Durchführung der Reinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Für den Ansatz der Sequenzierreaktion wurden je nach Gehalt des PCR-Produktes 2,5 – 4,5 µl PCR-Produkt eingesetzt, 2,0 µl eines Primers (3,2 µM) und 1,8 µl BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix (BDT) hinzugegeben und mit sterilem Seralpur-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die verwendete BDT-Lösung enthält dNTP's, fluoreszenzmarkierte ddNTP's, AmpliTaq DNA Polymerase, Puffer und MgCl₂. Für die Sequenzierung wurden die Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} verwendet. Im Bedarfsfall wurde ein dritter Ansatz mit einem der Primer 16S_{342f}, 16S_{802r} oder 16S_{984r} (Tab. 2.4) durchgeführt.

Die Sequenzen der Inserts wurden unter Verwendung des T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) amplifiziert, wobei für die verschiedenen Primer unterschiedliche Programme verwendet wurden. Das Programm für die Primer 16S_{43f} und 16S_{342f} startete mit 2 min bei 96 °C. Dann folgten 30 Zyklen mit 30 s bei 96 °C und 4 min bei 60 °C. Nach 2 min bei 96 °C folgten bei Primer 16S_{1404r} 25 Zyklen mit 30 s bei 96 °C (Denaturierung), 15 s bei 55 °C (Annealing) und 4 min bei 60 °C (Elongation). Dieses Protokoll galt auch für die Primer 16S_{802r} und 16S_{984r} mit einer Annealingtemperatur von 45 °C.

Um das Amplifikat zu reinigen wurde nach der PCR eine Ethanol/Natriumacetat-Fällung bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Dazu wurde der 10 µl Reaktionsansatz mit 90 µl sterilem Seralpur-Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl Ethanol (99,8%) versetzt, vorsichtig gemischt und 15 min bei 12800 g und RT zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 250 µl Ethanol (70%) versetzt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde danach für 7 min bei 12800 g und RT zentrifugiert und erneut der Überstand abgesaugt. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurden die Proben für 5 min in den Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gestellt. Das Pellet wurde dann mit 25 µl Template Suppression Reagent (TSR) resuspendiert, für 2 min bei 96 °C denaturiert und danach schockartig in Eis gekühlt, um eine erneute Doppelstrangbildung der Amplifikate zu verhindern.

Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Gerät ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Das Gemisch der unterschiedlich langen Fragmente wurde in einer Kapillare mit einem Durchmesser von 50 µm und einer Länge von 61 cm in POP6-Gel („performance optimize polymere“-Gel) mittels Kapillarelektrophorese bei einer Spannung von 12,2 kV bei 50 °C innerhalb von 120 bis 150 min der Größe nach getrennt. Die Anregung mittels Laser erfolgte gleichzeitig mit allen vier Wellenlängen. Die von dem fluoreszenzmarkierten Teil des Fragmentes ausgesendeten vier Emissionsmaxima wurden detektiert. Mit zunehmender Länge des Fragmentes nimmt der Einfluss des fluoreszenzmarkierten Bereichs ab, so dass nur circa 700 Basen gelesen werden können. Die erhaltenen Daten wurden mittels „DNA Sequencing Software“ von PE Applied Biosystems ausgewertet. Man erhält schließlich ein Elektropherogram, aus dem man die Basenabfolge ablesen kann.

2.10 Phylogenetische Analyse der 16S rDNA Sequenzen

Um die Basenabfolge des gesamten sequenzierten 16S rDNA-Fragmentes zu erhalten, ist es notwendig mindestens zwei Teilsequenzen zu kompilieren. Dies wurde unter Verwendung der Autoassembler 2.0 Software von PE Applied Biosystems durchgeführt. Das gesamte sequenzierte 16S rDNA-Fragment wurde noch einmal auf Lesefehler hin überprüft.

Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen wurden mit den Datenbanken unter Nutzung von BLAST (Altschul et al., 1997, National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verglichen, um deren nächsten phylogenetischen Verwandten zu bestimmen und an Hand der erhaltenen Daten phylogenetisch einzuordnen.

Sequenzen mit einer weniger als 90%igen Ähnlichkeit zu einer anderen bekannten Sequenz wurden auf Chimärenbildung hin mittels CHIMERA CHECK online Analysis Programm von Ribosomal Database Project II (RDPII Michigan State University Center for Microbial Diversity, Maidak et al., 2000; <http://rdpe.cme.msu.edu>) untersucht.

Die Erstellung des Alignments der erhaltenen Sequenzen und der Sequenzen der nächsten Verwandten (<http://www.ebi.ac.uk>, EMBL (European Molecular Biology Laboratorie) und die Erstellung von Dendrogrammen erfolgte unter Verwendung der BioEdit Version 5.0.9 erweitert durch ausgewählte PHYLIP Software package Module v.3.5 (Felsenstein, 1993). Zur Erstellung der phylogenetischen Dendrogramme wurden die Jukes&Cantor Distanzkalkulation und die „neighbor-joining“ Clusteranalyse („Distanz-Matrix“) angewandt. Mittels Tree View (Win32) 1.6.1 wurden die Dendrogramme veranschaulicht.

Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen wurden in die EMBL Nucleotide Sequence Database aufgenommen. Deren Accession Nummern sind im Ergebnisteil aufgeführt.

3 Ergebnisse

Es wurde die bakterielle Diversität in drei Bodenproben unterschiedlicher Herkunft, die in Material und Methoden beschrieben sind, mittels molekulargenetischer 16S rDNA-Analyse untersucht. Von der isolierten Gesamt-DNA wurden die 16S rDNA-Fragmente mittels PCR unter Verwendung der universellen Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} amplifiziert und kloniert. Die Inserts der Klone wurden mittels RFLP analysiert und ein Vertreter aller RFLP-Typen, die mehr als einmal in der Klonbibliothek vertreten waren, wurde sequenziert.

3.1 Haberlandhalde Johanngeorgenstadt

3.1.1 Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe JG37 und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone

Die Isolierung der Gesamt-DNA wurde von Gudrun Kampf (Institut für Radiochemie, Forschungszentrum Rossendorf) durchgeführt und 12 g Boden dafür verwendet. Von der Autorin wurde die PCR zur Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente mit verschiedenen DNA-Verdünnungsstufen angefertigt (1: 20 bis 1:2000), um die optimale DNA-Konzentration für die PCR festzustellen. In der DNA-Lösung können sich noch eine Reihe von Inhibitoren wie z.B. Huminstoffe oder Metalle befinden, deren Einfluss durch die Verdünnung reduziert wird. Außerdem wird durch die Verdünnung der DNA die Möglichkeit der Chimärenbildung minimiert (Qiu et al., 2001). Für die Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente wurde eine PCR mit einer 1:300 verdünnten DNA-Lösung durchgeführt. Für die Klonierung wurden 4 µl dieses PCR-Produktes eingesetzt und eine Klonbibliothek mit 150 Klonen angefertigt (Kapitel 2.6). Die Klone bekamen die Bezeichnung JG37-AG-Klonnummer (1-150). Bei der Überprüfung der Größe der Inserts mittels *in situ* PCR mit den Primern M13(-40)f und M13r (Kapitel 2.7) konnte auch nach mehrmaligen Versuchen von den vier Klonen JG37-AG-49, JG37-AG-51, JG37-AG-72 und JG37-AG-100 kein PCR-Produkt erzeugt werden.

Somit wurde die RFLP-Analyse (Kapitel 2.8) nur mit 146 Klonen durchgeführt. Zunächst wurde der Verdau der PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym *MspI* durchgeführt, welches innerhalb der Erkennungssequenz 5'-C[↓]CGG-3' schneidet. Beim Vergleich der RFLP-Profile traten 24 RFLP-Typen mehr als einmal in der Klonbibliothek auf. 80 Klone konnten den 24

RFLP-Typen zugeordnet werden. Die restlichen 66 Klone verfügten über individuelle Profile. Der Verdau mit nur einem Enzym reicht nicht immer aus, um ähnliche Sequenzen voneinander zu unterscheiden. Aufgrund dessen wurde noch ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* durchgeführt (Kapitel 2.8). Diesmal wurden die Klone mit gleichem oder ähnlichem *MspI*-Profil nebeneinander aufgetragen, um vorhandene Unterschiede zwischen den Profilen besser zu erkennen. Ein Beispiel dafür zeigt die Abb. 3.1.

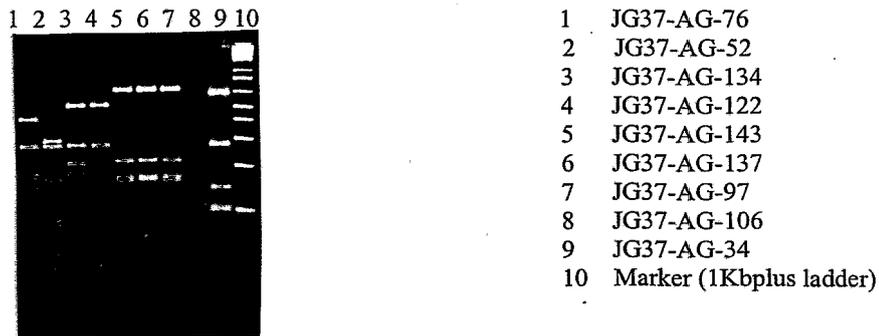


Abb. 3.1: RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* (Bodenprobe JG37)

Die Klone, deren Inserts gleiche *HaeIII*- und *MspI*-Profile erzeugten, wurden zu RFLP-Gruppen zusammengefasst. Insgesamt konnten 21 RFLP-Gruppen gebildet werden. Manche Klone hatten gleiche *MspI*-Profile, aber unterschiedliche *HaeIII*-Profile und die Inserts anderer Klone erzeugten unterschiedliche *MspI*, aber gleiche *HaeIII*-Profile. Diese Sequenzen der Inserts sind zu den Sequenzen einer RFLP-Gruppe ähnlich, aber nicht identisch.

3.1.2 Vollständige Analyse der erhaltenen 16S rDNA-Fragmente und Erstellung phylogenetischer Dendrogramme

Von der untersuchten Probe JG37 wurde von jeder RFLP-Gruppe das Insert eines Klons sequenziert. Außerdem wurden auch die Inserts aller Klone sequenziert, die nach dem zweiten Verdau ein individuelles RFLP-Profil erzeugten. Damit wurde überprüft, ob für die Beschreibung der bakteriellen Diversität dieser Bodenprobe die Sequenzierung der Inserts der predominantesten Klone ausreichend ist.

Die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen wurden mit den verfügbaren Datenbanken durch die Nutzung von BLAST verglichen, um deren nächsten phylogenetischen Verwandten zu bestimmen (Tab. 3.1). Vertreter von 21 RFLP-Gruppen wurden sequenziert und phylogenetisch eingeordnet. Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen der predominantesten Klone wurden α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien, Vertretern von *Holophaga/Acidobacterium* und

Vertretern von *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteriodes* (CFB) zugeordnet (Tab. 3.1). Die Sequenz des Inserts des Klons JG37-AG-4 konnte keiner bekannten bakteriellen Abteilung zugeordnet werden und gehört offenbar einer neuen Abstammungslinie an.

Tab. 3.1: Zuordnung der predominantesten 16S rDNA Klone der Bodenprobe JG37 der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt¹⁾

Klonbezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
α-Proteobakterien				
JG37-AG-1	AJ518761	10	Uncult. bacterium a13115 (AY102322)	97
			Uncult. bacterium wr0197 (AJ295558)	97
JG37-AG-53	AJ518770	2	Uncult. bacterium a13115 (AY102322)	98
			Uncult. bacterium wr0197 (AJ295558)	97
JG37-AG-6	AJ518763	3	Uncult. sludge bacterium S7 (AF234717)	99
			Uncult. sludge bacterium H29 (AF234692)	99
JG37-AG-11	AJ518764	2	Uncult. Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MND8 (AF292999)	91
			<i>Azospirillum</i> sp. B510 (AB049111)	92
JG37-AG-20	AJ518766	5	Uncult. Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MND8 (AF292999)	93
			<i>Magnetospirillum</i> sp. MSM-4 (Y17390)	90
JG37-AG-102	AJ518774	4	Uncult. Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MND8 (AF292999)	93
			Uncult. sludge bacterium A3 (AF234730)	92
JG37-AG-26	AJ518768	10	Uncult. Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4 (AF292996)	97
			<i>Methylosinus trichosporium</i> KS21 (AJ431385)	95
β-Proteobakterien				
JG37-AG-7	AJ518781	2	Uncult. Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNC9 (AF293007)	97
			Uncult. beta proteobacterium Ccs214 (AY133069)	93
γ-Proteobakterien				
JG37-AG-122	AJ518787	2	<i>Cellvibrio</i> sp. R4069 (AJ289162)	97
			<i>Cellvibrio</i> sp. R4075 (AJ289163)	96
JG37-AG-143	AJ518788	3	<i>Pseudomonas migulae</i> (AY047218)	99
			<i>Pseudomonas</i> sp. ISO1 (AF326376)	99
δ-Proteobakterien				
JG37-AG-106	AJ518797	2	Uncult. bacterium FW35 (AF523970)	92
			<i>Archangium gephyra</i> Ar g2 (AJ233913)	91
JG37-AG-118	AJ518799	2	Uncult. bacterium Q3-6C17 (AY048892)	99
			Uncult. bacterium RA13C9 (AY050607)	93
<i>Holophaga/Acidobacterium</i>				
JG37-AG-5	AJ519364	2	Uncult. bacterium WD244 (AJ292580)	96
			Uncult. bacterium DA052 (Y07646)	95
			Uncult. bacterium KF/GS-JG36-31 (AJ295657)	92
JG37-AG-31	AJ519368	10	Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	96
			Bacterial species 32-10 (Z95710)	95
JG37-AG-112	AJ519387	3	Bacterial species 32-10 (Z95710)	95
			Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	96

Fortsetzung Tab. 3.1

Klonbezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
Holophaga/Acidobacterium				
JG37-AG-117	AJ519389	2	Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	96
			Bacterial species 32-10 (Z95710)	95
JG37-AG-116	AJ519388	2	Uncult. bacterium WD257 (AJ292583)	90
			<i>Acidobacterium</i> sp. WJ7 (AY096034)	90
JG37-AG-126	AJ519390	2	Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	98
			Uncult. bacterium TM1 (X97097)	94
JG37-AG-149	AJ519393	3	Uncult. bacterium 17F9 (AF245036)	98
			Bacterial species 32-21 (Z95714)	98
Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides				
JG37-AG-16	AJ519403	2	Unknown organism type 1863 F006C (X85208)	98
			<i>Riemerella anatipestifer</i> 30/90 (U60104)	95
Neue Abstammungslinie				
JG37-AG-4	AJ519408	3	Unident. thermophilic eubacterium ST 12 (AJ131537)	87
			<i>Desulfotomaculum reducens</i> (U95951)	85

¹⁾ Einordnung basiert auf den nächsten Verwandten, ²⁾ EMBL (European Molecular Biology Laboratorie) <http://www.ebi.ac.uk>, ³⁾ - es werden nur die in der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Untersuchung betrachteten Teile der Gene berücksichtigt

Die meisten predominanten 16S rDNA Klone waren mit den α -Proteobakterien (47%) und *Holophaga/Acidobacterium* (32%) verwandt (Tab. B1).

Das auf der 16S rDNA basierende Dendrogramm (Abb. 3.2) zeigt die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Insertsequenzen der predominanten Klone und deren nächsten phylogenetischen Verwandten und beschreibt in grober Form die bakterielle Diversität dieser Bodenprobe.

Innerhalb der α -Proteobakterien bildeten sich drei Cluster (Abb. 3.2). Die Klone JG37-AG-1, JG37-AG-53 und JG37-AG-26 gehören zu einem Cluster, welches die 16S rDNA-Sequenzen der nicht kultivierten Bakterien wr0197 (Kaiser et al., 2001) und *Methylosinus trichosporium* KS21, eines Methan und Methanol oxidierenden Bakteriums, beinhalten. JG37-AG-6 repräsentierte einen weiteren Klon und zeigte eine 99% Ähnlichkeit zu der Sequenz des nicht kultivierten Schlamm-Bakteriums S7.

Ein großes Cluster bildeten die Klone JG37-AG-11, JG37-AG-20 und JG37-AG-102. Deren 16S rDNA Insertsequenzen waren zu 91-93% zu der 16S rDNA des nicht kultivierten Bakteriums MND8 ähnlich, welches aus eisen- und manganhaltigen Green Bay Sedimenten eines Armes des Lake Michigan, in den USA isoliert wurde und dessen nächster Verwandter zur Schwefel-Oxidation fähig ist (Stein et al., 2001).

