

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved avdeling for mikrobiologi, institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB) i perioden høsten 2009 til høsten 2010. Tema for oppgaven ble bestemt på bakgrunn gruppens forskningsområder og samtaler med Åsa Frostegård.

Det har vært et arbeid som har gitt meg gode erfaringer innenfor laboratoriearbeid og forskningsmiljø og mye nyttig kunnskap som er godt å ha med seg videre.

Jeg vil takke mine veiledere Åsa Frostegård og Linda Liberg Bergaust for en flott og fremragende veiledning med både laboratoriearbeid og skriving, og for å bruke så mye av deres tid på meg. Deres kritikk og råd har vært til stor hjelp for meg og min oppgave. En stor takk rettes også til Grethe Kobro og Else Marie Aasen som har hjulpet meg med utstyr og teknikker på laboratoriet.

Jeg takke Mari Christine Brekke for å ha hjulpet meg med å flytte komma og sette punktum samt gitt gode råd og trøst når oppgaven har tatt overhånd og jeg har mistet motivasjonen. Jeg vil også takke familie og venner, spesielt min mor som alltid hatt tro på meg. Til slutt vil jeg nevne minnet om min far, som var en stor pådriver for min masterutdanning.

Trondheim, Desember 2010

Lise Anita Steinan Alstad

Sammendrag

Denitrifikasjon er en viktig del av den globale nitrogensyklusen der nitrat (NO_3^-) eller nitritt (NO_2^-) blir redusert trinnvis til nitrogen monoksid (NO), lystgass (N_2O) og til slutt nitrogen i gassform (N_2) under anoksiske eller semi-anoksiske forhold som et alternativ til aerob respirasjon. Reduksjonen av N-oksidene skjer ved benyttelse av reduktasene nitratreduktase (Nar/Nap, gen: *nar/nap*), nitrittreduktase (Nir, gen: *nirS* eller *nirK*), NO reduktase (Nor, gen: *nor*) og N_2O reduktase (Nos, gen: *nosZ*). Prosessen utføres av bakterier i over 60 ulike phyla, samt enkelte *Archaea* og eukaryote organismer, og er en viktig kilde til utslipp av NO og N_2O . N_2O er en ozonnedbryter og en drivhusgass som er omtrent 300 ganger mer potent enn CO_2 , og har en halveringstid på 160 år i atmosfæren.

I denne oppgaven ble det fokusert på karakteriseringen av denitrification regulatory phenotype (DRP) hos ulike stammer innen slekten *Thauera*. DRP er en samlebetegnelse på en rekke fenotypiske og regulatoriske karakteristika som har implikasjoner for en gitt denitrifiserende organismes overlevelse og $\text{N}_2\text{O}/\text{NO}$ utslipp til omgivelsene. I denne oppgaven ble det særlig fokusert på akkumulering av NO og N_2O , samt transkripsjon av reduktasegenene (*nir*, *nor*, *nos*) under og etter overgang fra aerob respirasjon til denitrifikasjon. Enkelte stammer innenfor slekten *Thauera* innehar to distinkte utgaver av genet som koder for cytokrom *cd₁* –nitrittreduktase, *nirS*. Tre stammer ble dermed valgt for å representere slekten *T.sp 27*, som har genene *nirS1* og *nirS2*, *T.sp 28* som kun har *nirS2* og *T.linaloolentis* kun har *nirS1*. De ulike stammene av *Thauera* ble dyrket i renkulturer i et semiautomatisk inkubasjonssystem der det ble målt konsentrasjoner av O_2 , NO, N_2O og N_2 i kulturene. På bakgrunn av gasskinetikken, ble prøver tatt ut på interessante tidspunkter og transkripsjon av *nirS1* og/eller *nirS2*, *norB* og *nosZ* ble kvantifisert ved hjelp av real-time PCR. Etchebehere og Tiedje rapporterte 2005 at *nirS1* var uttrykt konstitutivt i *T.sp 27*. Dette var derimot ikke tilfelle i følge våre resultater. Funnene i denne oppgaven viste for de stammene som hadde *nirS1* at ble uttrykt allerede ved lav konsentrasjon av oksygen i kulturen, og økte kraftig ekspresjonen under anoksiske forhold i kulturen, og at *nirS2* var uttrykt kun under anoksiske forhold i kulturen. *T.sp 27* var den stammen som hadde den høyeste ekspresjonen av *nirS*. Alle stammene hadde en stringent kontroll av NO, noe som betyr at de undersøkte stammene er følsomme for gassen og har en kontrollert regulering av NO akkumulering.

N₂O så ikke ut til å være gjenstand for like streng regulering og stammene akkumulerte varierende mengder under denitrifikasjon.

Det eksperimentelle oppsettet som er beskrevet her gir et unikt innblikk i dynamikken rundt denitrifikasjon. Tette, presise målinger av headspace-gasser i kombinasjon med hyppig transkripsjonsanalyse danner grunnlaget for detaljert karakterisering av denitrifiserende bakterier, med videre implikasjoner for deres overlevelse og bidrag til N₂O og NO utslipp fra mer komplekse systemer.