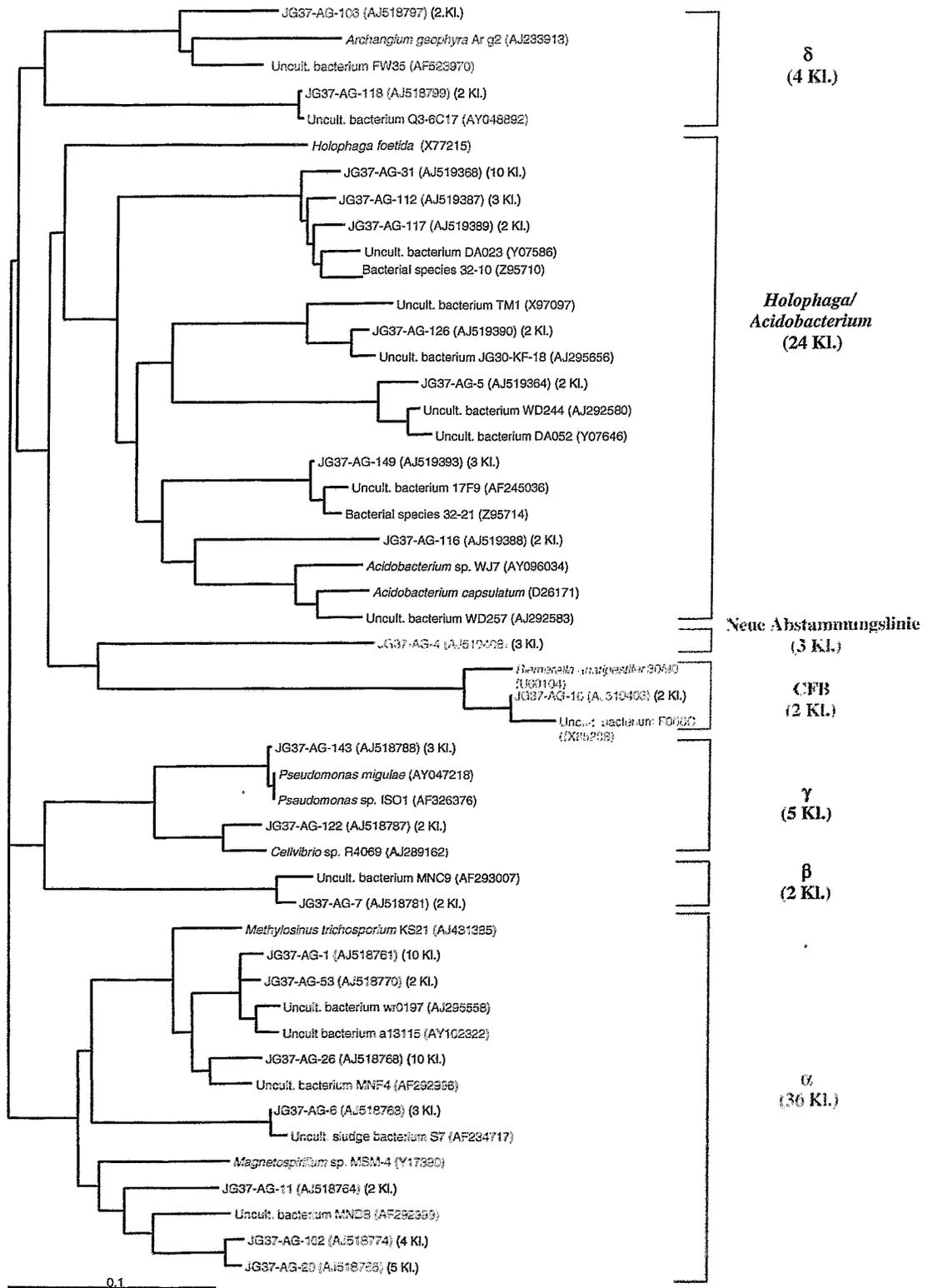


Abb. 3.2: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe JG37 erhaltenen predominantesten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen (Sequenzen der nächsten Verwandten aus EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>), CFB = *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*)

24 Klone wurden Vertretern von *Holophaga/Acidobacterium* zugeordnet. Nur drei kultivierte Stämme wurden bisher in diesem Cluster beschrieben: *Acidobacterium capsulatum* (Hiraishi et al., 1995), *Holophaga foetida* (Liesack et al., 1994) und *Geothrix fermentans* (Lonergan et al., 1996). *Acidobacterium capsulatum* wurde aus einer sauren mineralhaltigen Umgebung und *Holophaga foetida* und *Geothrix fermentans* wurden aus anoxischen Schlammsedimenten isoliert. All diese Spezies und Sequenzen wurden von terrestrischen Umgebungen isoliert und repräsentieren offenbar eine der wichtigsten Gruppen der Bodenbakterien (Felske et al., 1998). In der untersuchten Probe bildeten sich mehrere Cluster (Abb.3.2). Ein Cluster beinhaltete die 16S rDNA Sequenzen der nicht kultivierten Bakterien TM1 (Rheims et al., 1996) und KF-JG30-18. Die 16S rDNA von KF-JG30-18 wurde in der Haberlandhalde in Johannegeorgenstadt identifiziert (Selenska-Pobell et al., 2001). Ein zweites großes Cluster bildete sich um die nicht kultivierten Bakterien DA023 (Felske et al., 1998) und 32-10 (Ludwig et al., 1997). Die anderen beiden Cluster enthielten die Sequenzen der nicht kultivierten Bakterien WD244 (Nogales et al., 2001) und 32-21 (Ludwig et al., 1997). Die Insertsequenz des Klons JG37-AG-116 war entfernt verwandt mit der 16S rDNA Sequenz von *Acidobacterium* sp. WJ7 (90 %) und *Acidobacterium capsulatum*.

β -Proteobakterien waren bei den predominanten Klonen nur durch zwei Klone vertreten. Die Sequenz deren Inserts war zu 97% mit der 16S rDNA Sequenz des nicht kultivierten Bakteriums MNC9 ähnlich, das ebenfalls in eisen- und manganhaltigen Green Bay Sedimenten identifiziert wurde und dessen nächster Verwandter Schwefel oxidieren kann (Stein et al., 2001).

Zu den γ -Proteobakterien gehörten zwei Gruppen von Klonen, die mit *Cellvibrio* sp. R4069 (97%, zwei Klone), einem Cellulose abbauenden Bakterium, und *Pseudomonas* sp. ISO1 (99%, drei Klone), einem Mn(II) oxidierendem Bakterium (Francis & Tebo, 2001), affilierten. Zwei dominante RFLP-Gruppen mit jeweils zwei Klonen gehörten zu den δ -Proteobakterien. Deren Insertsequenzen waren mit nicht kultivierten Bakterien verwandt (Q3-6C17 – Heuer et al., 2002). Die δ -Proteobakterien bestehen hauptsächlich aus sulfat- und metallreduzierenden Bakterien.

Die klonierte 16S rDNA Sequenz von zwei Klonen wurde *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* (CFB) zugeordnet und zeigte eine Ähnlichkeit von 95% zu der 16S rDNA Sequenz des Gram negativen Bakteriums *Riemerella anatipestifer* 30/90

(Subramaniam et al., 1997). Der Klon JG37-AG-4 repräsentierte zwei weitere Klone und konnte keiner bekannten bakteriellen Abteilung zugeordnet werden. Dessen Insertsequenz war nur zu 87% der 16S rDNA des thermophilen nicht kultivierten Bakteriums ST12 (Kengen et al., 1999) und zu 85% der 16S rDNA des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfotomaculum reducens* ähnlich (Tebo & Obratsova, 1998). Bei einer Sequenzähnlichkeit von >92 % besteht eine enge taxonomische Beziehung (Schlötelburg et al., 2000). Bei geringeren Ähnlichkeiten gehören diese Bakterien wahrscheinlich zu neuen Abstammungslinien.

Der Vergleich der Insertsequenzen individueller Klone mit bekannten 16S rDNA Sequenzen brachte ein breites Spektrum an bakterieller Diversität hervor (Tab. B2).

Auch bei den individuellen Klonen zeigten die meisten erhaltenen 16S rDNA Sequenzen eine Verwandtschaft zu *Holophaga/Acidobacterium* (23 Klone) und zu den α -Proteobakterien (12 Klone) (Tab. 3.2). Innerhalb der *Holophaga/Acidobacterium*-Gruppe bildeten sich mehrere kleine Cluster (Abb. 3.3). Ein Cluster beinhaltete wie auch schon bei den dominanten Klonen die 16S rDNA Sequenzen der nicht kultivierten Bakterien TM1 (Rheims et al., 1996) und KF-JG30-18, dessen 16S rDNA ebenfalls in der Haberlandhalde von Johannegeorgenstadt nachgewiesen wurde (Selenska-Pobell et al., 2001). Ein zweites großes Cluster bildete sich um das nicht kultivierte Bakterium DA023, dessen 16S rDNA in einem mit Gras bewachsenem Boden in den Niederlanden identifiziert wurde (Felske et al., 1998). Des Weiteren sind noch die nicht kultivierten Bakterien WD244 (Nogales et al., 2001) und UA3 (Radajewski et al., 2000) zu erwähnen.

Die Klone, deren Insertsequenzen mit den α -Proteobakterien affiliierten, waren zum Teil mit nicht kultivierten Bakterien verwandt. Der individuelle Klon JG37-AG-130 affiliierte ebenfalls mit der 16S rDNA des nicht kultivierten Schlamm-Bakteriums S7, jedoch nur mit einer Ähnlichkeit von 97%. Die Insertsequenz des Klons JG37-AG-3 war zu 93% der 16S rDNA von *Bradyrhizobium* sp. (SH283012) ähnlich. Jeweils ein individueller Klon wurde *Sphingomonas* sp. (JG37-AG-18 (97%)), *Caulobacter* sp. FWC38 (JG37-AG-32 (96%)) und dem Methan und C₁-Verbindungen verwertenden Bakterium *Methylocella palustris* (JG37-AG-107 (94%)) zugeordnet.

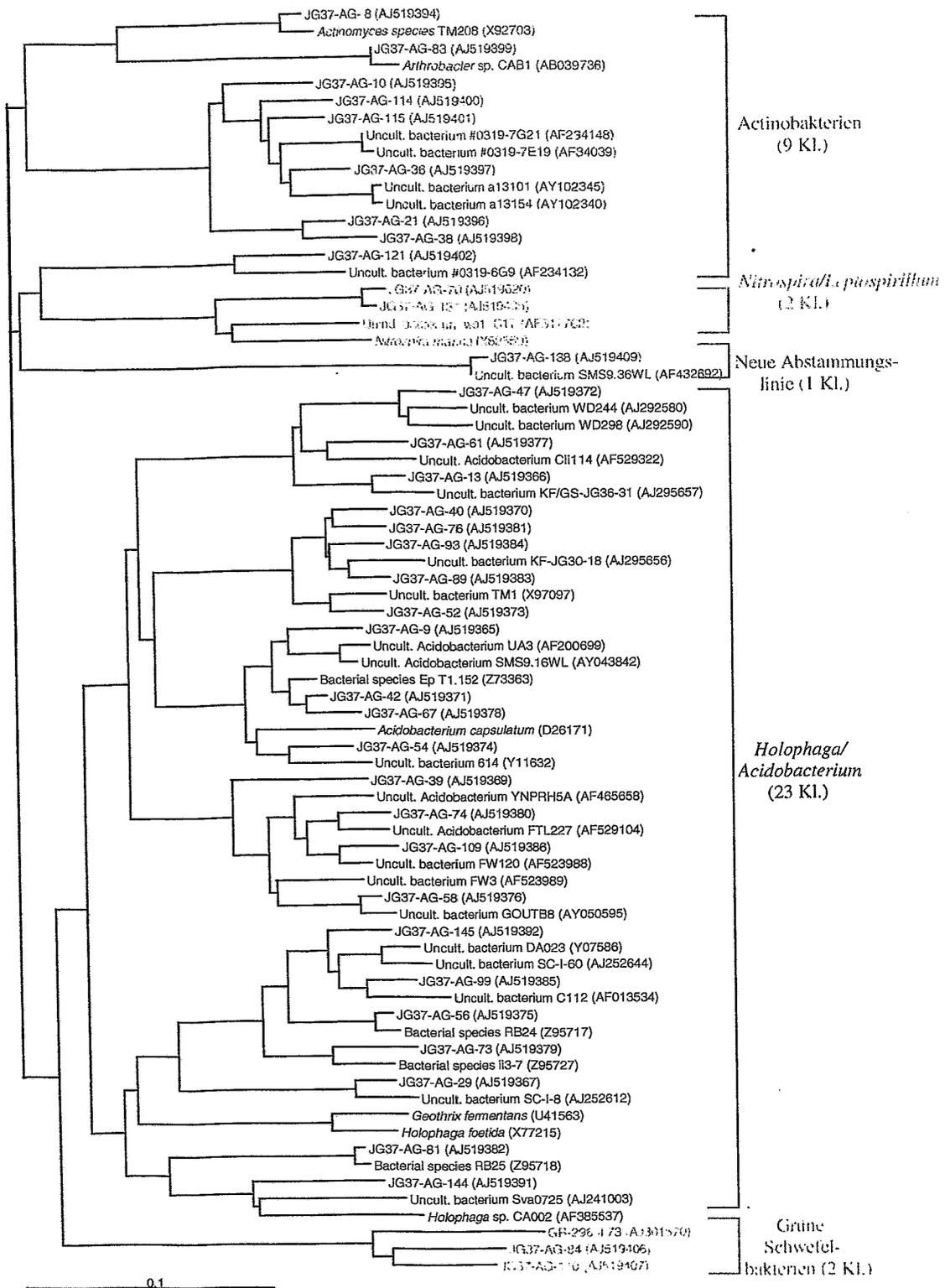


Abb. 3.3: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe JG37 erhaltenen individuellen bakteriellen 16S rDNA Sequenzen, die den Actinobakterien, *Holophaga/Acidobacterium*, grünen Schwefelbakterien und neuen Abstammungslinien zugeordnet wurden (Sequenzen der nächsten Verwandten aus EMBL (European Molecular Biology Laboratory), <http://www.ebi.ac.uk>)

Zwei individuelle Klone wurden der Gruppe der β -Proteobakterien zugeordnet. Die Klone JG37-AG-35 (94%) und JG37-AG-125 (97%) waren phylogenetisch verwandt zu dem nicht kultivierten Bakterium 1326, dessen 16S rDNA in einem landwirtschaftlich genutzten Feld in der Nähe der Universität von Californien identifiziert wurde (Valinsky et al., 2002).

Drei individuelle Klone wurden den γ -Proteobakterien zugeordnet. Zwei davon waren mit nicht kultivierten Bakterien verwandt. Das klonierte 16S rDNA-Fragment des Klons JG37-AG-87 war zu 91% der 16S rDNA Sequenz von *Thiobacillus prosperus* ähnlich.

Von den individuellen Klonen konnten 13 den δ -Proteobakterien zugeordnet werden. Die Inserts waren mit der 16S rDNA der Myxobakterien *Chondromyces languinosus* Sy t2 (JG37-AG-15 – 90%) und *Cystobacter fuscus* Cb f6 (JG37-AG-82 – 92%) (Spröer et al., 1999), sowie des nicht kultivierten Bakteriums FukuN9 (JG37-AG-139 – 97%) (Glöckner et al., 2000) verwandt. Zwei individuelle Klone zeigten nur geringe Ähnlichkeiten zu den schwefelreduzierenden Bakterien *Geobacter sulfurreducens* (Caccavo et al., 1994, JG37-AG-128) und *Desulfuromonas acetexigens* (Lovley et al., 1995, JG37-AG-133). Ein individueller Klon (JG37-AG-150) wurde CFB zugeordnet und war mit nicht kultivierten Bakterien verwandt.

Bei der Analyse der individuellen Klone wurden zusätzlich Actinobakterien, *Nitrospira/Leptospirillum* und grüne schwefelfreie Bakterien identifiziert.

Die Sequenz der Inserts der Klone JG37-AG-7 und JG37-AG-131 war zu mindestens 92% der 16S rDNA von *Nitrospira marina*, einem Nitrit oxidierendem Bakterium, ähnlich.

Die Actinobakterien wurden durch neun individuelle Klone repräsentiert, welche ein eigenes Cluster im Dendrogramm bildeten (Abb. 3.3). Die Insertsequenz des Klons JG37-AG-8 war zu 99% der 16S rDNA Sequenz von *Actinomyces* speziez TM208 ähnlich. Der Klon JG37-AG-83 war mit *Arthrobacter* sp. CAB1 (99%), einem häufigen Bodenbakterium, verwandt. Diese beiden Klone bildeten mit ihren nächsten Verwandten eigene Cluster innerhalb der Abteilung der Actinobakterien. Die anderen Individuellen dieser bakteriellen Abteilung affiliierten mit nicht kultivierten Bakterien (#0319-7G21 (Holmes et al., 2000) und a13101) und bildeten ein eigenes Cluster im Dendrogramm (Abb. 3.3).

Die Klone JG37-AG-84 und JG37-AG-110 enthielten Inserts, die mit mindestens 92% zu der 16S rDNA Sequenz des nicht kultivierten Bakteriums GR-296.II.73 ähnlich waren, welches in

Wasserproben des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz nachgewiesen wurde (Selenska-Pobell, 2002).

Die Insertsequenz des Klons JG37-AG-138 war der 16S rDNA Teilsequenz (500 bp) des nicht kultivierten Bakteriums SMS9.36WL (Axelrood et al., 2002) zu 99% ähnlich. Dieses Teilstück der 16S rDNA wurde aus einem mineralischen Waldboden in Kanada isoliert und konnte nach den Angaben der Autoren (Axelrood et al., 2002) keiner bekannten bakteriellen Abteilung zugeordnet werden. Die 16S rDNA Sequenzen der nicht kultivierten Bakterien JG37-AG-138 und SMS9.36WL repräsentieren offenbar eine neue Abstammungslinie (Abb. 3.3).

Die Insertsequenz des Klons JG37-AG-28 wurde mittels CHIMERA CHECK Software als Sequenzchimäre charakterisiert, da ein Teil dieser Sequenz zu den α -Proteobakterien und der andere Teil zu *Holophaga/Acidobacterium* ähnlich war. Bei der Insertsequenz des Klons JG37-AG-141 kann es sich um eine Chimäre zweier α -Proteobakterien oder ein neues α -Proteobakterium handeln. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es doch eine Chimäre ist und wurde deshalb als mögliche Chimäre gekennzeichnet.

Tab. 3.2: Anzahl der Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37

	Proteobakterien				<i>Holophaga/ Acidobacterium</i>	CFB ¹⁾	Neue Ab- stammungs- linie	Actino- bakterien	Grüne Schwefel- bakterien	<i>Nitrospira/ Lepto- spirillum</i>
	α	β	γ	δ						
Predom. Kl. ²⁾	36	2	5	4	24	2	3	0	0	0
Indiv. Kl. ³⁾	12	2	3	13	23	1	1	9	2	2
Summe	48	4	8	17	47	3	4	9	2	2
%	33	3	6	12	33	2	3	6	1	1

¹⁾ Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides ²⁾ dominante Klone ³⁾ individuelle Klone

Insgesamt wurde der Großteil der erhaltenen 16S rDNA-Fragmente dieser Bodenprobe den α -Proteobakterien (33%) und *Holophaga/Acidobacterium* (33%) zugeordnet (Tab. 3.2, Abb. 3.4). Die dritte große Gruppe umfassten die δ -Proteobakterien mit einem Anteil von 12%, wobei vor allem individuelle Klone dazu zählten.

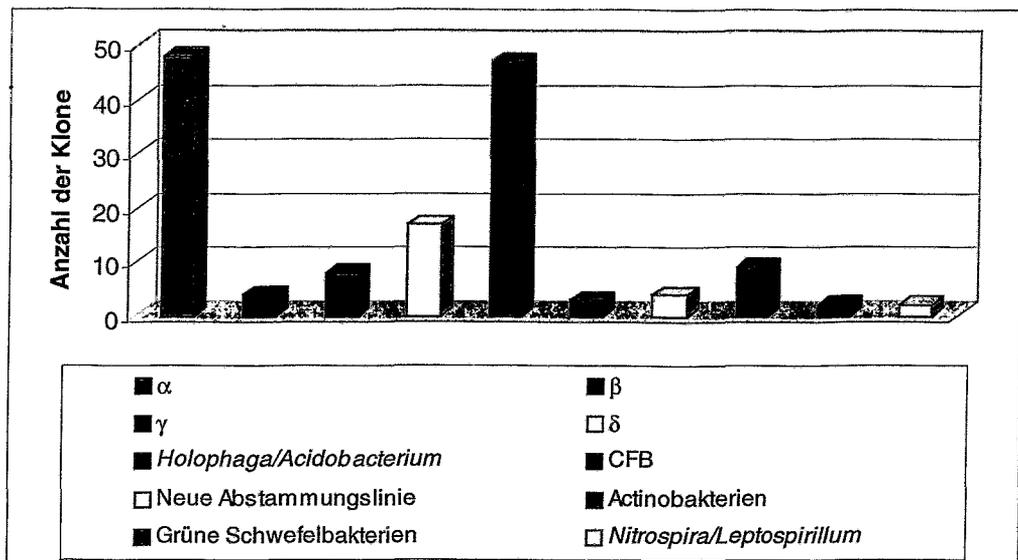


Abb. 3.4: Anzahl der Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37

3.2 Uran „mill tailings“ Gunnison

3.2.1 Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe GUBH2 und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus der Bodenprobe GUBH2 wurde von Gudrun Kampf (Institut für Radiochemie, FZR Rossendorf) durchgeführt und es wurden 12 g Boden dafür verwendet. Die PCR der 16S rDNA-Fragmente wurde mit verschiedenen DNA-Verdünnungsstufen angefertigt. Die Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente wurde mit einer DNA-Verdünnungsstufe von 1:150 durchgeführt und 3 μ l des entstandenen PCR-Produktes wurden für die Klonierung eingesetzt, die am 10.10.2000 von Anja Duda (FZR Rossendorf) durchgeführt wurde. Insgesamt wurden bei der Klonierung 139 weiße Kolonien auf neue Agarplatten überimpft. Mittels PCR mit den plasmidspezifischen Primern M13(-40)f und M13r wurde die Größe des Inserts bei jedem Klon getestet (Kapitel 2.7). Bei 32 der 139 Klone wurde dabei kein PCR-Produkt erhalten. Von diesen Klonen wurden keine Glycerolkulturen angefertigt, und sie wurden nicht in der weiteren Analyse betrachtet. Alle anderen Klone erhielten die Bezeichnung GUBH2-Klonnummer.

Die PCR-Produkte von 107 Klonen wurden mit dem Restriktionsenzym *MspI* verdaut und deren RFLP-Muster miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine hohe bakterielle Diversität in Form vieler verschiedener RFLP-Profile. Beim Vergleich der RFLP-Profile konnten

insgesamt 51 Klone 16 RFLP-Typen zugeordnet werden, die mehr als einmal in der Klonbibliothek vorhanden waren. Die Inserts der anderen 56 Klone erzeugten individuelle RFLP-Profile. Als nächstes wurden die PCR-Produkte aller 107 Klone mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* verdaut, das innerhalb der Erkennungssequenz 5'-GG[↓]CC-3' schneidet. Es wurden alle Vertreter der *MspI*-Gruppen nebeneinander aufgetragen, um mögliche Unterschiede zwischen den Profilen besser zu erkennen. Die Inserts einiger Klone mit dominantem *MspI*-Profil erzeugten aber individuelle *HaeIII*-Profile. Die Klone deren Inserts gleiche *MspI*- und *HaeIII*-Profile erzeugten, wurden zu RFLP-Gruppen zusammengefasst.

3.2.2 Sequenzanalyse und Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft der erhaltenen predominanten 16S rDNA-Fragmente

Es wurde jeweils ein Vertreter jeder RFLP-Gruppe sequenziert. Außerdem wurden noch vier Klone sequenziert, die individuelle *HaeIII*-Profile erzeugten, aber deren *MspI*-Profil einem dominanten RFLP-Typ zugeordnet wurde. Es wurden insgesamt die Inserts von 21 Klonen sequenziert und phylogenetisch analysiert. 11 Klone wurden von Anja Duda (FZR Rossendorf) sequenziert. Diese Klone bekamen die Bezeichnung GUBH2-AD-Klonnummer. Anhand des Vergleiches der erhaltenen predominanten 16S rDNA-Sequenzen mit denen der Datenbank (BLAST) konnten die Klone den α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien, *Holophaga/Acidobacterium* und *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteriodes* zugeordnet werden (Tab. 3.3). Die Sequenzen der Inserts einiger Klone waren mit einer neu definierten bakteriellen Abteilung „Candidate Division OP8“ (Hugenholtz et al., 1998a) verwandt oder gehörten neuen Abstammungslinien an.

Tab. 3.3: Zuordnung der predominanten 16S rDNA Klone der Bodenprobe GUBH2 des Uran „mill tailings“ Gunnison¹⁾

Klon-bezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
			α-Proteobakterien	
GUBH2-AD-10	AJ519651	1	Uncult. Green Bay ferromanganous MNG7 (AF292997)	97
			<i>Nordella oligomobilis</i> (AF234750)	94
GUBH2-AD-23	AJ519652	3	<i>Phaeospirillum fulvum</i> S3 (AF508113)	91
			Uncult. Green Bay ferromanganous MNG3 (AF29300)	92
GUBH2-AG-57	AJ519653	2	Uncult. bacterium mle1-4 (AF280843)	91
			<i>Sandaracinobacter sibiricus</i> (Y10678)	92
GUBH2-AD-69	AJ519654	2	Uncult. bacterium LO13.3 (AF358017)	96
			<i>Methylosinus sporium</i> SE2 (AJ458478)	94

Klon-bezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
β-Proteobakterien				
GUBH2-AD-29	AJ519655	1	Uncult. bacterium RB9C3 (AF407394)	99
GUBH2-AG-43	AJ519656	2	<i>Dechloromonas</i> sp. JJ (AY032611)	90
			Uncult. beta proteobacterium Ccs214 (AY133069)	99
			Uncult. bacterium RB9C3 (AF407394)	98
γ-Proteobakterien				
GUBH2-AD/AG-14	AJ519657	12	Glacial ice bacterium G50-TB2 (AF479352)	99,7
			<i>Acinetobacter radioresistens</i> M 17694T (Z93445)	99,7
GUBH2-AD-31	AJ519658	4	Agricultural soil bacterium SC-I-15 (AJ252618)	94
			Agricultural soil bacterium SC-I-71 (AJ252651)	93
GUBH2-AD-51	AJ519659	3	<i>Acinetobacter radioresistens</i> M 17694T (Z93445)	99,8
			Glacial ice bacterium G50-TB2 (AF479352)	99,8
GUBH2-AG-52	AJ519660	2	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 (AJ249382)	99
			Uncult. gamma proteobacterium FTL244 (AF529107)	99
GUBH2-AG-72	AJ519661	2	Glacial ice bacterium G50-TB2 (AF479352)	99,8
			<i>Acinetobacter radioresistens</i> M 17694T (Z93445)	99,8
GUBH2-AG-107	AJ519662	1	Uncult. bacterium HTB10 (AF418945)	97
			<i>Lysobacter</i> sp. XL1 (AF472556)	94
δ-Proteobakterien				
GUBH2-AD/TzT-67	AJ519663	1	Uncult. bacterium BPC076 (AF154096)	92
			<i>Syntrophobacter</i> sp. TSU A1 (AJ237605)	89
GUBH2-AG-114	AJ519664	2	<i>Desulfuromonas thiophilia</i> sp. NZ27T ^T (Y11560)	94
			<i>Desulfuromonas acetexigens</i> (U23140)	95
Holophaga/Acidobacterium				
GUBH2-AD-9	AJ519665	2	Uncult. Acidobacterium FTLM5 (AF529125)	95
			<i>Holophaga foetida</i> TMBS4-T (X77215)	94
GUBH2-AD-16	AJ519666	2	Bacterial species 32-10 (Z95710)	96
			Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	95
GUBH2-AG-47	AJ519667	2	Uncult. soil bacterium S1154 (AF507766)	96
			Bacterial species iii1-8 (Z95729)	94
Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides				
GUBH2-AG-59	AJ519668	2	Uncult. bacterium KF-Gitt2-34 (AJ295641)	98
			<i>Pedobacter piscium</i> DSM 11725T (AF414577)	93
Candidate division OP8				
GUBH2-AD-75	AJ519671	3	Uncult. bacterium SHA-89 (AJ249097)	94
			Candidate division OP8 OPB23 (AF027068)	90
Neue Abstammungslinie				
GUBH2-AD-8	AJ519669	2	Uncult. gram-positive bacterium FTL272 (AF529101)	98
			Unident. bacterium wb1_A12 (AF317743)	96
GUBH2-AG-71	AJ519670	2	Uncult. gram-positive bacterium FTL22 (AF529103)	92
			Uncult. bacterium 12-48 (AF351217)	93

¹⁾ Einordnung basiert auf den nächsten Verwandten, ²⁾ EMBL (European Molecular Biology Laboratorie), <http://www.ebi.ac.uk>, ³⁾ - es werden nur die in der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Untersuchung betrachten Teile der Gene berücksichtigt

Die meisten erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen der predominanten Klone wurden im Vergleich zur Probe JG37 den γ -Proteobakterien (45%) zugeordnet (Tab. B3, Abb. 3.5). Die beiden nächsten dominanten Gruppen in der Klonbibliothek umfassten die α -Proteobakterien (15%) und *Holophaga/Acidobacterium* (11%).

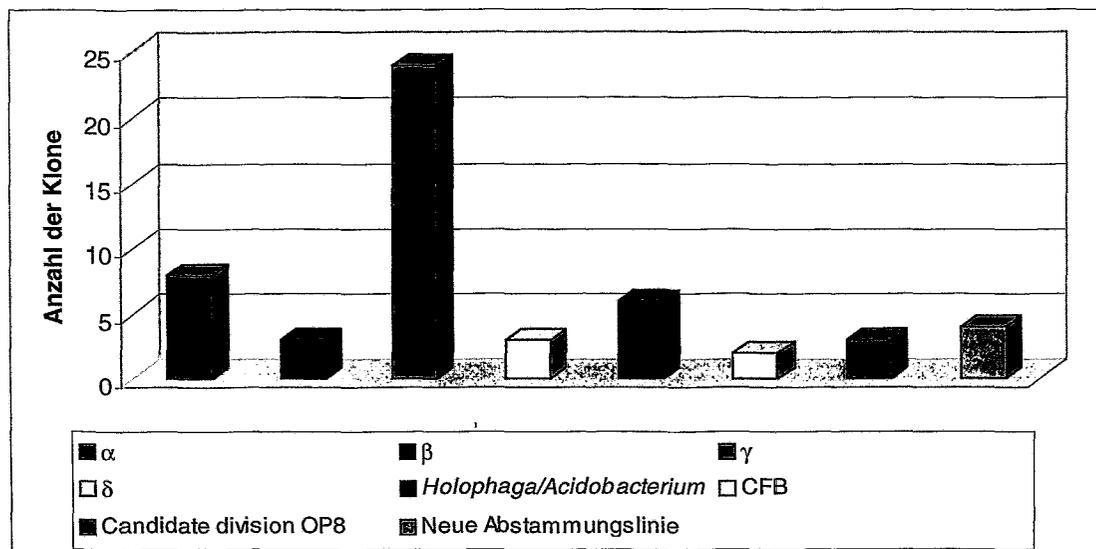


Abb. 3.5: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe GUBH2

Aus allen erhaltenen 16S rDNA Sequenzen und mindestens der 16S rDNA Sequenz des nächsten phylogenetischen Verwandten wurde mit Hilfe der Software von Bioedit (Kapitel 2.10) ein auf der 16S rDNA basierendes Dendrogramm erstellt, welches in grober Form die bakterielle Diversität an diesem Standort beschreibt (Abb. 3.6).

Innerhalb der Gruppe der γ -Proteobakterien bildeten sich vier Cluster (Abb. 3.6). Ein großes Cluster umfasste die Insertsequenzen von drei Klonen, die stellvertretend für 17 Klone standen und eine Ähnlichkeit von 99,7% zu der 16S rDNA Sequenz von *Acinetobacter radioresistens* M17694T, einem strikt aeroben Gram negativen Bakterium (Ibrahim et al., 1997), hatten. Die Insertsequenz des Klons GUBH2-AG-52 war mit der 16S rDNA des Gram negativen Bakteriums *Pseudomonas frederiksbergensis* JAJ28 (Andersen et al., 2000) verwandt (99%). Die 16S rDNA des individuellen Klons GUBH2-AG-107 war phylogenetisch verwandt zu dem nicht kultivierten Bakterium HTB10 (97%) und zu *Lysobacter* sp. XL1 (94%).

Die Insertsequenz des Klons GUBH2-AD-31 affiliierte mit dem nicht kultivierten Bodenbakterium SC-I-15 und bildeten ein eigenes Cluster, welches sehr früh abzweigte (vor den β -Proteobakterien) (Abb. 3.6).

Die zweite große Gruppe umfasste die α -Proteobakterien. Auch hier bildeten sich mehrere kleine Cluster. Ein Cluster bildeten die Klone GUBH2-AD-69 und GUBH2-AD-10 mit ihren nächsten Verwandten, den nicht kultivierten Bakterien LO13.3 (Morris et al., 2002) und MNG7 (Stein et al., 2001). Ein weiteres Cluster bildete der Klon GUBH2-AG-57, dessen Insertsequenz zu 92% der 16S rDNA des Gram negativen, aerob chemoorganotrophen und fakultativ phototrophen Bakteriums *Sandaracinobacter sibiricus* (Yurkov et al., 1997) ähnelte. Die Insertsequenzen der Klone, die *Holophaga/Acidobacterium* zugeordnet wurden, waren vorwiegend mit nicht kultivierten Bakterien verwandt und ergaben mehrere Cluster. Ein Cluster bildeten die auch in der Probe JG37 häufig aufgetretenen nicht kultivierten Bakterien 32-10 (Ludwig et al., 1997) und DA023 (Felske et al., 1998). Das Insert des Klons GUBH2-AD-9 war zu 94% der 16S rDNA des Bakteriums *Holophaga foetida* TMBS4-T ähnlich (Liesack et al., 1994).

Die Klone der δ -Proteobakterien waren verwandt zu *Synthrobacter* sp. TSU A1 (89%) und dem acetatoxidierendem und schwefelreduzierendem Bakterium *Desulfuromonas thiophilia* NZ27^T (94%) (Finster et al., 1997).

Der Klon GUBH2-AG-59 zeigte eine hohe Ähnlichkeit (98%) zu einem nicht kultivierten Bakterium (KF-Gitt2-34), dessen 16S rDNA in der Deponie 1 des Uran „mill tailing“ Gittersee/Coschütz nachgewiesen wurde (Selenska-Pobell et al., 2002).

Alle anderen erhaltenen Sequenzen wurden neuen Abstammungslinien zugeordnet und bildeten eigene Cluster im Dendrogramm (Abb. 3.6). Die Insertsequenz des Klons GUBH2-AD-8 war verwandt mit dem nicht kultivierten Bakterium wb1_A12, welches ebenfalls einer neuen Abstammungslinie zugeordnet wurde (Holmes et al., 2001).