Summary

Denitrification is an important part of the global nitrogen cycle. Nitrate (NO_3^-) or nitrite (NO_2^-) is reduced stepwise to nitric oxide (NO), laughing gas (N_2O) and finally nitrogen in gaseous form (N_2) under anoxic or semi-anoxic conditions. The process is executed as an alternative to aerobic respiration. The reduction of the N-oxides is executed by the reductases nitrate reductase (Nar/Nap, gene *nar/nap*), nitrite reductase (Nir, gene *nirS* or *nirK*), nitric oxide reductase (Nor, gene: *nor*), and nitrous oxidoreductase (Nos, gene: *nosZ*). The process is carried out by bacteria spread over 60 different phyla, as well as some *Archaea* and eukaryote organisms. It is also an important process in the emission of NO and N_2O . Denitrification is responsible for 70 % of the total N_2O emissions. N_2O is a green house gas that is 300 times more potent than CO_2 , and has a residence time of 160 years in the atmosphere.

In this thesis, it was focused on the characterization of denitrification regulatory phenotype (DRP) of different strains within the genus *Thauera*. DRP is a collective term for a variety of phenotypic and regulatory characteristics that have implications for the survival for a given denitrifying organism and emission of NO and N_2O to the environment. In this task, it was focused on accumulation of NO and N_2O , and the transcription of the reductase genes (*nirS*, *norB* and *nosZ*) during the transition from aerobic respiration to denitrification. Some strains within the genus *Thauera* possess two distinct versions of the gene coding for cytochrome cd1-nitrite reductase, NirS. Three strains were thus selected to represent the genus *T.sp 27*, who has the genes *nirS1* and *nirS2*, *T.sp 28* that has only *nirS2* and *T.linaloolentis* only *nirS1*. It was also focused on the nitrite reductase *nirS*, which is responsible for the reduction of nitrite to NO. Three *Thauera* strains were chosen in this task; *T.sp 27* expresses the genes *nirS1* and *nirS2*, *T.sp 28* *nirS2*, and *T.linaloolentis* expresses *nirS1*.

The three *Thauera* strains were incubated in pure cultures in a semi automatic incubation system. The concentrations of O_2 , NO, N_2O and N_2 were measured. On the basis of gas kinetics, the samples taken out in interesting times and transcription of *nirS1* and / or *nirS2*, *norB* and *nosZ* were quantified using real-time PCR. Etchebehere and Tiedje reported in 2005 that *nirS1* was expressed constitutively in the *T.sp 27*. This was however not the case

according to our results. The results from this study showed for the strains that *nirS1* was expressed already at low concentration of oxygen in the culture, and increased expression under anoxic conditions in culture, and that *nirS2* was expressed only under anoxic conditions in culture. *T.sp 27* was the strain that had the highest expression of both of the *nirS* types. All strains had a strict control of NO, which means that the investigated strains are sensitive to the gas and has a controlled regulation of NO accumulation. Variation in regulation of accumulated N₂O, and in general, the gas accumulated faster than it was reduced. In non closed environments, the denitrification carried out by *Thauera* would have contributed to emission of the green house gas N₂O.

This experiment gives us a unique insight into the dynamics around denitrification. Precise measurements of gasses in headspace in combination with rapid analysis of expression gives us an detailed characterization of denitrifying bacterias, with further implications of their survival and contribution to N₂O and NO emissions from more complex systems.

Forkortelser

ANR- Anaerob regulering av arginin deiminase og nitrat reduktase

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

Bp- Basepar

DRP- Denitrification regulatory phenotype

EDTA- EtylenDiamin TetraAcetat

FNR- Fumarat og nitrat reduktase

KNO₃⁻- Kaliumnitrat

mL- Milliliter

mM- Millimol*liter⁻¹

N₂- Dinitrogen

Nar/Nap- Nitratreduktase

Nir/NirS- Nitrittreduktase

ng- nanogram

N₂O- Nitrogenoksid/Lystgass

NO₃ - Nitrat

NO₂- Nitritt

NO- Nitric Oxide

Nor /NorB- Nitric Oxidereduktase

Nos /NosZ- Nitrogenoksidreduktase

O₂- Oksygen

PCR- Polymerase kjedereaksjon

RPM-Runder per minutt

μL-Mikroliter

μg- Mikrogram

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Summary	IV
Forkortelser	VI
1 Innledning.....	4
1.1 Nitrogensyklusen	4
1.2 Denitrifikasjon.....	7
1.3 Reduktaser og gener i denitrifikasjon.....	10
1.3.1 <i>Nar-genene</i>	10
1.3.2 Nitratreduktaser	11
1.3.3 <i>nir-genene</i>	12
1.3.4 Nitrittreduktaser	13
1.3.5 <i>Nor-genene</i>	14
1.3.6 NO reduktaser	14
1.3.7 <i>Nos-genene</i>	15
1.3.8 N ₂ Oreduktaser	15
1.4 Regulering av denitrifisering.....	16
1.5 Thauera.....	17
1.6 Målet med oppgaven.....	18
2 Material og metoder	20
2.1 Teori.....	20
2.1.1 Inkubasjonsrobot.....	20
2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
2.1.3 Revers transkripsjon PCR.....	24
2.1.4 Gelelektroforese.....	24
2.1.5 Real Time PCR.....	25
2.1.6 Sekvensering.....	27
2.2 Materialer og metoder	28
2.2.1 Bakteriestammer	28

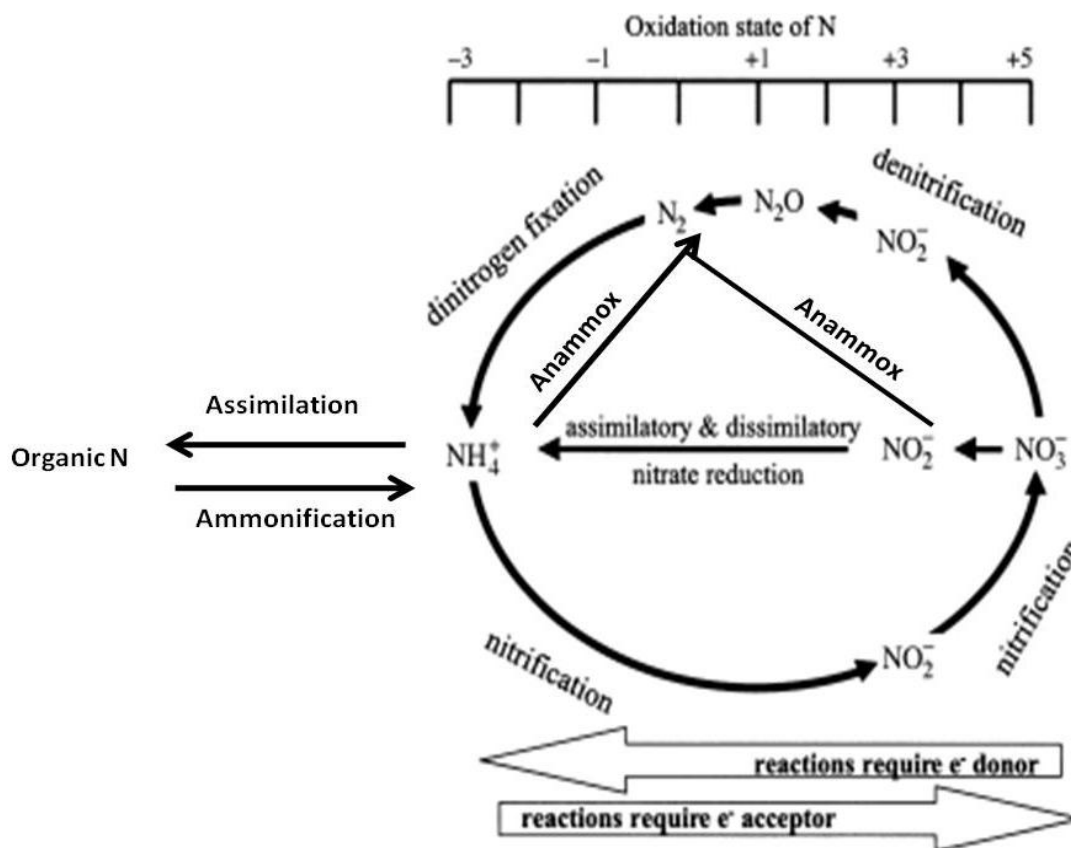
2.2.2	Medier	28
2.2.3	Kultivering av bakterieisolat.....	29
2.2.4	Lagring av bakteriekultur	29
2.2.5	Standardkurve celletall mot OD	30
2.2.6	Isolering av genomisk DNA.....	31
2.2.7	Måling av DNA/RNA konsentrasjon	31
2.2.8	Primere	32
2.2.9	Amplifisering av <i>nirS</i> , <i>norB</i> , og <i>nosZ</i> genene til benyttelse av standardkurve...	33
2.2.10	Gradient PCR	35
2.2.11	Touch down PCR.....	36
2.2.12	ERIC PCR	36
2.2.13	Agarose gelelektroforese	38
2.2.14	Rensing av PCR produkt	39
2.2.15	Sekvensering.....	39
2.2.16	Forsøk med semiautomatisk inkubasjonssystem	41
2.2.17	Isolering av RNA	43
2.2.18	DNase-behandling	44
2.2.19	Syntese av cDNA.....	44
2.2.20	Standardkurve til bruk i real time PCR	45
2.2.21	Real time PCR.	46
3	Resultat.....	49
3.1	Bestemmelse av celletall	50
3.2	PCR.....	51
3.2.1	PCR produkt til standardkurve	51
3.2.2	Deteksjongrense ved real time PCR	53
3.3	ERIC PCR.....	54
3.4	Ekspresjon av denitrifikasjonsgener ved aerob dyrking.....	56
3.5	Undersøkelse av aggregering	57
3.6	Sekvensering av <i>norB</i>	59
3.7	Gasskinetikk og ekspresjonsprofil hos <i>T.sp. 27</i> . Forsøk 1	60
3.7.1	Gasskinetikk.....	60
3.7.2	Ekspresjonsprofil av <i>Thauera sp. 27</i> . Forsøk 1	60