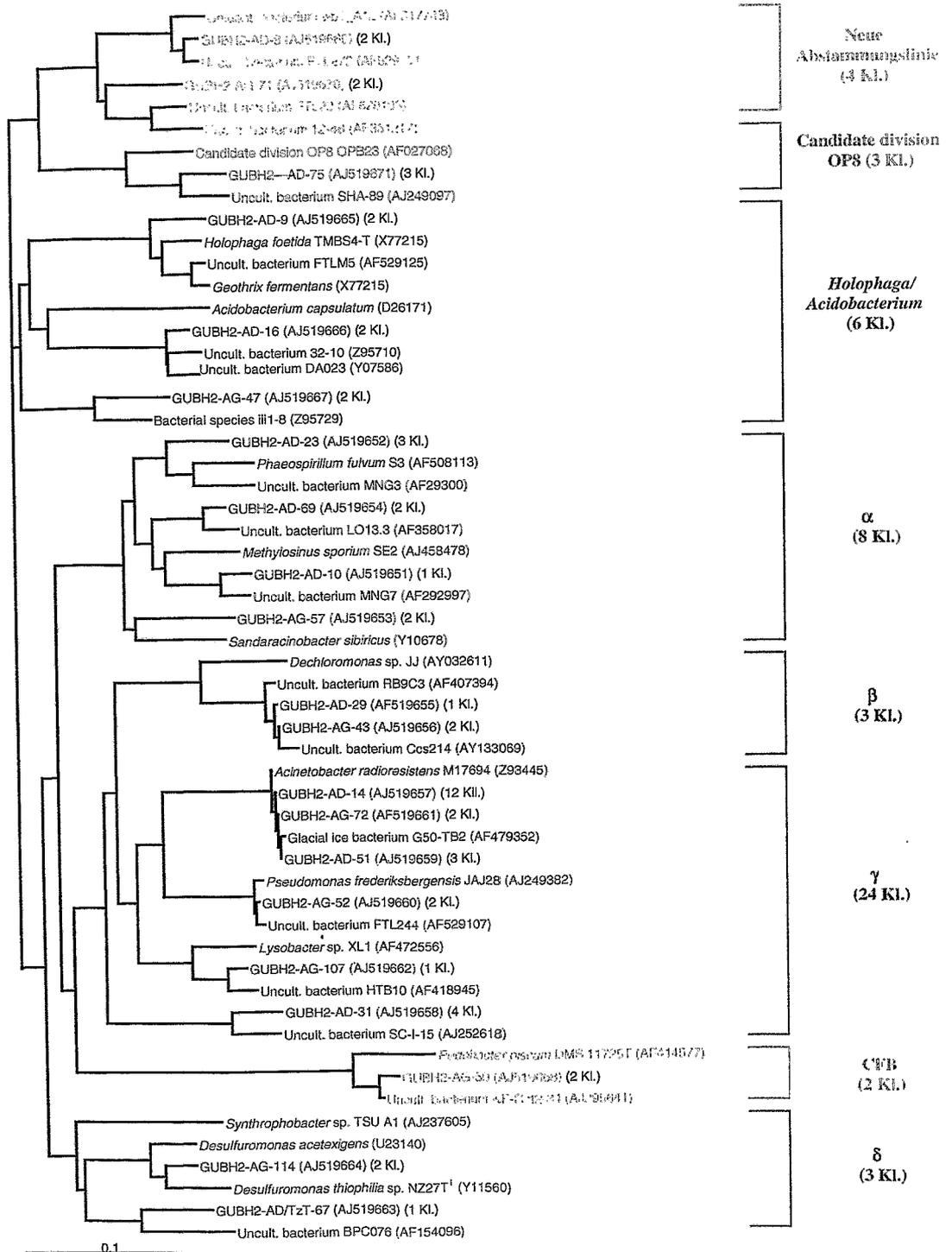


Abb. 3.6: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe GUBH2 erhaltenen predominantesten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen (Sequenzen der nächsten Verwandten aus EMBL (European Molecular Biology Laboratorie, <http://www.ebi.ac.uk>), CFB = *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*)

3.3 Uran „mill tailings“ Shiprock

3.3.1 Erstellung einer 16S rDNA Klonbibliothek von der Bodenprobe Sh765B und RFLP-Typisierung der erhaltenen Klone

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus der Bodenprobe Sh765B wurde ebenfalls von Gudrun Kampf durchgeführt. Sie verwendete dafür 29 g Boden. Für die Klonierung wurde die Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente mit einer DNA-Verdünnungsstufe von 1:150 durchgeführt.

Wie bereits schon in Kapitel 2.4 erwähnt, wurde für die Klonierung dieser Probe der sogenannte degenerierte 16S_(deg.43f) Primer (5'-(ACT)(AG)(GT)GC(GCT)T(AT)A(GCT)(AG)CATGCAAGTC-3') verwendet. Dieser Primer wurde aufgrund der Ergebnisse von Marchesi et al. (1998) konstruiert. Die Klonierung wurde von Tzvetelina Tzvetkova durchgeführt und 130 weiße Kolonien wurden auf neue Agarplatten überimpft und analysiert (Kapitel 2.6). Die Klone erhielten die Bezeichnung Sh765B-Klonnummer (1-140). Von fünf Klonen (Sh765B-71, Sh765B-98, Sh765B-115, Sh765B-133, Sh765B-138) konnte mit den plasmidspezifischen Primern kein PCR-Produkt erzeugt werden. Daraufhin wurde die weitere Analyse mit 125 Klonen durchgeführt.

Beim Verdau der Inserts mit dem Restriktionsenzym *MspI* konnten 60 der 125 Klone 20 verschiedenen RFLP-Typen zugeordnet werden und 65 Klone verfügten über ein individuelles RFLP-Profil. Von den Klonen, von denen keine Glycerolkultur angefertigt wurde, aber noch restliches PCR-Produkt oder quasi leere PCR-Tubes vorhanden waren, wurde eine Reamplifizierung des PCR-Produktes durchgeführt. Das restliche PCR-Produkt wurde 1:10 verdünnt und 1 µl davon wurde zu der in Kapitel 2.7 beschriebenen PCR-Mischung gegeben (Primer 0,5 µl). In das quasi leere PCR-Tube wurden 19 µl der PCR-Mischung gegeben. Auf diese Art und Weise war es meist möglich das PCR-Produkt zu vervielfältigen. Beim Verdau der PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* erzeugten einige Klone mit einem dominanten *MspI*-Profil ein individuelles *HaeIII*-Profil. Insgesamt wurden mehr individuelle *HaeIII*-Profile beobachtet.

3.3.2 Sequenzanalyse und Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft der erhaltenen predominantesten 16S rDNA-Fragmente

Wie auch schon bei der Probe GUBH2 wurde jeweils ein Vertreter der RFLP-Gruppen sequenziert. Außerdem wurden noch all die Klone sequenziert, deren Insertsequenzen ein

dominantes *MspI*-Profil erzeugten, aber über ein individuelles *HaeIII*-Profil verfügten. Aufgrund der Verwendung des 16S_{deg. 43f} bei der Klonierung war eine Sequenzierung mit dem 16S_{43f} Primer nicht möglich. Deshalb wurde bei dieser Probe mit den plasmidspezifischen Primern PE-T7 und PE-Sp6, sowie Primer 16S_{342f} sequenziert (Kapitel 2.9). 17 der 30 Inserts wurden von Tzvetelina Tzetkova sequenziert und als Sh765B-TzT-Klonnummer gekennzeichnet.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von BLAST identifiziert (Kapitel 2.10). Die Ergebnisse zeigten ein breites Spektrum an bakterieller Diversität (Tab. 3.4). Die meisten erhaltenen predominantesten 16S rDNA Sequenzen waren im Gegensatz zu den anderen Proben den 16S rDNA Sequenzen von *Bacilli* (31%), grünen schwefelfreien Bakterien (17%) und γ -Proteobakterien (17%) ähnlich (Tab. B4, Abb. 3.7). Nur sehr wenige Klone konnten den α -Proteobakterien und *Holophaga/Acidobacterium* zugeordnet werden.

Tab.3.4: Zuordnung der predominantesten 16S rDNA Klone der Bodenprobe Sh765B des Uran „mill tailings“ Shiprock¹⁾

Klon-bezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
α-Proteobakterien				
Sh765B-TzT-3	AJ519622	2	<i>Methylobacterium</i> sp. BF10 (Z23156)	94
			<i>Methylobacterium</i> sp. GK118 (D25306)	94
Sh765B-TzT-31	AJ519623	2	Uncult. rape rhizosphere bacterium wr0007 (AJ295468)	98
			Uncult. rape rhizosphere bacterium wr0200 (AJ295561)	98
β- Proteobakterien				
Sh765B-TzT-132	AJ519624	1	Uncult. beta proteobacterium PRD01a011B (AF289159)	92
			<i>Azoarcus oryzae</i> (AF011351)	92
γ- Proteobakterien				
Sh765B-AG-8	AJ519625	1	<i>Pseudomonas</i> sp. NMX (AF482285)	98
			Uncult. <i>Pseudomonas</i> sp. KF/GS-Gitt2-53 (AJ295645)	98
Sh765B-TzT-13	AJ519626	4	<i>Psychromonas antarcticus</i> (Y14697)	99
			Gas vacuolate str. 90-P1 (U14582)	98
Sh765B-TzT-48	AJ519627	2	<i>Psychromonas antarcticus</i> (Y14697)	98
			Gas vacuolate str. 174 (U73722)	98
Sh765B-TzT-54	AJ519629	1	<i>Psychromonas antarcticus</i> (Y14697)	98
			Gas vacuolate str. 174 (U73722)	98
Sh765B-TzT-52	AJ519628	2	Uncult. gamma proteobacterium BioIuz K32 (AF324537)	99,7
			<i>Acinetobacter</i> sp. V4.MB.25 (AY055373)	99,6

Klon-bezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
δ-Proteobakterien				
Sh765B-TzT-29	AJ519630	2	<i>Geobacter pelophilus</i> (U96918)	91
			<i>Geobacter bremsensis</i> (Y18947)	91
Sh765B-TzT-42	AJ519631	2	Uncult. delta proteobacterium Sva0679 (AJ241020)	91
			<i>Halangium tepidum</i> (AB062751)	90
Sh765B-AG-71	AJ519632	1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-17 (AJ252620)	93
			Agricultural soil bacterium clone SC-I-29 (AJ252629)	92
Holophaga/Acidobacterium				
Sh765B-AG-82	AJ519640	2	Uncult. bacterium KF/GS-JG36-31 (AJ295657)	93
			Uncult. bacterium WD2123 (AJ292573)	92
Bacilli				
Sh765B-AG-2	AJ519633	2	<i>Planococcus mcmeekinii</i> (AF041791)	99
			Glacial ice bacterium G50-TS4 (AF479357)	99
Sh765B-TzT-10	AJ519634	5	<i>Bacillus</i> sp. LMG-19415 (AJ276809)	99
			Uncult. soil bacterium clone 720-1 (AF423288)	98
Sh765B-TzT-27	AJ519635	3	Glacial ice bacterium G500K-19 (AF479330)	99
			<i>Bacillus</i> sp. MK03 (AB062678)	99
Sh765B-TzT-30	AJ519636	3	<i>Bacillus</i> sp. LMG 20241 (AJ316313)	99
			<i>Bacillus niacini</i> IF0 15566 (AB021194)	99
Sh765B-AG-44	AJ519637	3	<i>Bacillus</i> sp. MB-11 (AF326360)	97
			Bacterium LMG 18435 (AJ250318)	96
Sh765B-TzT-70	AJ519638	2	<i>Bacillus</i> sp. PL-26 (AF326369)	97
			Uncult. soil bacterium 432-1 (AF423263)	96
Actinobakterien				
Sh765B-AG-45	AJ519639	2	Uncult. bacterium #0319-6G9 (AF234132)	92
			Uncult. soil bacterium S0209 (AF507546)	94
Grüne schwefelfreie Bakterien				
Sh765B-TzT/AG-5	AJ519641	2	Uncult. hydrocarbon seep bacterium BPC110 (AF154084)	95
			Uncult. hydrocarbon seep bacterium GCA112 (AF154100)	92
Sh765B-TzT-6	AJ519642	2	Uncult. bacterium GIF3 (AF407195)	93
			Uncult. bacterium MB-C2-126 (AY093479)	92
Sh765B-TzT-20	AJ519643	1	Uncult. bacterium H1.4.f (AF005745)	92
			Uncult. bacterium MB-A2-110 (AY093464)	92
Sh765B-AG-22	AJ519644	1	Uncult. bacterium SHA-31 (AJ306745)	91
			Uncult. bacterium BA068 (AF306745)	90
Sh765B-AG-72	AJ519645	2	Uncult. bacterium H1.4.f (AF005745)	93
			Uncult. bacterium MB-C2-126 (AY093479)	92
Sh765B-AG-111	AJ519646	1	Uncult. bacterium t0.6.f (AF005745)	94
			Uncult. bacterium MB-C2-126 (AY093479)	94
Sh765B-AG-130	AJ519647	1	Uncult. bacterium MB-A2-110 (AY093464)	92
			Uncult. bacterium H1.4.f (AF005745)	91
Candidate division OP11				
Sh765B-AG-14	AJ519648	1	Candidate division OP11 Opd3 (AF047562)	88
			Unident. bacterium BD7-4 (AB015580)	86

Fortsetzung Tab. 3.4

Klon-bezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	BLAST % Ähnlichkeit ³⁾
<i>Nitrospira</i> ähnlich				
Sh765B-TzT-26	AJ519621	2	Uncult. bacterium FW15 (AF523972)	92
			Uncult. <i>Nitrospira</i> sp. 4-29 (AF351231)	91
Sh765B-TzT-35	AJ519650	1	Uncult. Gram-positive bacterium FTL22 (AF529103)	91
			Uncult. delta Proteobacterium OPS22 (AF026994)	87
<i>Planctomycetales</i>				
Sh765B-TzT/AG-34	AJ519649	2	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a (AJ250882)	90
			<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i> (AF375995)	90

¹⁾ Einordnung basiert auf den nächsten Verwandten, ²⁾ EMBL (European Molecular Biology Laboratorie) <http://www.ebi.ac.uk>, ³⁾ - es werden nur die in der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Untersuchung betrachteten Teile der Gene berücksichtigt

Nur wenige Insertsequenzen wurden den β - und den δ -Proteobakterien zugeordnet (Abb. 3.7). Im Gegensatz zu den anderen Proben zeigten erhaltene 16S rDNA Sequenzen geringe Ähnlichkeiten zu den 16S rDNA Sequenzen einer neu beschriebenen „Candidate Division OP11“ (Sh765B-AG-14, 88%) und *Planctomycetales* (Sh765B-TzT-34).

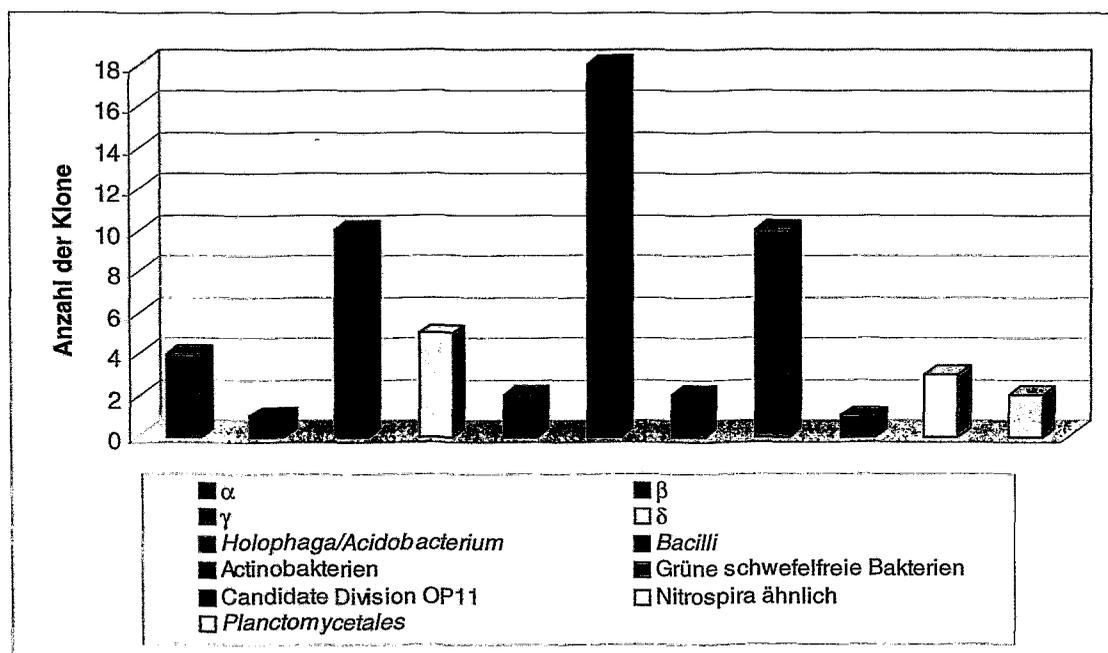


Abb. 3.7: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe Sh765B

Mit allen Insertsequenzen der predominanten Klone und den 16S rDNA Sequenzen deren nächsten phylogenetischen Verwandten wurde unter der Verwendung der Software von Bioedit (Kapitel 2.10) ein Dendrogramm erstellt, welches grob die bakterielle Diversität an diesem Standort beschreibt (Abb. 3.8).

Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen die *Bacilli* zugeordnet wurden, zeigten große Ähnlichkeiten (97-99%) zu einer Reihe von *Bacillus* sp. Stämmen und *Planococcus mcmeekinii*. Das sporenbildende Bakterium *Bacillus* sp. PL26 oxidiert beispielsweise lösliches Mn(II) zu unlöslichen Mn(IV)-Oxiden und wurde aus marinen Küstensedimenten isoliert (Francis & Tebo, 2002).

Die zweite dominante Gruppe in dieser Klonbibliothek bildeten die grünen schwefelfreien Bakterien. Die Klone Sh765B-TzT-6, Sh765B-TzT-20, Sh765B-AG-72, Sh765B-AG-111 und Sh765B-AG-130 bildeten ein Cluster, welches die nicht kultivierten Bakterien t0.6f, H1.4.f (Chandler et al., 1998), MB-C2-126 und MB-A2-110 (Reed et al., 2002) enthielten. Auch bei den anderen Clustern bestand nur eine Verwandtschaft zu nicht kultivierten Bakterien.

Innerhalb der γ -Proteobakterien bildeten sich drei Cluster. Die Insertsequenzen der Klone waren mit der 16S rDNA der kultivierten Bakterien *Psychromonas antarcticus* (mindestens 98%), *Pseudomonas* sp. NMX (98%) und *Acinetobacter* sp. V4.ME.25 (99,6%) verwandt. Die Insertsequenz des Klons Sh765B-AG-8 war eng verwandt mit der nicht kultivierten *Pseudomonas* sp. KF/GS-Gitt2-53, die in dem Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz identifiziert wurde (Selenska-Pobell et al., 2002) und *Pseudomonas* sp. NMX, welches die Oxidation von reduzierten Huminstoffen mit der Reduktion von Nitrat verbinden kann (Coates et al., 2002).