3.8	Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av <i>T. sp. 27</i> . Forsøk 2.....	63
3.8.1	Gasskinetikk.....	63
3.8.2	Ekspresjonsprofil	63
3.9	Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av <i>T.sp.27</i> med ny puls av oksygen.....	66
3.9.1	Gasskinetikk.....	66
3.9.2	Ekspresjonsprofil	66
3.10	Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av <i>T.sp.28</i>	69
3.10.1	Gasskinetikk.....	69
3.10.2	Ekspresjon av denitrifikasjonsgener.....	69
3.11	Gasskinetikk og ekspresjonsprofil for <i>T. linaloolentis</i>	73
3.11.1	Gasdata	73
3.11.2	Ekspresjon av denitrifikasjonsgener.....	73
3.12	DRP sammenfatning av grunnleggende parametre	75
4	Diskusjon	76
5	Referanseliste.....	84
6	Vedlegg.....	89
6.1	Vedlegg 1	89
6.2	Vedlegg 2	94
6.3	Vedlegg 3	99
6.4	Vedlegg 4	104
6.5	Vedlegg 5	107

1 Innledning

1.1 Nitrogensyklusen

Nitrogen er et av de viktigste elementene i alle organismer og står for nær 6,25 % av deres tørrvekt (1). Det er en kritisk komponent for aminosyrer og nukleinsyrer og er dessuten fundamental for alle biokjemiske prosesser hos organismer (2). Atmosfæren består av ca 78 % av trippelbundet nitrogen (N_2) i gassform og dette er det største reservoaret av nitrogen. I denne formen kan ikke nitrogenet benyttes biologisk av andre organismer enn enkelte mikroorganismer (2, 3). Nitrogen i ulike oksiderte og kjemiske former kan benyttes og omformes av mikroorganismer på land og i sjø (2).



Figur 1.1: Oversikt over oksiderte og reduserte former av nitrogen og forløpet gjennom nitrogensyklusen. Bildet er et modifisert bilde hentet fra Stoltz og Basu, 2002 (4).

Nitrogensyklusen er sammensatt av flere prosesser som nitrogenfiksering, ammoniumassimilering, ammoniummineralisering, nitrifikasjon, nitratreduksjon, og

assimilatorisk og dissimilatorisk nitratreduksjon (Figur 1.1) (3). I disse prosessene inngår dinitrogen i en rekke reaksjoner der det oksideres og reduseres (oksidasjonstall fra -3 til +5). Prosessene utføres av ulike organismer som eubakterier, arker (*Archaea*), noen sopparter og planter, og danner til sammen den biologiske nitrogenzyklusen (1).

Nitrogenfiksering av N_2 utføres utelukkende av prokaryote organismer. En felles betegnelse for denne funksjonelle gruppen er diazotrofer og endeproduktet fra prosessen er ammoniakk (NH_3). Diazotrofer står for hovedandelen av fiksert nitrogen til biosfæren (60 %) (3). De er funnet blant bakterier og arker, og finnes enkeltlevende organismer, i symbiotiske forbindelser eller assosiert med planterøtter. De er enten kjemotrofer eller fototrofer og kan fikse nitrogen i aerobe, anaerobe eller mikroaerofile miljø(1, 5). Enzymkomplekset nitrogenase er sentralt i reduksjonen av N_2 til NH_3 og enzymet er sensitivt for oksygen, noe som betyr at prosessen hovedsakelig foregår anaerobt. Det finnes likevel tilfeller der prosessen utføres av aerobe mikroorganismer hvor de respirerer ved en høy rate for å holde O_2 konsentrasjonen nede, eller helt aerobt der bakteriene har mekanismer som beskytter enzymet mot oksygen (1, 3, 6). Mengden av fiksert nitrogen varierer etter hvilken bakterie det er, og hvilke miljøer og tilstander de befinner seg i. Bakterier som er assosiert med planterøtter fikserer større mengder nitrogen (2-300 kg N/hektar/år) enn frittlevende bakterieceller (1-2kg N/hektar/år). I akvatiske miljø er det fotosyntetiske bakterier, som for eksempel cyanobakterier, som står for hovedandelen av nitrogenfiksering (3).

Ammoniumassimilering er en prosess der ammonium (NH_4^+) assimileres inn i cellene for å danne aminosyrer, celleveggskomponenter og nukleinsyrer i en prosess som kalles ammoniumassimilering eller immobilisering. Molekylet blir inkorporert i α -ketoglutarat i dannelsen av glutamat, eller til glutamat for å danne glutamin som er nitrogendonor til syntese av aminosyrer og andre cellekomponenter som trenger nitrogen i sin syntese (3). Dannelsen av glutamin er det første organiske molekylet med nitrogen som dannes i nitrogenzyklusen (7).

Mineralisering av proteiner, celleveggskomponenter eller nukleinsyrer, også kalt **ammonifikasjon** skjer ved hjelp av ekstracellulære enzymer. I prosessen frigjøres ammonium som da blir tilgjengelig for å bli tatt opp av planter eller mikroorganismer som inkorporerer det i sin biomasse, eller det kan bli bundet til organisk materiale og immobilisert.

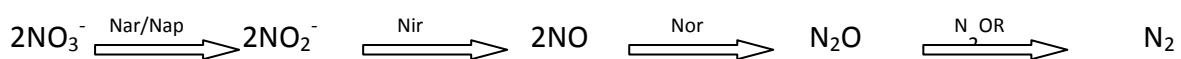
Ammonium som ikke er blitt immobilisert, eller andre reduserte former av uorganisk og organisk nitrogen, kan bli konvertert til nitrat i en prosess som kalles **nitrifikasjon**. Den utføres hovedsakelig av kjemoautotrofe organismer, men kan også utføres av noen metylotrøfe og noen heterotrofe bakterier (3, 8). De mest studerte nitrifiserende bakteriene tilhører slektene *Nitrosomonas* og *Nitrobacter*. *Nitrosomonas* oksiderer ammonium til nitritt, mens *Nitrobacter* oksiderer nitritt til nitrat (3). I senere tid er det også oppdaget at nitrifikasjon også kan utføres av flere typer av arker (*Archaea*) (9). Nitratet som produseres kan videre benyttes i **nitratassimilering**, en prosess som utføres av planter, sopp, alger og bakterier. Nitrat (NO_3^-) tas opp i cellene og reduseres til NH_4^+ via NO_2^- i to reaksjoner. Redusert NH_4^+ blir inkorporert inn i karbonskjelettet og brukt som biomasse (3). Nitritt og ammonium benyttes i anammox (anaerob ammonium oksidasjon). Det er en ganske nyoppgdaget prosess der bakterier i ordenen *Planctomycetales* tar opp NH_4^+ og oksiderer det til N_2 med NO_2^- som elektronakseptor. Anammox er betegnet som den viktigste prosessen for å bringe nitrogen tilbake til atmosfæren i ferskvann og marine miljø(10).

Dissimilatorisk nitratreduksjon beskrives som to separate dissimilatoriske nitratreduksjonsreaksjoner; dissimilatorisk nitratreduksjon til ammonium (DNRA) og denitrifikasjon. DNRA benytter nitrat som en terminal elektronakseptor for å produsere energi og oksidere organiske komponenter og danne ammonium. Den andre typen av dissimilatorisk nitratreduksjon er denitrifikasjon, der nitrat reduseres til N_2 gjennom flere steg der det dannes uorganiske mellomprodukt (3, 11). Denitrifikasjon står som tema i denne oppgaven og vil bli beskrevet grundigere.

1.2 Denitrifikasjon

Denitrifiserende bakterier er stort sett fakultativt anaerobe heterotrofer og finnes i over 60 phyla hos bakterier samt noen arker og eukaryote organismer (12). De fleste kjente denitrifiserende bakterier hører til α og β klassene innen *Proteobacteria*, men de finnes også innenfor gruppene γ - og ϵ *Proteobacteria* (13). Bakteriene er blitt isolert fra jord, marine sediment, ferskvannsediment og i kloakkrensingsanlegg, og respirerer vanligvis oksygen når det er tilgjengelig (14). I jord påvirkes tilgjengeligheten av oksygen av vanninnhold i jorden som følge av regn, vanning og påvirkning av grunnvann, sammensetningen av jorden, planterøtter og generell vegetasjon, samt mikrobiell respirasjon (14).

Denitrifikasjon er en viktig del i nitrogensyklusen der nitrat (NO_3^-) omgjøres ved respiratorisk reduksjon til nitrogen gass (N_2). Reaksjonen er sekvensiell og består av fire separate trinn der det kreves fire enzymer for å fullføre prosessen (Figur 1.2) (1). Hvert av enzymene har en aktiv metallkofaktor som har betydning for reduksjon av nitrat, nitritt, NO og N_2O til nitrogen gass (N_2). Det finnes to typer av respiratorisk nitratreduktase hos prokaryoter, en membranbundet nitratreduktase (Nar) og en periplasmisk nitratreduktase (Nap). For reduksjon av nitritt benyttes en cytokrom cd_1 nitritt reduktase (cd_1Nir , ofte benevnt NirS) eller kopper nitrittreduktase (CuNir, ofte benevnt NirK). Reduksjon av NO katalyseres av reduktasen Nor, og N_2O reduksjon katalyseres av N_2OR (15).



Figur 1.2: Reduktasene og N-oksider som er involvert i reduksjonsstegene i denitrifikasjon. Detaljert forklaring i tekst.

Denitrifikasjonsprosessen genererer H^+ over cellens plasmamembran i elektrontransportkjeden og danner ATP. Denne prosessen kan benyttes av organismen der oksygentilgangen er begrenset. Et N-oxid benyttes som elektronakseptor i stedet for oksygen for genereringen av den elektrokjemiske gradienten. Reduksjon av nitrat til nitrogen gir en mindre energetisk gevinst ($\Delta G^\circ = -224 \text{ kJ}$) enn aerob respirasjon ($\Delta G^\circ = -238 \text{ kJ}$), og regulering av gener som reduserer nitrat til nitrogen, må derfor være godt koordinert til å uttrykkes under anoksiske forhold for at de denitrifiserende bakteriene skal kunne konkurrere i miljø med høyt selektivt press og varierende miljøforhold. Denitrifikasjonen