Die α -Proteobakterien stellten zwei Cluster dar, die zum Einen die 16S rDNA des Methan oxidierenden Bakteriums *Methylobacterium* sp. BF10 (Sh765B-TzT/AG-3) und zum Anderen die des nicht kultivierten Bakteriums wr0007 (Sh765B-TzT-31) einer Rhizosphären-gemeinschaft (Kaiser et al., 2001) beinhalten.

Ein individueller Klon (Sh765B-TzT-132) wurde den β -Proteobakterien zugeordnet. Dessen Insertsequenz war zu 92% der 16S rDNA von *Azoarcus oryzae* (Hurek et al., 1997) ähnlich.

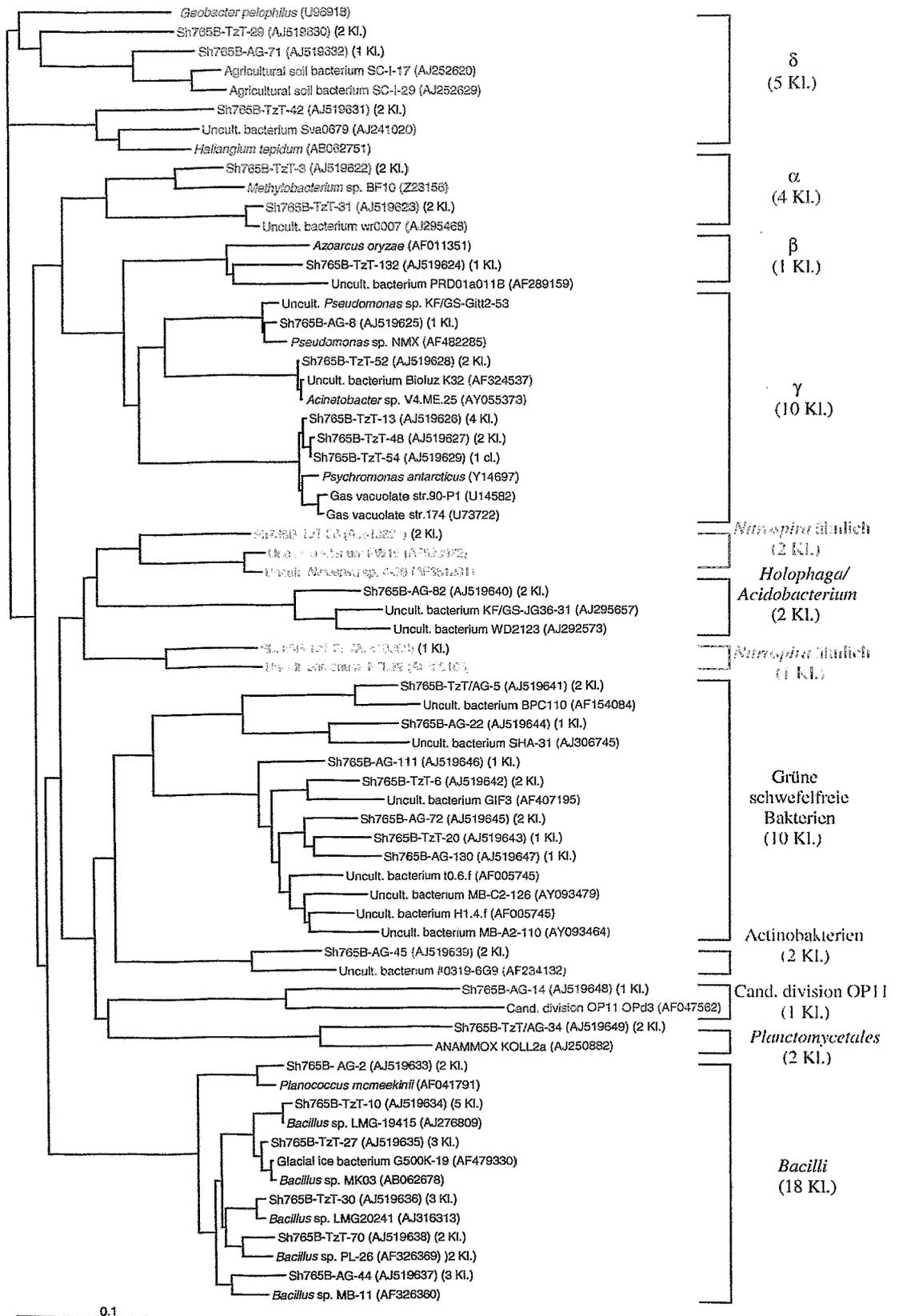


Abb. 3.8: Phylogenetisches Dendrogramm der aus der Bodenprobe Sh765B erhaltenen predominantesten bakteriellen 16S rDNA Sequenzen

Die 16S rDNA Fragmente, die den δ -Proteobakterien zugeordnet wurden, zeigten nur geringe Ähnlichkeiten zu ihren nächsten Verwandten *Geobacter pelophilus* (91%) und *Halangium tepidum* (90%) und bildeten zwei Cluster.

Eine Gruppe mit zwei Klonen (Sh765B-AG-45) wurde den Actinobakterien zugeordnet, die ein eigenes Cluster bildeten.

In dieser Probe wurde die 16S rDNA von *Nitrospira* ähnlichen Sequenzen identifiziert (Sh765B-TzT-26 und Sh765B-TzT-35). Die erhaltene 16S rDNA Sequenz des Klons Sh765B-AG-14 war nur sehr entfernt mit dem nicht kultivierten Bakterium Opd3 der neu beschriebenen „Candidate Division OP11“ (Hugenholtz et al., 1998a) verwandt. Das nicht kultivierte Bakterium Opd3 wurde aus einer heißen Quelle in Yellowstone (USA) identifiziert, wo auch das Fe(III)-reduzierende Bakterium *Geothermobacterium ferrireducens* isoliert wurde (Kashefi et al., 2002). Nur in dieser Bodenprobe wurde ein entfernter Verwandter der anaerob ammoniumoxidierenden Planctomycete KOLL2a nachgewiesen (Sh765B-TzT/AG-34). Die Bakterien dieser Ordnung sind an der anaeroben Oxidation von Ammonium zu molekularem Stickstoff beteiligt (Strous et al., 1999). Vertreter dieser Bakteriengruppe wurden auch in den Drainagewässern von Gittersee nachgewiesen (Selenska-Pobell, 2002).

Diese Klone bildeten mit ihren nächsten Verwandten eigene Cluster im Dendrogramm (Abb. 3.8).

4 Diskussion

4.1 Methodischer Ansatz

Viele der Bakterien, die in extremen Habitaten existieren sind nach dem derzeitigen Stand nicht kultivierbar. Dies liegt in dem limitierten Wissen über deren Nährstoffbedarf und anderen Lebensnotwendigkeiten begründet. Die Verwendung molekulargenetischer Techniken, wie die in-vitro-Amplifizierung, die Klonierung und Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten, ermöglicht eine kultur-unabhängige Charakterisierung komplex zusammengesetzter mikrobieller Gemeinschaften. Die 16S rRNA Gene werden zur phylogenetischen Klassifizierung eingesetzt, da diese Moleküle durch ihre Schlüsselposition in der Proteinsynthese ubiquitär verbreitet sind und deren Primärstruktur über konservierte und variable Bereiche verfügt. Die konservierten Bereiche sind bei einer Vielzahl von Mikroorganismen identisch, wohin gegen die variablen eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Spezies ermöglichen. Der Grad der Übereinstimmung der 16S rRNA-Sequenzen zwischen zwei Organismen zeigt den Grad der relativen Verwandtschaft an (Woese, 1987). Durch die Verwendung von Primern, die an den konservierten Bereichen binden, kann die rDNA nahezu aller bekannten Bakterien und Archaea amplifiziert werden. 16S rDNA Klonbibliotheken werden oft verwendet, um mikrobielle Gemeinschaften aus verschiedenen Habitaten wie z.B. Böden (Kuske et al., 1997), Seesedimenten (Ravenschlag et al., 1999) und heißen Quellen (Hugenholz et al., 1998a) zu untersuchen. Dabei repräsentierten einige 16S rDNA Sequenzen nicht kultivierte Mikroorganismen neuer Abteilungen, für die bisher keine oder wenige kultivierte Vertreter beschrieben wurden (Hugenholz et al., 1998b).

In mit Uran kontaminierten Gebieten wurden bestimmte Bakterienpopulationen wie sulfatreduzierende Bakterien, ammoniakoxidierende β -Proteobakterien und Mitglieder der Familie *Geobacteracea* mittels molekulargenetischer Methoden untersucht (Chang et al., 2001; Holmes et al., 2002; Ivanova et al., 2000). Die Ergebnisse der direkten molekularen Analyse der Diversität der gesamten bakteriellen Gemeinschaften in Boden- und Wasserproben von verschiedenen urankontaminierten Standorten in Deutschland und den USA wurden erst kürzlich veröffentlicht (Flemming et al., 2001; Selenska-Pobell et al., 2001; Selenska-Pobell, 2002; Selenska-Pobell et al., 2002; Tzvetkova et al., 2002).

Um die Analyse der 16S rDNA Klonbibliothek zu beschleunigen und Kosten zu sparen, wurde eine RFLP-Analyse der erhaltenen 16S rDNA-Fragmente mit zwei häufig schneidenden Restriktionsenzymen vorgenommen. Der Verdau mit nur einem Enzym reicht nicht immer aus, um Unterschiede zwischen ähnlichen Sequenzen nachzuweisen. Es wurde jeweils nur ein Vertreter der predominanten RFLP-Typen sequenziert, da man damit in grober Form die bakterielle Diversität an diesem Standort beschreiben kann. Bei der Bodenprobe JG37 wurden zusätzlich alle Klone mit individuellen RFLP-Profilen sequenziert. Dabei bestätigte sich die, in dieser Bodenprobe bei der Analyse der predominanten Klone festgestellte Dominanz von *Holophaga/Acidobacterium* und α -Proteobakterien. Bei der Analyse der individuellen Klone wurden auch Repräsentanten von bakteriellen Abteilungen identifiziert, die bei den predominanten RFLP-Typen in der Bodenprobe JG37 nicht vertreten waren wie z.B. die Actinobakterien. Außerdem wurden verhältnismäßig viele individuelle Klone den δ -Proteobakterien zugeordnet. Mit der Analyse der Inserts der predominant Klone wird in grober Form die bakterielle Diversität in den untersuchten Bodenproben beschrieben, auch wenn nicht alle vorkommenden bakteriellen Abteilungen erfasst werden.

Nur wenige der aus der isolierten Gesamt-DNA der Bodenprobe Johanngeorgenstadt erhaltenen 16S rDNA Sequenzen waren nah verwandt mit kultivierten Organismen. Dies weist darauf hin, dass die bakterielle Gemeinschaft dieses Standortes sich zu einem großen Teil aus nicht kultivierten Spezies zusammensetzt. Die Anzahl an individuellen RFLP-Typen war in allen Proben sehr groß, was für eine hohe Diversität und eine inhomogene Verteilung von verschiedenen Bakterienspezies spricht.

Die Analyse der 16S rDNA Fragmente sollte auch dazu dienen, Sequenzen zu erhalten, die wichtige Informationen für die Herstellung von Primern und Sonden liefern. Die entwickelten Primer und Sonden sollen bei der quantitative PCR zum Einsatz kommen, um Aussagen über die Dichte identifizierter Populationen treffen zu können. Zum anderen kann man, wenn man weiß welche Bakterien vorkommen, gezielt versuchen diese Bakterien zu kultivieren und deren physiologische Eigenschaften mittels verschiedener Testverfahren nachzuweisen. Dabei kann man auch deren Einfluss auf die Mobilität von Radionukliden und Schwermetallen untersuchen. Die Bakterien, die an diesen Standorten leben, können zum Beispiel für die Herstellung von Bakterien-enhaltenen biologischen Keramiken (Biocers) für die *in situ* Bioremediation von kontaminierten Wässern in diesen Umgebungen genutzt werden (Raff et al., 2002).

4.2 Einflüsse experimenteller Faktoren auf die Diversitätsanalyse

Bei der Verwendung molekulargenetischer Methoden für die kultur-unabhängige Diversitätsanalyse von Mischpopulationen können verschiedene Fehlerquellen zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Schon die Probenentnahme und -lagerung stellen eine potentielle Fehlerquelle dar und können die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften beeinflussen (Selenska-Pobell, 2002). Auch die DNA-Extraktion aus Böden umfasst einen kritischen Schritt. Bei der indirekten Lyse werden erst die Zellen vom Boden extrahiert und dann die Lyse durchgeführt. Dabei kann es dazu kommen, dass nur die Bakterien isoliert werden, die leicht von der Bodenmatrix abgetrennt werden. Bei der direkten Lyse wird dieses Problem dadurch umgangen, dass erst die Lyse der mikrobiologischen Zellen und dann die Separation von den anderen Zellbestandteilen und Bodenpartikeln erfolgt (Ogram et al., 1987). Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der direkten Lyse entsteht hochmolekulare DNA, die auch sauber genug für PCR-Amplifizierungen ist und eher von intakten Zellen als von kurzen extrazellulären DNA-Fragmenten im Boden stammt (Selenska-Pobell, 1995).

Die Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente aus der isolierten Gesamt-DNA unterliegt mehreren Einflüssen, die zu einer falschen Einschätzung der bakteriellen Diversität führen können. Noch in der DNA-Lösung enthaltenen Inhibitoren wie z.B. Huminsäuren und auch Metalle können die Amplifikation behindern. Ein weiteres Phänomen sind Sequenzchimären. Sie können durch Amplifikation von DNA-Fragmenten und auch durch unvollständige Strangsynthese während der PCR-Elongation entstehen und setzen sich aus der DNA zweier Mikroorganismen zusammen. Aufgrund dessen wurde jede Sequenz, die weniger als 90% zu ihren nächsten phylogenetischen Verwandten ähnlich war, einem CHIMERA CHECK des Ribosomal Database Projektes unterzogen. Bei der Probe JG37 wurden mehr als 90 Klone sequenziert und nur zwei Insertsequenzen als mögliche Chimären identifiziert. Es zeigte sich, dass es sehr schwierig ist anhand dieses Tests eine Chimäre eindeutig zu identifizieren. Aufgrund dessen wurden die Insertsequenzen in Teilsequenzen zerlegt und mit den Sequenzen ihrer nächsten Verwandten erst ein Alignment und dann Dendrogramme (Bioedit) erstellt, die miteinander verglichen wurden. In den anderen beiden Proben wurden bei der bisherigen Analyse keine Chimären identifiziert. Die sehr geringe Anzahl an Chimären verdeutlicht die gute Qualität der Analyse und ist auf die Verwendung hochmolekularer und ausreichend verdünnter DNA zurückzuführen.

Eine fehlerhafte Replikation, die zu Mutationen führt, kann zur Verfälschung der Diversitätsanalyse beitragen. Um dies zu minimieren wurde die *AmpliTaq* Gold DNA Polymerase verwendet. Bei der Untersuchung der Bildung von Chimären bei der Verwendung dreier unterschiedlicher *Taq* DNA Polymerasen wurde beobachtet, dass mit der *AmpliTaq* DNA Polymerase die wenigsten Chimären gebildet wurden (Qiu et al., 2001). Die Nutzung der PCR geht eigentlich davon aus, dass die Amplifizierung homologer, aber nicht identischer rDNA Sequenzen mit der gleichen Effizienz erfolgt. Man stellte aber fest, dass es zu einer selektiven Amplifikation einiger Templates in einer Mischung von mehr als einem Template kommen kann (Suzuki & Giovannoni, 1996). Die Gründe dafür können die Genomgröße und die Anzahl der rRNA-Genkopien (Farrelly et al., 1995), der GC-Gehalt der rDNA (Reysenbach et al., 1992), sowie die Konzentration der Ausgangs-DNA sein.

Auch die Wahl der Amplifikationsprimer beeinflusst offenbar die Amplifikation der rDNA Sequenzen. Marchesi et al. (1998) testete die Spezifität und Effizienz der PCR-Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r}, sowie 16S_{7f} und 16S_{1402r} mit einer Vielzahl bakterieller Spezies und Umweltproben. Er stellte fest, dass die Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} bei der Amplifikation der 16S rRNA Gene erfolgreicher waren als die häufig für die Analyse der bakteriellen Gemeinschaft verwendeten Primer 16S_{7f} und 16S_{1402r}. Eine 16S rDNA-Klonbibliothek von einer Bodenprobe (Probenpunkt B, 2-3 m) der Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt wurde mit den Primern 16S_{7f} und 16S_{1513r} von einer Doktorandin erstellt. Bei der Analyse dieser Klonbibliothek wurde auch die Predominanz der α -Proteobakterien und *Holophaga/Acidobacterium* festgestellt (Galina Satschanska, Ergebnisse noch nicht veröffentlicht). Außerdem wurden 16S rDNA-Sequenzen von Vertretern von *Verrucomicrobia* und *Planctomycetales* identifiziert, die in der 16S rDNA Klonbibliothek der Probe JG37 nicht vertreten waren. Die DNA-Templates dieser Bakterien liegen entweder nur in geringen Konzentrationen vor oder durch die Verwendung der Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} wird das Vorkommen dieser Bakteriengruppen maskiert. Auch bei der Analyse von Drainagewässern des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz konnten mit den Primern 16S_{43f} und 16S_{1404r} im Gegensatz zu den Primern 16S_{7f} und 16S_{1513r} keine *Planctomycetales* nachgewiesen werden (Selenska-Pobell, 2002).