kontrolleres av flere faktorer i miljøet. Dette kan være tilgjengelighet av substrat som en elektrondonor, nitrat eller denitrifiseringsintermediat som nitritt eller NO. Tilstedeværelse av oksygen, tilgjengelighet av organisk karbon som energikilde og tilstedeværelse av denitrifiserende mikroorganismer. For at denitrifikasjon skal skje, må det være en karbonkilde, en elektronakseptor og elektrondonor tilstede (7, 14, 16). pH-verdien er også en av de viktigste regulatorer av denitrifikasjonsprosessen i naturlige miljøer som jord ved at det utsetter det mikrobielle samfunnet for selektivt press, som påvirker artssammensetningen. I tillegg virker pH direkte på enzymene som er involvert i denitrifikasjonen (6). Denitrifikasjonshastigheten har hos de fleste bakterier et pH optimum rundt 7-8. Prosessen går generelt langsommere ved lavere pH, men ifølge Bergaust et al. (6) er det reduksjon av N_2O til N_2 som påvirkes mest av lav pH, noe som gir økt N_2O/N_2 ratio. I de fleste tilfeller er denitrifisering en anaerob eller mikroaerofil prosess, men det er også funnet mikroorganismer som kan denitrifisere aerobt. *Microvirgula aerodenitrificans* benytter oksygen og nitrat og respirerer disse substratene samtidig (17). Aerob denitrifisering er fordelaktig i vannrenseanlegg for å fjerne nitrat, men i jord er det en stor ulempe siden N_2O inhiberes av oksygen, og dermed fører dette til økt utslipp av N_2O (9, 18).

I jordbruk, der det mikrobielle samfunnet kan bestå av over 5 % denitrifiserende bakterier er denitrifisering sett på som et problem siden en del av tilsatt nitrat reduseres til gasser og derved blir utilgjengelig for plantene. (12, 15). I kloakkvann er fjerning av nitrat ønskelig da opphopning av nitrat kan føre til eutrofi og dermed algeoppblomstring og ubalanse av vekst hos organismer i marine miljø og i enkelte tilfeller gir dette forverret vannkvalitet (15, 19).

I denitrifikasjonen dannes det mellomprodukter som NO_2^- , NO og N_2O , og i noen tilfeller kan emisjon av N_2O og NO forekomme (20, 21). Slike lekkasjer kan skje når tilgjengeligheten av nitrogenholdige komponenter (NO_x) som virker som elektronakseptorer for denitrifikasjon, blir større enn den enzymatiske reduksjonen. Slike situasjoner kan sees i områder der det er mye bruk av gjødsel (20). Det første reduksjonstrinnet i denitrifikasjonen danner nitritt (NO_2^-). Konsentrasjonen av nitritt er strengt regulert i naturen, og naturlige forekomster er lave da nitritt raskt blir redusert ved denitrifikasjon eller oksidert ved nitrifikasjon (22). NO, som er et av mellomproduktene under denitrifikasjon dannes når nitritt reduseres og det dannes energi. NO er betegnet som et viktig molekyl som benyttes av både planter og dyr

som en forsvarsmekanisme mot patogene mikroorganismer, siden høye NO-konsentrasjoner har høy reaktivitet og membranpermeabilitet (20, 23). NO er et reaktivt radikal som kan reagere med O_2 og O_2^- og danne nitrogendioksid (NO_2), nitrogentrioksid (N_2O_3) eller peroksynitritt ($ONOO^-$). Reaktiviteten til NO kan derfor endre mange biologiske molekyler blir forandret slik at de får endret sin funksjon. Et eksempel er når peroksynitritt og nitrogentrioksid ødelegger DNA-strengen og deaminerer nukleinsyrer. Radikalet danner også giftige forbindelser som har ulike cytotoxiske egenskaper. På grunn av reaktiviteten, er det viktig at bakterier kan eliminere høye konsentrasjoner av NO for at bakterien skal overleve. Enzymet NO reduktase reduserer NO til N_2O , og fjerner NO fra organismen (15, 20). Bakterier som mangler enzymet NO reduktase vil dø av forhøyede nivåer av NO med mindre de lever tett sammen med organismer som kan utføre NO reduksjon. Reduksjonen av NO danner N_2O , som er et inert mellomprodukt best kjent som lystgass (15). Gassen dannes under nest siste steg av denitrifikasjonen eller under biologisk nitrifikasjon. Det er en ikke-toksisk gass og det er dermed ikke nødvendig for bakterier å ha en stringent regulering av N_2O . En del bakterier mangler genet som koder for N2OR, men det er heller ikke alle denitrifiserende organismer som produserer fungerende N_2O -reduktaser selv om de har genet (24, 25).

Inhibering eller mangel på dette steget i denitrifikasjonen og de faktorene nevnt ovenfor, bidrar til global oppvarming siden N_2O ikke blir redusert til N_2 . N_2O har en nedbrytningstid på over 100 år og er en 300 ganger mer potent drivhusgass enn CO_2 (20, 26). I de siste årene har terristiske økosystemer stått for 57 % (9 Tg/år) av totale utslipp av N_2O (27). Jord er hovedkilden for atmosfærisk N_2O , der denitrifisering og nitrifisering står for over 2/3 av N_2O utslippene. De siste 250 årene har N_2O -konsentrasjonen i atmosfæren økt med ca 17 % (14, 15). N_2O og NO bidrar til økt drivhuseffekt ved at de fanger opp stråling fra solen som er reflektert av jordens overflate til troposfæren. Derifra går strålingen, som er ved en lengre bølgelende enn opprinnelig, tilbake til jordoverflaten eller til stratosfæren. Strålingen gjør at N_2O blir oksidert til NO, som igjen ødelegger ozonet (O_3). Dette medfører økt UV-stråling til jordas overflate (7). I et nylig arbeid (Ravishankara et al. 2009) blir det fastslått at N_2O er den viktigste nedbryteren av stratosfærisk ozon (28). Som nevnt er reduksjonen av N_2O til N_2 påvirket av pH (20). Dette er fordi noen av reduktasene som er involvert i reduksjonen har

aktive seter utenfor den cytoplasmiske membranen og er dermed utsatt for pH-endringer i omgivelsene. I den cytoplasmiske membranen er pH-nivået strengt regulert og stabilt, og cytoplasmiske reduktaser vil derfor ikke påvirkes. Andre grunner til utslipp av N_2O kan være at bakterier kun er delvise denitrifiserere. Det vil si at de mangler, eller ikke uttrykker genene for N_2O – reduktaser, og vil dermed ikke redusere N_2O til N_2 (15, 27). Dette kalles forkortet denitrifisering. Kravet for at en organisme skal kunne kalles en denitrifiserende organisme er at den kan redusere et nitrogenoksid-anion til gass (18). Enkelte bakterier utfører også en to-steps denitrifisering. Dette er en sjelden prosess der nitritt blir redusert til N_2O . Et eksempel på dette er *Neisseria meningitidis* som i anaerobe miljøer får energi ved å redusere nitritt til N_2O (18).

Denitrifisering er en prosess som har stor betydning for det globale miljøet og for global oppvarming. Forskning og kartlegging av denitrifiserende økosystemer øker forståelsen av hva som fremmer prosessen og hvordan den utføres.

1.3 Reduktaser og gener i denitrifikasjon

Denitrifikasjonsgenene, reduktasene og reguleringen av disse er studert i detalj kun for noen få modellorganismer. For *Thauera spp.* er kun enkelte denitrifikasjonsgener og involverte reduktaser beskrevet i litteraturen.

Fullstendig denitrifikasjon til dinitrogen krever reduktasene nitratreduktase som kodes av *nar*, nitrittreduktase kodet av genet *nir*, NO reduktase kodet av genet *nor*, og N_2O reduktase kodet av genet *nos* (29). Reduktasene er forbundet med energikonservering i bakterienes membran. Når hvert av intermediatene i denitrifikasjonen blir redusert av enzymene kan protoner beveges over membranen for og til slutt danne ATP (15).

1.3.1 *Nar*-genene

Ekspresjon av *nar*-genene skjer ved lave oksygenkonsentrasjoner og ved tilstedeværelse av nitrat eller nitritt (13). Genene *narGHI* koder for subenhetene, mens *narJ* koder for en komponent som er nødvendig for at $\alpha\beta$ komplekset til Nar skal modnes og samles (21, 30). Operonet til *narGHI* ses ofte sammen med genet *narK*, et transmembrant transport protein

som har en mulig funksjon som transportør av nitrogen oksanioner (21). Det er foreslått at genene som koder for *nar* er mobile og kan overføres via horisontal genoverføring og derfor finnes i sammenheng med både denitrifikasjon og dissimilatorisk nitratreduksjon (4).

Nap, som er den periplasmatiske reduktasen kodes av *napA* (den katalytiske subenheten NapA) og *napB* (elektronoverførings-subenheten NapB) (21). Det er spesielt fire gener (*napABCD*) som er felles for alle (foreløpig med ett kjent unntak) prokaryote *nap*klustre (30). *napA* koder for reduktasen med bis-MGD, *napB* koder for dihemet, og *napC* koder for et tetrahem c type cytokrom c og sammen utgjør disse et funksjonelt enzym. Funksjonen til *napD* er noe ukjent, men det er trolig at den er med på å modne og samle Nap (30, 31). Genene *napEKFGH* varierer i sammensetning i ulike bakterier. Det er kun genene *napF*, *napG* og *napH* som foreløpig har en kjent funksjon. Disse koder for de cytoplasmiske proteinene NapF, NapG og NapH som binder 4Fe4S grupper (30, 31). Det er også foreslått av Rob J.M van Spanning et. al (31) at NapFG kan fungere som en alternativ elektronoverføringsmekanisme for reduksjon av nitrat.

1.3.2 Nitratreduktaser

Nitratreduktaser er hovedsakelig mononukleære molybdenenzymer som er medlem av dimethylsufoxid (DMSO) reduktasefamilien, og katalyserer reaksjonen NO_3^- til NO_2^- . Det finnes tre typer av disse reduktasene i prokaryoter, NAR(respiratorisk nitrat reduktase), NAP (dissimilatorisk nitrat reduktase) og NAS (assimilatorisk nitrat reduktase). Disse har en kofaktor Mo-*bis*-MGD (Mo-*bis*-molybdopterin guanin dinukleotid), og minst en 4Fe-4S ved deres aktive sete styrt av pyranopterinokofaktorer (4, 13, 20, 32). Proteobakterier som kan redusere nitrat kan inneha begge reduktasene beskrevet nedenfor, mens noen bare har en (33). Der begge reduktasene finnes er det noe uklart hvilken funksjon Nap har. Det er et mindre konservert enzym enn Nar, og varierer fra bakterie til bakterie. Det er tenkt at den kan ha en funksjon i overgangen fra aerob respirasjon til denitrifikasjon (33).