Marchesi et al. (1998) stellte auch fest, dass im Bereich der Primer 16S_{43f} und 16S_{1404r} die 16S rDNA Gene von einigen Spezies mehr 5'Fehlerstellen aufweisen als bei dem anderen Primerpaar. Aufgrund der aufgeführten Fehlerstellen im Bereich des 16S_{43f} Primers wurde ein degenerierter Primer konstruiert und synthetisiert. Dieser Primer wurde bei der Erstellung der

16S rDNA Klonbibliothek der Bodenprobe Sh765B verwendet. Bei den Ergebnissen der Analyse zeigte sich, dass die 16S rDNA vieler *Bacilli* und grüner schwefelfreier Bakterien amplifiziert wurde. Deren bekannte 16S rDNA-Sequenzen weisen im Bereich des Primers 16S_{43f} einige Fehlerstellen auf (Marchesi et al., 1998). Durch den Einsatz des degenerierten Primers werden die 16S rRNA Gene dieser Bakterien wahrscheinlich besser amplifiziert. Um festzustellen, ob durch die Verwendung des 16S_(deg.43f) Primer tatsächlich die 16S rRNA Gene einiger Bakterienpopulationen häufiger amplifiziert werden, wäre es notwendig eine Klonbibliothek dieser Bodenprobe mit dem 16S_{43f} Primer zu erstellen und beide Analysen zu vergleichen. Auch in dieser Probe konnten Verwandte von *Planctomycetales* identifiziert werden.

All das verdeutlicht, dass die Häufigkeit der Klone in der Klonbibliothek nicht tatsächlich die bakterielle Häufigkeit an diesem Standort widerspiegelt. Durch quantitative PCR-Analysen könnte man die Dichte der identifizierten Bakterienpopulationen in dieser Bodenprobe bestimmen.

Es lässt sich schwer einschätzen, inwiefern die Amplifikation der 16S rDNA durch PCR-Artefakte und andere oben aufgeführte Fehlerquellen beeinflusst wird. In der Arbeitsgruppe der Molekularen Mikrobiologie des FZR Rossendorf wurden von mehreren Proben, die am gleichen Probenpunkt bis zu einer Tiefe von 3 m entnommen wurden, 16S rDNA Klonbibliotheken angefertigt. Die Analyse der Klonbibliotheken zeigte, dass an diesem Probenpunkt auch in anderen Tiefen viele 16S rDNA Sequenzen vorkommen, die mit der 16S rDNA von α -Proteobakterien und *Holophaga/Aciobacterium* ähnlich sind (Selenska-Pobell et al., 2002). Außerdem zeigten auch einige Insertsequenzen der untersuchten Klone hohe Ähnlichkeiten zu den Insertsequenzen der Klone anderer Klonbibliotheken des Standortes Johanngeorgenstadt und des Standortes Gittersee/Coschütz (z.B. JG37-AG-126 und KF-JG30-18, JG37-AG-13 und KF/GS-JG36-31, GUBH2-59 und KF-Gitt2-34, Sh765B-AG-8 und KF/GS-Gitt2-53).

4.3 Vergleich der bakteriellen Diversität in Uranabfallhalde (Johanngeorgenstadt) und Uran „mill tailings“ (Gunnison und Shiprock)

Die bakterielle Diversität wurde durch die Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken von drei geographisch verschiedenen Standorten untersucht. Bei den Standorten handelte es sich um die Haberlandhalde in der Nähe von Johanngeorgenstadt, das Uran „mill tailings“ in Gunnison, Colorado (USA) und das Uran „mill tailings“ in Shiprock, New Mexico (USA).

Bei der Analyse der predominantesten Klone der Klonbibliothek der Bodenprobe JG34, die in der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt am Probenpunkt B aus 1-2 m Tiefe entnommen wurde, wurde die Dominanz von α -Proteobakterien, *Holophaga/Acidobacterium* und Actinobakterien beobachtet (Tab. 4.1, Selenska-Pobell et al., 2002). In dieser Arbeit wurde die Bodenprobe JG37 untersucht, die ebenfalls an diesem Probenpunkt aber in einer Tiefe von 3-4 m entnommen wurde. Auch in dieser Tiefe konnte eine zahlenmäßige Dominanz von α -Proteobakterien und *Holophaga/Acidobacterium* in der Klonbibliothek beobachtet werden. Actinobakterien wurden in der Bodenprobe JG37 nur in geringer Zahl bei der Analyse der individuellen Klone nachgewiesen.

Signifikante Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften in Bodenproben der Uranabfallhalde in Johanngeorgenstadt (JG34) und des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz (Gitt-MT) wurden beobachtet (Tab. 4.1, Selenska-Pobell et al., 2002)

Während in der Bodenprobe JG34 α -Proteobakterien und *Holophaga/Acidobacterium* predominant waren, wurden in der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz vor allem γ -Proteobakterien und Vertreter von *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteriodes* nachgewiesen. Actinobakterien, die ebenfalls häufig in der Bodenprobe JG34 vorgefunden wurden, wurden in dem Uran „mill tailings“ nicht identifiziert. Die beobachteten Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften liegen wahrscheinlich in dem unterschiedlichen geologischen Ursprung und dem unterschiedlichen Kontaminationsgrad der Standorte begründet.

Tab. 4.1: Verteilung der bakteriellen Populationen in % in der untersuchten Uranabfallhalde und den Uran „mill tailings“

Proben	Proteobakterien				H/A ¹⁾	CFB ²⁾	Bacilli	Act ³⁾	N/L ⁴⁾	GNS ⁵⁾	Plan ⁶⁾	Neu ⁷⁾
	α	β	γ	δ								
JG34 ⁸⁾	35	-	8	10	24	-	-	21	-	2	-	-
JG37 ⁹⁾	47	3	6	5	32	3	-	-	-	-	-	4
GUBH-2 ¹⁰⁾	15	6	45	6	11	4	-	-	-	-	-	13
Sh765B ¹¹⁾	7	2	17	9	3	-	31	3	5	17	3	2
Gitt-MT ¹²⁾	7	15	54	-	-	20	4	-	-	-	-	-

¹⁾ *Holophaga/Acidobacterium*, ²⁾ *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteriodes*, ³⁾ Actinobakterien,, ⁴⁾ *Nitrospira/Leptospirillum*, ⁵⁾ Grüne schwefelfreie Bakterien, ⁶⁾ *Planctomycetales*, ⁷⁾ Neue Abstammungslinien, „Candidate Division OP8“ und „Candidate Division OP11“,

⁸⁾ Probenpunkt B 1-2 m Haberlandhalde Johanngeorgenstadt (Selenska-Pobell et al., 2002), ⁹⁾ Probenpunkt B 3-4 m Haberlandhalde Johanngeorgenstadt, ¹⁰⁾ Probenpunkt GUBH2 2,5-3,5 m Uran „mill tailings“ Gunnison, ¹¹⁾ Probenpunkt 765B 9 m Uran „mill tailings“ Shiprock, ¹²⁾ Uran „mill tailings“ Gittersee (Selenska-Pobell et al., 2002)

Bei der Analyse der predominanten Klone der Klonbibliotheken der drei in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben wurden ebenfalls signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften festgestellt.

Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften der Bodeproben von Johanngeorgenstadt (JG37) und Gunnison (GUBH2) waren ähnlich. Während in der Bodenprobe JG37 jedoch α -Proteobakterien und *Holophaga/Acidobacterium* zahlenmäßig dominierten, wurden in der Bodenprobe GUBH2 vor allem γ -Proteobakterien nachgewiesen.

In der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock unterschied sich die bakterielle Gemeinschaft von denen in den anderen untersuchten Bodenproben und ähnelte eher der des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz (Tab. 4.1).

α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien wurden in allen drei untersuchten Bodenproben identifiziert (Tab. 4.1). In der Bodenprobe der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt waren α -Proteobakterien predominant. Viele Klone der Klonbibliothek JG37 wurden den nicht kultivierten Bakterien MND8 und MNF4 zugeordnet, die aus eisen- und manganhaltigen Sedimenten vom Grunde des Green Bay, einem Arm des Lake Michigan, identifiziert wurden (Stein et al., 2001). Der nächste Verwandte des nicht kultivierten Bakteriums MND8 soll zur Schwefel-Oxidation fähig sein (Stein et al., 2001). Das Resultat der Bildung von Sulfat und/oder Schwefelsäure ist ein Absinken des pH-Wertes in der angrenzenden Umgebung, was die Löslichkeit von Metallkomponenten beeinflusst (Gadd, 2002). Des weiteren wurden Verwandtschaften zu methylo-trophen Bakterien (JG37-AG-25, JG37-AG-26 und JG37-AG-

107), die Methan und andere C₁-Verbindungen verwerten, und zu Bakterien, die in einer Symbiose mit Pflanzen leben (wie z.B. *Bradyrhizobium*) festgestellt. Auch in der Bodenprobe GUBH2 des Uran „mill tailings“ Gunnison waren die α -Proteobakterien relativ häufig. Methylothrophe Bakterien wie z.B. *Methylosinus sporium* wurden ebenfalls identifiziert. Der individuelle Klon GUBH2-AG-107 war mit dem nicht kultivierten Bakterium MNG7 verwandt, dessen nächster Verwandter Mn(II) und Methan oxidiert (Stein et al., 2001). Die Oxidation von Mn(II) zu schwerlöslichen Manganoxiden führt zu einer Immobilisierung von Mangan. In dem Uran „mill tailings“ Shiprock wurden bisher nur wenige α -Proteobakterien nachgewiesen.

β -Proteobakterien wurden in allen untersuchten Bodenproben nur in geringer Zahl identifiziert. In der Probe JG37 waren die Insertsequenzen zweier Klone mit der 16S rDNA des nicht kultivierten Bakteriums MNC9 verwandt, welches in eisen- und manganhaltigen Sedimenten nachgewiesen wurde (Stein et al., 2001). Auch der nächste Verwandte dieses nicht kultivierten Bakteriums soll Schwefel oxidieren können (Stein et al., 2001), was zu einer Absenkung des pH-Wertes und einer daraus resultierenden Beeinflussung der Löslichkeit von Metallverbindungen führt.

Die γ -Proteobakterien waren in der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Gunnison predominant (Tab. 4.1). Einige der Repräsentanten dieser Bakteriengruppe affilierten mit *Pseudomonas* sp.. Auch im Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz waren γ -Proteobakterien die dominante Gruppe und wie sich auch in anderen Analysen (Selenska et al., 2002) zeigte, waren die Vertreter vor allem mit *Pseudomonas* sp. verwandt. *Pseudomonas* Spezies sind wichtige Abbauer organischer Materie in Böden und werden zunehmend auch für die Dekontamination von Böden (Bioremediation) interessant. Die Insertsequenz des Klons GUBH2-AG-52 zeigte eine 99% Ähnlichkeit zu dem Gram negativen Bakterium *Pseudomonas frederiksbergensis* (Andersen et al., 2000). Auch in der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock konnten Pseudomonaden identifiziert werden. Die Insertsequenz des Klons Sh765B-AG-8 affilierte mit 98% zu *Pseudomonas* sp. NMX. Dieses Bakterium wurde von einem nichtkontaminierten Boden in Clayton Woods, Carbondale, USA isoliert. Es wurde festgestellt, dass dieses Bakterium die Oxidation von reduzierten Huminsäuren mit der Reduktion von Nitrat verbinden kann (Coates et al., 2002). Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass herausgefunden wurde, dass Huminsäuren auch als lösliche Elektronencarrier zwischen Mikroorganismen und unlöslichen terminalen

Elektronenakzeptoren wie Fe(III)-Oxiden agieren können (Lovley et al., 1999). Die nächsten Verwandten des Klons JG37-AG-143 waren *Pseudomonas migulae* (99%) und *Pseudomonas* sp. ISO1 (99%). *Pseudomonas* sp. ISO1 besitzt das Multikupfer Oxidase Gen *cumA* und oxidiert nur schwach Mn(II) (Francis & Tebo 2001). Die Oxidation von Mn(II) zu schwerlöslichen Manganoxiden trägt zur Immobilisierung des Mangans bei. In der Probe von Gunnison wurden auch Vertreter von *Acinetobacter* identifiziert, welche ausgeprägte Abbautendenzen besitzen (Fritsche, 1999).

δ -Proteobakterien wurden in allen untersuchten Bodenproben identifiziert. Erstaunlicherweise konnten in dem „mill tailings“ von Gittersee/Coschütz keine δ -Proteobakterien nachgewiesen werden. Diese Abteilung besteht hauptsächlich aus sulfat- und metallreduzierenden Bakterien. In der Probe JG37 waren die predominantesten Klone der δ -Proteobakterien nur mit nicht kultivierten Bakterien verwandt. Die Sequenzen der Inserts von individuellen Klonen waren entfernt verwandt mit der 16S rDNA von *Geobacter sulfurreducens*, einem dissimilatorisch metall- und schwefelreduzierendem Bakterium (Caccavo et al., 1994) und *Geobacter metallireducens*, einem dissimilatorisch Fe(III)-reduzierendem Bakterium (Lovley et al., 1993a). Die Insertsequenz des Klons GUBH2-AG-114 affilierte mit der 16S rDNA von *Desulfuromonas thiophila* sp. NZ27T^T (94% Ähnlichkeit) (Finster et al., 1997) und mit der von *Desulfuromonas acetexigens* (95% Ähnlichkeit) (Lovley et al., 1995). *Desulfuromonas thiophila* sp. NZ27T^T ist ein mesophiles acetoxidierendes, schwefelreduzierendes Bakterium, das aus Wasser einer Schwefelquelle der Ngawha Quellen in Moerewa, Neuseeland isoliert wurde und nur elementaren Schwefel als Elektronenakzeptor für das Wachstum nutzt (Finster et al., 1997). Die Insertsequenz des nicht kultivierten Bakteriums Sh765B-TzT-29 war nur entfernt verwandt mit der 16S rDNA von *Geobacter pelophilus* (91%). In Wasserproben des Uran „mill tailings“ Shiprock wurden sulfatreduzierende Bakterien, vor allem *Desulfotomaculum* nachgewiesen (Chang et al., 2001). Die Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die Stimulation der U(VI) Reduktion mit der Zugabe von Acetat wurde in Sedimenten des Uran „mill tailings“ Shiprock beobachtet (Holmes et al., 2002). Durch die Zugabe von Acetat wurde eine Zunahme der 16S rDNA-Sequenzen und die Dominanz der Familie *Geobacteracea* festgestellt. In nicht beeinflussten Proben (wie die untersuchten Proben) konnten aber nur wenige Vertreter dieser Familie identifiziert werden (Holmes et al., 2002). Die dissimilatorisch metallreduzierenden Mikroorganismen beeinflussen den biogeochemischen Kreislauf der Metalle, die sie als Elektronenakzeptoren nutzen.

Unterschiede in der Verteilung von *Holophaga/Acidobacterium*, *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*, *Bacilli* und Actinobakterien zeigten sich bei den beiden Uran „mill tailings“ und der Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt.

Vertreter von *Holophaga/Acidobacterium* sind offenbar charakteristisch für die Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt. Auch in Bodenproben geringerer Tiefe konnten viele dieser Bakterien identifiziert werden (Selenska-Pobell et al., 2002). In der Probe des Uran „mill tailings“ Gunnison wurden auch Vertreter dieser Bakteriengruppe identifiziert, aber nicht so dominant wie in Johanngeorgenstadt. Wie bereits schon erwähnt wurden bisher nur drei kultivierte Stämme in diesem Cluster beschrieben: *Acidobacterium capsulatum* (Hiraishi et al., 1995), *Holophaga foetida* (Liesack et al., 1994) und *Geothrix fermentans* (Lonergan et al., 1996). All diese Spezies und Sequenzen wurden von terrestrischen Umgebungen isoliert und repräsentieren offenbar eine der wichtigsten Gruppen der Bodenbakterien (Felske et al., 1998). Die Insertsequenzen der Klone der Bodenprobe JG37 affiliierten mit den 16S rDNA-Sequenzen nicht kultivierter Bakterien, die in einem mit polychlorierten Biphenylen verschmutzten Boden in der Nähe von Wittenberg (WD244, WD254 –Nogales, 2001) und von anderen terrestrischen Böden (32-10 und 32-21 (Ludwig et al., 1997), DA023 und DA052 (Felske et al., 1998)) identifiziert wurden. Die erhaltenen Sequenzen waren vor allem mit *Acidobacterium capsulatum* verwandt. Auf Grund dessen, dass nur sehr wenige Bakterien dieser Familien bisher kultiviert wurden sind, weiß man nur wenig über die Funktionen dieser Bakterien im Boden. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Bakterien in vielen verschiedenen Böden vorkommen (Felske et al., 1998; Ludwig et al., 1997; Nogales et al., 2001) und auch aktiv sind (Felske et al., 1998).

In der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock waren im Gegensatz dazu *Bacilli* und grüne schwefelfreie Bakterien zahlenmäßig dominant (Tab. 4.1). Der Klon Sh765B-TzT-70 war zu 97% ähnlich zu *Bacillus* sp. PL-26. Dieses sporenbildene Bakterium, welches enzymatisch lösliches Mn(II) zu unlöslichen Mn(IV) oxidiert, wurde in küstennahen marinen Sedimenten von Point Loma (San Diego, USA) isoliert (Francis & Tebo, 2002). Die stark geladenen und reaktiven Oberflächen der biogenen Manganoxide beeinflussen dramatisch die Oxidation und Sorption von Spurenmetallen und Organika in der Umwelt (Hem, 1978). *Bacillus*-Arten sind weitverbreitete Bodenbakterien, die auch Einfluss auf den biogeochemischen Zyklus von Metallen haben.

Grüne schwefelfreie Bakterien wurden durch Klone repräsentiert, die am engsten mit den nicht kultivierten Bakterien T0.6f, H1.4f (Chandler et al., 1998), MB-C2-126 und MB-A2-

110 (Reed et al., 2002) verwandt waren. Reed et al. (2002) und Hugenholtz et al. (1998b) zeigten, dass diese Klone am engsten verwandt waren zu *Dehalococcoides ethenogenes*, welches durch reduktive Dechlorierung Tetrachlorethen in Ethen umwandeln kann.

Im Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz wurden viele Vertreter von *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* identifiziert. Diese Bakterien wurden bisher in der Klonbibliothek von Shiprock nicht und in den anderen beiden nur in geringer Zahl identifiziert.

In der Probe des Uran „mill tailings“ Shiprock wurden in geringer Zahl Actinobakterien nachgewiesen. Bei der Analyse der Klonbibliothek der Bodenprobe JG37 wurden nur individuelle Klone dieser Abteilung zugeordnet.

Interessant ist das Vorkommen von *Planctomycetales* in der Bodenprobe des Uran „mill tailings“ Shiprock. Die Insertsequenz des Klons Sh765B-TzT/AG-34 war nur entfernt verwandt mit der ammoniumoxidierenden Planctomycete KOLL2a. Diese Bakterien sind an der anaeroben Oxidation von Ammonium zu molekularem Stickstoff beteiligt (Strous et al., 1999). Auch in den Drainagewässern des Uran „mill tailings“ Gittersee/Coschütz wurden *Planctomycetales* nachgewiesen (Selenska-Pobell, 2002).

In allen Bodenproben wurden Insertsequenzen analysiert, die keiner der derzeit bekannten Abteilungen zugeordnet werden konnten, sondern offenbar neuen Abstammungslinien angehören. Die Insertsequenzen von Klonen der Probe Gunnison und Shiprock affiliierten mit den 16S rDNA-Sequenzen der neu beschriebenen „Candidate Division“ OP8 und OP11 (Hugenholtz et al., 1998a), welche in einer heißen Quelle (Obsidian Pool) umrandet von der Yellowstone Kaldera in den USA gefunden worden. Bisher ist über die Eigenschaften dieser Bakterien nichts bekannt. Vor kurzem konnte jedoch aus diesem extremen Habitat das Fe(III) reduzierende Bakterium *Geothermobacterium ferrireducens* isoliert werden (Kashefi et al., 2002).

Es konnten Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften in der Bodenprobe JG37 der Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt und der Bodenproben der Uran „mill tailings“ Gunnison (GUBH2) und Shiprock (Sh765B) beobachtet werden. Vor allem unterschied sich die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft in der Bodenprobe Sh765B von der in den anderen beiden untersuchten Proben. Die Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften sind wahrscheinlich durch die unterschiedlich starke Kontamination der

Böden mit Schwermetallen und Radionukliden zurückzuführen (Tab. 2.5). In der untersuchten Bodenprobe der Uranabfallhalde Johanngeorgenstadt wurde eine stärkere Kontamination mit Uran und Schwermetallen festgestellt als in den Bodenproben der Uran „mill tailings“ Gunnison und Shiprock. Außerdem stammen die Standorte aus geographisch unterschiedlichen Regionen und haben einen unterschiedlichen geologischen Ursprung. Die Bodenprobe Sh765B wurde zudem noch aus einer weitaus größeren Tiefe als die anderen Bodenproben entnommen. Durch die Verwendung des $^{16}\text{S}_{(\text{deg.43f})}$ Primers wird wahrscheinlich auch die beobachtete Struktur der bakteriellen Gemeinschaft in der Bodenprobe Sh765B beeinflusst. Um dies nachzuweisen bedarf es aber weiterer Untersuchungen.

5 Schlussfolgerungen

Die Analyse hat gezeigt, dass die bakterielle Diversität in der untersuchten Uranabfallhalde und den untersuchten Uran „mill tailings“ trotz der Kontamination mit Schwermetallen und Radionukliden groß ist. Es wurden Bakterien identifiziert, deren nächsten Verwandten mit Radionukliden und Schwermetallen in Wechselwirkung treten und so die Mobilität dieser Stoffe beeinflussen. Signifikante Unterschiede in der Struktur der natürlichen bakteriellen Gemeinschaften in den drei untersuchten Proben wurden festgestellt, welche wahrscheinlich auf ihren unterschiedlichen geologischen Ursprung und die unterschiedlich starke Kontamination mit Schwermetallen und Radionukliden zurückzuführen sind. Um zu überprüfen, ob durch die Verwendung des 16S_(deg.43f) Primers für die Amplifizierung der 16S rDNA-Fragmente die beobachtete Struktur der bakteriellen Gemeinschaft beeinflusst wurde, müsste zum Vergleich noch eine Klonbibliothek von der Bodenprobe Sh765B mit den Primern 16S_{43f} und 16S_{1404r} erstellt werden.

Um Aussagen über die Dichte der einzelnen identifizierten Bakterienpopulation zu treffen, bedarf es weiterer Analysen mittels quantitativer PCR.

Des weiteren bedarf es klassischer Kultivierungs- und Charakterisierungsverfahren und biochemischen Studien, um die in diesen Umgebungen vorkommenden Bakterien hinsichtlich ihres Einflusses auf die Mobilität von Radionukliden und Schwermetallen zu untersuchen und diese dann für die Bioremediation dieser Standorte zu nutzen (z.B. mittels Biocers).

6 Literaturverzeichnis

Andersen, S. M., Johnson, K., Sørensen, J., Nielsen, P. & Jacobsen, C. S. (2000). *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1957-1964.

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

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

Axelrood, P. E., Chow, M. L., Radomski, C. C., McDermott, J. M. & Davies, J. (2002). Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 655-674.

Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S. & Christen, R. (1996). Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3405-3412.

Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 591-604.

Caccavo Jr, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F. & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3752-3759.

Cerdá, J., Gonzalez, S., Rios, J. M. & Quintana, T. (1993). Uranium concentrates bioproduction in Spain: a case study. *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 253-260.

Chandler, D. P., Brockman, F. J. & Fredrickson, J. K. (1997). Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 217-230.

Chandler, D. P., Brockman, F. J., Bailey, T. J. & Fredrickson, J. K. (1998). Phylogenetic diversity of Archaea and Bacteria in a deep subsurface paleosol. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 37-50.

Chang, Y.-J., Peacock, A. D., Long, P. E., Stephen, J. R., McKinley, J. P., Macnaughton, S. J., Anwar Hussain, A. K. M., Saxton, A. M. & White, D. C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3149-3160.

Coates, J. D., Cole, K. A., Chakraborty, R., O'Connor, S. M. & Achenbach, L. A. (2002). Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2445-2452.

- DiSpirito, A. A. & Tuovinen, O. H.** (1982). Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives of Microbiology*, 133, 33-37.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haacke, S. K. & Pace, N. R.** (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3869-3877.
- Dojka, M. A., Harris, J. K. & Pace, N. R.** (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1617-1621.
- Farrelly, V., Rainey, F. A. & Stackebrandt, E.** (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2798-2801.
- Felsenstein, J.** (1993). PHYLIP (Phyloheny Inference Package) version 3.5c Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R. & Akkermans, A. D. L.** (1998). Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in drentse a grassland soils (the Netherlands). *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 871-879.
- Finster, K., Coates, J. D., Liesack, W. & Pfennig, N.** (1997). *Desulfuromonas thiophilia* sp. nov., a new obligately sulfur-reducing bacterium from anoxic freshwater sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 754-758.
- Flemming, K., Satschanska, G., Selenska-Pobell, S.** (2001). Comparison of the structures of the natural bacterial communities in one uranium mining waste pile and in one uranium mill tailings. *FZR Report 318*, S. 35.
- Francis, A. J.** (1990). Microbial dissolution and stabilisation of toxic metals and radionuclides in mixed wastes. *Experientia*, 46, 840-851.
- Francis, A. J., Dodge, C. J., Gillow, J. B. & Cline, J. E.** (1991). Microbial transformations of uranium wastes. *Radiochimica Acta*, 52, 311-316.
- Francis, A. J.** (1998). Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes. *Journal of Alloys and Compounds*, 271-273, 78-84.
- Francis, C. A. & Tebo, B. M.** (2001). *CumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4272-4278.
- Francis, C. A. & Tebo, B. M.** (2002). Enzymatic manganese(II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 874-880.
- Fritsche, W.** (1999). Mikrobiologie. 2., neubearb. Aufl.-Heidelberg: Berlin: Spektrum, Akad. Verlag

Gadd, G. M. (2002). Microbial interactions with metals/radionuclides: the basis of bioremediation. Kapitel in: *Interactions of bacteria with radionuclides* (Keith-Roach, M. & Livens, F. Hrsg.) Elsevier Science, Oxford, UK, S. 179-204.

Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A. & Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, S. 5053-5065.

Gosink, J. J. & Staley, J. T. (1995). Biodiversity of gas vacuolate bacteria from antarctic sea ice and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3486-3489.

Helling, C. (1999). Hydrochemische Untersuchungen an müllüberlagerten Urantailings unter dem Aspekt einer effektiven Langzeitüberwachung. *Wissenschaftliche Mitteilungen 9*, TU Bergakademie Freiberg, Insitut für Geologie.

Hem, J. D. (1978). Redox processes at surfaces of manganese oxide and their effects on aqueous metal ions. *Chem. Geol.*, 21, 199-218.

Heuer, H., Kroppenstedt, R. M., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. (2002). Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1325-1335.

Hiraishi, A., Kishimoto, N., Kosako, Y., Wakao, N. & Tano, T. (1995). Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiology Letters*, 132, 91-94.

Holmes, A. J., Bowyer, J., Holley, M. P., O'Donoghue, M., Montgomery, M. & Gillings, M. R. (2000). Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 111-120.

Holmes, A. J., Tujula, N. A., Holley, M., Contos, A., James, J. M., Rogers, P. & Gillings, M. R. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 3, 256-264.

Holmes, D. E., Finneran, K. T., O'Neil, R. A. & Lovley, D. R. (2002). Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2300-2306.

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. & Pace, N. R. (1998a). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998b). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180, 4765-4774.

- Hurek, T., Wagner, B. & Reinhold-Hurek, B. (1997). Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4331-4339.
- Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P. & Liesack, W. (1997). Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 837-841.
- Ivanova, I. A., Stephen, J. R., Chang, Y.-J., Brüggemann, J., Long, P. E., McKinley, J. P., Kowalschuk, G. A., White, D. C. & Macnaughton, S. J. (2000). A survey of 16S rRNA and *amoA* genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class proteobacteria in contaminated groundwater. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1-9.
- Jeong, B. C., Hawes, C., Bonthron, K. M. & Macaskie, L. E. (1997). Localization of enzymically enhanced heavy metal accumulation by *Citrobacter* sp. and metal accumulation *in vitro* by liposomes containing entrapped enzyme. *Microbiology*, 143, 2497-2507.
- Kaiser, O., Pühler, A. & Selbitschka, W. (2001). Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microbial Ecology*, 42, 136-149.
- Kashefi, K., Holmes, D. E., Reysenbach, A.-L. & Lovley, D. R. (2002). Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: isolation and characterisation of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov.. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1735-1742.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J. & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from mariana trench, Challenger deep, at a depth of 11,00 meters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1510-1513.
- Kengen, S. W. M., Breidenbach, C. G., Felske, A., Stams, A. J. M., Schraa, G. & De Vos, W. M. (1999). Reductive dechlorination of tetrachlorethene to *cis*-1,2-dichlorethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2312-2316.
- Kuske, C. R., Barns, S. M. & Busch, J. D. (1997). Diverse uncultivated bacterial groups of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3614-3621.
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, J.-U., & Stackebrandt, E. (1994). *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, 162, 85-90.
- Lloyd, J. R. & Macaskie, L. E. (2000). Bioremediation of radioactive metals. In D. R. Lovley (Hrsg.), *Environmental Microbe-Metal Interactions* (S. 277-327). Washington, DC: ASM Press.
- Lloyd, J. R. & Macaskie, L. E. (2002) Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions. Kapitel in: *Interactions of bacteria with radionuclides* (Keith-Roach, M. & Livens, F. Hrsg.) Elsevier Science, Oxford, UK, S. 313-342.

- Lonergan, D. J., Jenter, H. L., Coates, J. D., Phillips, E. J. P., Schmidt, T. & Lovley, D. R. (1996). Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178, 2402-2408.
- Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A. & Goodwin, S. (1993a). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology*, 159, 336-344.
- Lovley, D. R., Widman, P. K., Woodward, J. C. & Phillips, E. J. P. (1993b). Reduction of uranium by cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3572-3576.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P., Lonergan, D. J. & Widman, P. K. (1995). Fe(III) and S^0 reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2132-2138.
- Lovley, D. R., Fraga, J. L., Coates, J. D. & Blunt-Harris, E. L. (1999). Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*, 54, 1472-1480.
- Lovley, D. R. (2002). Dissimilatory metal reduction: from early life to bioremediation. *ASM News Volume 68 Nr 5*, 231-237.
- Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A. & Schleifer, K. H. (1997). Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology Letters*, 153, 181-190.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M., & Tiedje, J. M. (2000). The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Research*, 28, 173-174.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 795-799.
- Merroun, M. L. & Selenska-Pobell, S. (2001). Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI). *BioMetals*, 14(2), 171-179.
- Morris, K. & Raisewell, R. (2002). Biogeochemical cycles and remobilisation of the actinide elements. Kapitel in: *Interactions of bacteria with radionuclides* (Keith-Roach, M. & Livens, F. Hrsg.) Elsevier Science, Oxford, UK, S. 101-142
- Morris, S. A., Radajewski, S., Willison, T. W., & Murrell, J. C. (2002). Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1446-1453.

- Neefs, J.-M., Van de Peer, Y., DeRijk, P., Goris, A. & De Wachter, R. (1991). Compilation of smaller ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 19, 1987-2009.
- Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2000). Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III)-Oxide by *Geobacter metallireducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2248-2251.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R. & Timmis, K. N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1874-1884.
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. J. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 57-66.
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740.
- Purchase, D., Miles, R. J. & Young, T. W. K. (1997). Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 85-93.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2001). Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 880-887.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403, 646-649.
- Raff, J., Selenska-Pobell, S., Wahl, R., Mertig, M. & Pompe, W. (2000). A novel S-layer protein from a uranium mining waste pile isolate *B. sphaericus* JG-A12 and its interaction with uranium and other metals. Bacterial-metal/Radionuclide interactions: basic research and bioremediation. Abstract book, S. 26.
- Raff, J. (2002). Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien in Uranabfallhalden mit Schwermetallen. *Wissenschaftlich-Technische Berichte FZR-358*, Forschungszentrum Rossendorf.
- Raff, J., Soltmann, U., Matys, S., Schnorpfeil, M., Böttcher, H., Pompe, W. & Selenska-Pobell, S. (2002). Bacterial-based bioremediation of uranium mining waste waters by using sol-gel ceramics. In: Uranium in the aquatic environment (Hrsg. Merkel, B. J., Planer-Friedrich, B. & Wolkersdorf, C.), Springer Verlag, Berlin, S. 615-622.
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Pernthaler, J. & Amann, R. (1999). High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3982-3989.
- Reed, D. W., Fujita, Y., Delwiche, M. E., Blackwelder, D. B., Sheridan, P. P., Uchida, T. & Colwell, F. S. (2002). Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3759-3770.

- Reysenbach, A., Giver, L. J., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3417-3418.
- Rheims, H., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1996). A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of In. Microbiology*, 17, 159-169.
- Schippers, A., Hallmann, R., Wentzien, S. & Sand, W. (1995). Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2930-2935.
- Schlötterburg, C., Von Wintzigerode, F., Hauck, R., Hagemann, W. & Göbel, U. B. (2000). Bacteria of an anaerobic dechlorinating consortia. *International Journal of Systematic Environmental Microbiology*, 50, 1505-1511.
- Selenska, S. & Klingmüller, W. (1991). DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 21-24.
- Selenska-Pobell, S. (1995). Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. *Molecular Microbiology Ecology Manual 1.5.1*, 1-17,
- Selenska-Pobell, S., Kampf, G., Flemming, K., Radeva, G. & Satchanska, G. (2001). Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie van Leewenhuek* 79, 149-161.
- Selenska-Pobell, S. (2002). Diversity and activity of bacteria in uranium waste piles. Kapitel in: *Interaction of microorganisms with radionuclides* (Keith-Roach, M. J.; Livens, F. R. Hrsg.). Elsevier Science Ltd, Oxford, S. 225-253.
- Selenska-Pobell, S., Flemming, K., Tzetkova, T., Raff, J., Schnorpfeil, M., Geißler, A. (2002). Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interaction with heavy metals. In: *Uranium in the aquatic environment* (Merkel, B. J., Planer-Friedrich, B. & Wolkersdorf, C. Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, S. 455-464.
- Sharma, P. K., Balkwill, D. L., Frenkel, A. & Vairavamurthy, M. A. (2000). A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3083-3087.
- Spröer, C., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1255-1262.
- Stein, L.Y., La Duc, M. T., Grundl, T. J. and Nealson, K. H. (2001). Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environmental Microbiology*, 3, 10-18.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S, Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400, 446-449.

- Subramaniam S., Chua, K.-L., Tan, H.-M., Loh, H., Kuhnert, P. & Frey, J. (1997).** Phylogenetic position of *Riemerella anatipestifer* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 562-565.
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996).** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.
- Tebo, B. M. & Obratsova, A. Y. (1998).** Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptor. *FEMS Microbioloy Letters*, 162, 193-198.
- Tzetskova, T., Flemming, K., Selenska-Pobell, S. (2002).** Comparative analysis of bacteria in uranium mining wastes. *FZR-Report 343*, S. 35.
- Valinsky, L., Vedova, G. D., Scupham, A. J., Alvey, S., Figueroa, A., Yin, B., Hartin, R. J., Chrobak, M., Crowley, D. E., Jiang, T. & Borneman, J. (2002).** Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3243-3250.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, 51, 221-271.
- Yurkov, V., Stackebrandt, E., Buss, O., Vermeglio, A. Gorlenko, V. & Beatty, J. T. (1997).** Reorganization of the genus *Erythromicrobium*: Description of "*Erythromicrobium sibiricum*" as *Sandaracinobacter sibiricus* gen. nov., sp. nov., and of "*Erythromicrobium ursincola*" as *Erythromonas ursincola* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1172-1178.

Anhang A

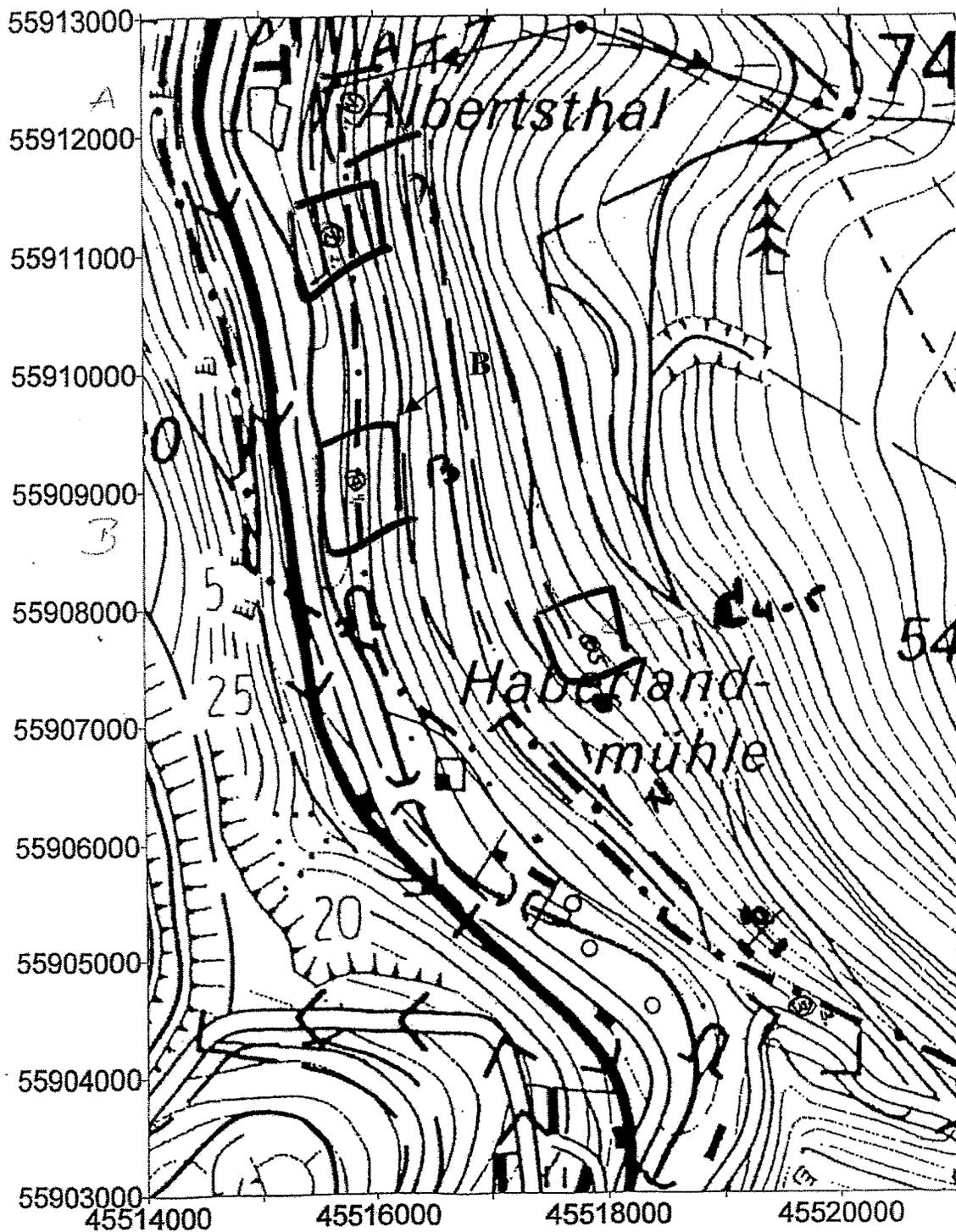


Abb. A1: Karte der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt

Anhang B

Tab. B1: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe JG37

Proteobakterien				<i>Holophaga/</i> <i>Acidobacterium</i>	CFB ¹⁾	Neue Ab- stammungs- linie	Actino- bakterien	Grüne Schwefel- bakterien	<i>Nitospira/</i> <i>Leptospirillum</i>
α	β	γ	δ						
36	2	5	4	24	2	3	0	0	0
47%	3%	6%	5%	32%	3%	4%	-	-	-

¹⁾ Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides

Tab. B2: Zuordnung der individuellen 16S rDNA Klone der Bodenprobe JG37 der Haberlandhalde Johanngeorgenstadt¹⁾

Klonbe- zeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	Blast % Ähnlichkeit ³⁾
α-Proteobakterien				
JG37-AG-3	AJ518762	1	Uncult. bacterium GIF7 (AF407198)	95
			<i>Bradyrhizobium</i> sp. 'SH283012' (AF041446)	93
JG37-AG-18	AJ518765	1	<i>Sphingomonas</i> sp. SIA181-1A1 (AF395032)	97
			Uncult. bacterium a13102 (AY102309)	97
JG37-AG-25	AJ518767	1	Uncult. bacterium FW138 (AF523948)	95
			Unident. bacterium DA122 (Y12598)	95
			<i>Methylosinus trichosporium</i> (AJ458492)	94
JG37-AG-32	AJ518769	1	<i>Caulobacter</i> sp. FWC38 (AJ227774)	96
			<i>Caulobacter fusiformis</i> ATCC (AJ227759)	95
JG37-AG-65	AJ518771	1	Uncult. bacterium FW96 (AF523945)	99
			Uncult. bacterium KF-JG30-B3 (AJ295650)	99
JG37-AG-123	AJ518778	1	Uncult. bacterium FW96 (AF523945)	97
			Uncult. bacterium KF-JG30-B3 (AJ295650)	97
JG37-AG-79	AJ518772	1	Uncult. alpha proteobacterium YNPRH85B (AF465655)	89
JG37-AG-119	AJ518777	1	Uncult. bacterium KF-JG30-B12 (AJ295647)	91
			Uncult. bacterium FW51 (AF523951)	89
			Uncult. alpha proteobacterium YNPRH85B (AF465655)	89
JG37-AG-96	AJ518773	1	Uncult. bacterium Q3-24C12 (AY048887)	97
			<i>Zoogloea ramigera</i> (X74915)	96
JG37-AG-107	AJ518775	1	Uncult. alpha proteobacterium UP3 (AF200697)	94
			<i>Methylocella palustris</i> (Eubacterium K) (Y17144)	94
JG37-AG-111	AJ518776	1	Uncult. bacterium LO13.3 (AF358017)	99
			Unident. alpha proteobacterium JTB131 (AB015245)	95
JG37-AG-130	AJ518779	1	Uncult. bacterium HTC6 (AF418951)	94
			Uncult. sludge bacterium S7 (AF234717)	97
β-Proteobakterien				
JG37-AG-35	AJ518782	1	Uncult. bacterium LO13.1 (AF358001)	94
			Uncult. soil bacterium 1326-2 (AF358001)	94
JG37-AG-125	AJ518783	1	Uncult. soil bacterium 1326-2 (AF423222)	97
			Uncult soil bacterium 646-2 (AF423284)	97
γ-Proteobakterien				
JG37-AG-14	AJ518784	1	Agricultural soil bacterium SC-I-16 (AJ252619)	92
			Uncult. bacterium KF-JG30-B15 (AJ295651)	93
JG37-AG-87	AJ518785	1	Uncult. gamma proteobacterium Ebpr13 (AF255638)	92
			<i>Thiobacillus prosperus</i> (AY034139)	91
JG37-AG-94	AJ518786	1	Uncult. bacterium WD260 (AJ292673)	90
			Agricultural soil bacterium SC-I-87 (AJ252663)	94

Klonbezeichnung	Accession Nr. EMBL ²⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ²⁾ Nr.)	Blast % Ähnlichkeit ³⁾
			δ-Proteobakterien	
JG37-AG-2	AJ518789	1	Agricultural soil bacterium SC-I-29 (AJ252629)	98
			Rhizosphere soil bacterium RSC-II-54 (AJ252685)	98
JG37-AG-30	AJ518791	1	Agricultural soil bacterium SC-I-29 (AJ252629)	93
			Rhizosphere soil bacterium RSC-II-54 (AJ252685)	93
JG37-AG-15	AJ518790	1	<i>Chondromyces languinosus</i> Sy t2 (AJ233939)	90
			<i>Chondromyces pediculatus</i> Cm p17 (AJ233940)	90
JG37-AG-33	AJ518792	1	Uncult. sludge bacterium A9 (AF234747)	94
			Uncult. delta proteobacterium Sva0679 (AJ241020)	91
JG37-AG-55	AJ518793	1	Agricultural soil bacterium SC-I-17 (AJ252620)	97
			Agricultural soil bacterium SC-I-29 (AJ252629)	97
JG37-AG-82	AJ518794	1	Uncult. Green Bay ferromanganous microndule bacterium MNF2 (AF293009)	91
			<i>Cystobacter fuscus</i> Cb f6 (AJ233897)	92
JG37-AG-90	AJ518795	1	Uncult. sludge bacterium H16 (AF234748)	95
			Agricultural soil bacterium SC-I-55 (AJ252641)	92
JG37-AG-140	AJ518803	1	Uncult. sludge bacterium H16 (AF234748)	96
			Agricultural soil bacterium SC-I-55 (AJ252641)	92
JG37-AG-128	AJ518800	1	Uncult. sludge bacterium H16 (AF234748)	91
			Agricultural soil bacterium SC-I-55 (AJ252641)	90
JG37-AG-91	AJ518796	1	Unident. delta proteobacterium (AB015242)	92
			Unident. bacterium BD3-7 (AB015549)	92
JG37-AG-113	AJ518798	1	Uncult. bacterium TK13 (AJ347034)	92
			Uncult. bacterium TK90 (AJ347053)	91
JG37-AG-133	AJ518801	1	Uncult. bacterium G13 (AF407700)	93
			Uncult. bacterium GR-WP33-30 (AJ296569)	94
JG37-AG-139	AJ518802	1	Uncult. bacterium FukuN9 (AJ290009)	97
			<i>Bdellovibrio</i> sp. Gunpowder (AF084853)	97
			<i>Holophaga/Acidobacterium</i>	
JG37-AG-9	AJ519365	1	Uncult. Acidobacterium UA3 (AF200699)	94
			Uncult. eubacterium WD281 (AJ292588)	93
JG37-AG-13	AJ519366	1	Uncult. bacterium KF/GS-JG36-31 (AJ295657)	96
			Uncult. Acidobacterium YNPRH2B (AF465650)	95
JG37-AG-29	AJ519367	1	Agricultural soil bacterium SC-I-8 (AJ252612)	96
			Uncult. bacterium BCTP21 (AF485788)	91
JG37-AG-39	AJ519369	1	Uncult. bacterium FW3 (AF523989)	90
			Uncult. Acidobacterium YNPRH5A (AF465658)	91
JG37-AG-40	AJ519370	1	Uncult. bacterium TM1 (X97097)	94
			Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	95
JG37-AG-52	AJ519373	1	Uncult. bacterium TM1 (X97097)	96
			Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	94
JG37-AG-76	AJ519381	1	Uncult. bacterium TM1 (X97097)	94
			Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	94
JG37-AG-89	AJ519383	1	Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	95
			Uncult. bacterium TM1 (X97097)	93
JG37-AG-93	AJ519384	1	Uncult. bacterium KF-JG30-18 (AJ295656)	93
			Uncult. bacterium TM1 (X97097)	93
JG37-AG-42	AJ519371	1	Uncult. Acidobacterium SMS9.16WL (AY043842)	94
			Uncult. Acidobacterium UA3 (AF200699)	94
JG37-AG-47	AJ519372	1	Uncult. bacterium WD244 (AJ292580)	96
			Uncult. bacterium WD298 (AJ292590)	97
JG37-AG-61	AJ519377	1	Uncult. Acidobacterium Cll114 (AF529322)	94
			Uncult. bacterium WD244 (AJ292580)	93

Klonbezeichnung	Accession Nr. EMBL ¹⁾	Anzahl der Klone	Nächsten Phylogenetischen Verwandten (EMBL ¹⁾ Nr.)	Blast % Ähnlichkeit ²⁾
Holophaga/Acidobacterium				
JG37-AG-54	AJ519374	1	Unident. bacterium 614 (Y11632)	94
			Uncult. bacterium FW111 (AF523982)	93
JG37-AG-56	AJ519375	1	Bacterial species RB24 (Z95717)	99
			Uncult. soil bacterium C028 (AF013527)	98
JG37-AG-58	AJ519376	1	Uncult. bacterium GOUTB8 (AY050595)	98
			Uncult. bacterium SHA-261 (AJ306764)	97
JG37-AG-67	AJ519378	1	Bacterium species Ep_T1.152 (Z73363)	97
			Uncult. Acidobacterium SMS9.16WL (AY043842)	94
JG37-AG-73	AJ519379	1	Bacterial species ii3-7 (Z95727)	94
			Bacterial species RB40 (Z95721)	93
JG37-AG-74	AJ519380	1	Uncult. Acidobacterium FTL227 (AF529104)	96
			Uncult. bacterium B27 (AF407719)	92
JG37-AG-81	AJ519382	1	Bacterial species RB25 (Z95718)	99
			Uncult. Holophaga/Acidobacterium Sva0515 (AJ241004)	93
JG37-AG-99	AJ519385	1	Uncult. bacterium C112 (AF013534)	95
			Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	93
JG37-AG-109	AJ519386	1	Uncult. bacterium FW120 (AF523988)	98
			Uncult. bacterium WD254 (AJ292582)	97
JG37-AG-144	AJ519391	1	Uncult. Holophaga/Acidobacterium Sva0725 (AJ241003)	92
			<i>Holophaga</i> sp. Oral CA002 (AF385537)	92
JG37-AG-145	AJ519392	1	Uncult. bacterium DA023 (Y07586)	93
			Agricultural soil bacterium SC-I-60 (AJ252644)	94
Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides				
JG37-AG-150		1	Benzene mineralizing consortium SB-5 (AF029041)	93
			Uncult. bacterium bacteriap17 (AF402976)	93
Actinobakterien				
JG37-AG-8	AJ519394	1	Actinomyces species TM208 (X92703)	99
			Actinomyces species TM214 (X92706)	98
JG37-AG-10	AJ519395	1	Uncult. bacterium a13101 (AY102345)	94
			Uncult. bacterium a13154 (AY102340)	93
JG37-AG-36	AJ519397	1	Uncult. bacterium a13101 (AY102345)	94
			Uncult. bacterium a13154 (AY102340)	94
JG37-AG-114	AJ519400	1	Uncult. bacterium a13101 (AY102345)	96
			Uncult. bacterium a13154 (AY102340)	95
JG37-AG-115	AJ519401	1	Uncult. bacterium a13101 (AY102345)	94
			Uncult. bacterium a13154 (AY102340)	94
JG37-AG-21	AJ519396	1	Uncult. bacterium #0319-7G21 (AF234148)	92
			Uncult. bacterium #0319-7E19 (AF34039)	92
JG37-AG-38	AJ519398	1	Uncult. bacterium #0319-7G21 (AF234148)	94
			Uncult. bacterium a13101 (AY102345)	90
JG37-AG-83	AJ519399	1	<i>Arthrobacter</i> sp. CAB1 (AB039736)	99,8
			Glacial ice bacterium Guliya200-A1 (AF479340)	99,8
JG37-AG-121	AJ519402	1	Uncult. bacterium #0319-6G9 (AF234132)	92
			Uncult. bacterium #0319-6A21 (AF234126)	92
Grüne Schwefelbakterien				
JG37-AG-84	AJ519406	1	Uncult. green sulfur bacterium GR-296.II.73 (AJ301570)	95
			Uncult. bacterium GR-296.II.11 (AJ296575)	92
JG37-AG-110	AJ519407	1	Uncult. green sulfur bacterium GR-296.II.73 (AJ301570)	92
			Uncult. bacterium JCL9-30 (AF499361)	97

Fortsetzung Tab. B2

Klonbezeichnung	Accession Nr. EMBL ¹⁾	Anzahl der Klone	Nächsten phylogenetischen Verwandten (EMBL ¹⁾ Nr.)	Blast % Ähnlichkeit ²⁾
JG37-AG-70	AJ519620	1	<i>Nitrospira/Leptosprillum</i> Unident. bacterium wb1_C17 (AF317762)	90
JG37-AG-131	AJ519405	1	<i>Nitrospira marina</i> (X82559) Unident. bacterium wb1_C17 (AF317762) <i>Nitrospira marina</i> (X82559)	92 91 93
JG37-AG-138	AJ519409	1	Neue Abstammungslinie Uncult. bacterium SMS9.36WL (AF432692)	99
JG37-AG-28		1	vermutliche Chimäre Bacterial species clone RB25 (Z95718) Metal-contaminated soil clone K20-80 (AF145868)	93 96
JG37-AG-141		1	Uncult. bacterium clone a13113 (AY102320) <i>Mesohizobium sp.</i> ORS1259 (AJ295081)	94 90

¹⁾ Einordnung basiert auf den nächsten Verwandten ²⁾ EMBL (European Molecular Biology Laboratorie) <http://www.ebi.ac.uk>, ³⁾ - es werden nur die in der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Untersuchung betrachten Teile der Gene berücksichtigt

Tab. B3: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe GUBH2

Proteobakterien				<i>Holophaga/</i> <i>Acidobacterium</i>	CFB ¹⁾	Candidate division OP8	Neue Abstammungslinie
α	β	γ	δ				
8	3	24	3	6	2	3	4
15%	6%	45%	6%	11%	4%	6%	7%

¹⁾ Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides

Tab. B4: Anzahl der predominanten Klone je Bakterienpopulation in der Bodenprobe Sh765B

Proteobakterien				<i>Holophaga/</i> <i>Acidobacterium</i>	<i>Bacilli</i>	Actino- bakterien	Grüne schwefelfreie Bakterien	Candidate division OP11	<i>Nitrospira</i> ähnlich	<i>Plancto- mycetales</i>
α	β	γ	δ							
4	1	10	5	2	18	2	10	1	3	2
7%	2%	17%	9%	3%	31%	3%	17%	2%	5%	3%