Membranbundede nitratreduktaser (Nar) finnes hos proteobakterier, firmicutes, actinobacteria og arker (33). Det er et enzym satt sammen av tre subenheter (NarGHI) og to domener. NarG er en stor α -subenhet på ca 140 kDa. Denne α -subenheten innehar det katalytiske setet med Mo-*bis*-MGD kofaktoren og 4Fe-4S kluster og er vendt inn mot

cytoplasma (20, 30, 32). De to andre subenhetene er NarH og NarI. NarH (β -subenhet, 60kDa) har fire Fe-S sentre og er bundet med en quinol dehydrogenasesubenhet. NarI (γ subenhet, 25kDa) er et membranprotein med fem transmembrane helikser og et lavpotensielt *hemb* på den periplasmatiske siden, og et *hemb* med høyt potensial på den cytoplasmiske siden av subenheten (20, 21, 30, 32). NarG og NarH danner et cytoplasmisk domene og NarI et eget domene som binder NarG og NarH til cellens membran på den cytoplasmiske siden. NarHI innehar elektronoverføringscentre som får elektroner via oksidasjon av quinol og benytter proton-drivkraften for generering av ATP. Oksidasjonen frigjør H^+ og to elektroner som overføres fra *hemb* med lavt potensial til *hemb* med høyt potensial og genererer en elektrokjemisk gradient over membranen. Deretter vil elektronene fra *hemb* på NarI overføres til NarH og så til Mo-*bis*-MGD kofaktoren i NarG. Overføringen fører til at nitrat blir redusert til nitritt i det katalytiske setet i NarG (20) (32).

Den periplasmatiske reduktasen Nap finnes kun i proteobakterier. Den benytter, som Nar, også quinoloksidasjon i elektrontransportkjeden, men ikke på samme måte som Nar. I Nap-komplekset vil elektroner gå inn i periplasma der nitrat reduseres til nitritt i stedet for å benytte energien til å danne proton-drivkraft (32, 34). Nap er et enzym satt sammen av to subenheter. Disse er NapA (90kDa) som innehar det katalytiske setet og binder bis-MGD kofaktoren og 4Fe4S-gruppen, og NapB (16kDa) som binder to c-hem molekyl. NapB står for overføringen av elektroner til NapA (30). Elektronene fra oksidasjon av quinol passerer gjennom NapC og NapB til et katalytisk sete med Mo-*bis*-MGD kofaktor og 4Fe-4S kluster på NapA. Den periplasmatiske reduktasen (NAP) kan uttrykkes av bakterien under aerobe forhold, mens den membranbundede(NAR) uttrykkes kun anaerobt (30).

NAS, assimilatorisk nitrat reduktase er forbundet med fiksering av nitrogen til biosfæren og har ingen kjent betydning i denitrifikasjon (4).

1.3.3 *nir*-genene

Nitrittreduksjonsenzymene *nirS* koder for cd_1 nitritt reduktase (cd_1Nir), og *nirK* genet koder for kopper nitritt reduktase (CuNir). Det finnes ingen beskrivelser av organismer som har begge disse genene. Generelt er disse genene undertrykt av ammoniakk, og oksygen har liten betydning for uttrykket at disse genene(13). Genet *nirS* er en del av en kluster der det

befinner seg flere gener ansvarlig for dannelsen av nitritt reduktase. NirS er en cytokrom cd_1 nitritt reduktase og krever hemD₁. Genet som koder for hemet er en del av genklusteret i nærheten av *nirS* (13, 21). I *P.aeruginosa* koder *nirM* for elektrondonoren cytokrom c_{551} (21). Antall gener involvert i reduksjon av nitritt og deres sammensetning varierer i ulike bakterier, men det er noen konserverte gener som finnes i nesten alle denitrifiserende bakterier. Et eksempel på dette er et enzymkompleks som er med i modningen av hem d₁ og er med på å inkorporere det i nitrittreduktasen NirS (31).

1.3.4 Nitrittreduktaser

I følge Zumft, 1997 (13) er nitritt reduktase nøkkelenzymet i denitrifikasjonen, da det katalyserer den første reduksjonen til et gassintermediat (NO_2^- til NO). Det er to typer nitrittreduktaser; CuNir som inneholder kopper, og cytokrom cd_1 Nir som inneholder hem (35). Nir er en pH-avhegning reduktase som har *in vitro* optimum mellom pH 5.8 og 7. Ved en lavere pH er det vist at cd_1 Nir inaktiveres (36).

NirS består av periplasmiske homodimere (120Da) med to like monomerer. I hver monomer innehar hem c og hem d₁ med to metallsentre. Monomerene er oppbygd i to domener; en stor og en liten, hvorav det lille domenet inneholder hem c og overfører elektroner til hem d₁ i det store domenet av monomeren. Hem d₁ i det store domenet fungerer som et katalytisk sete. Reduktasen katalyserer både NO_2^- og O₂, noe som er spesielt siden reaksjonene bygger på ulike prinsipper (20, 36). Reduktasen cd_1 Nir benytter noe ulike elektronbærere etter hvilken bakterie som har enzymet. De kan være c-cytokrom som cyt_{550} , cyt_{551} cyt_{554} eller kopperproteiner som azurin eller pseudoazurin (37). CuNir, også kalt kopper nitrittreduktase, finnes kun i denitrifiserende bakterier og er bygd opp av en homotrimer der hver av de identiske monomerene har to kopperområder (4). CuNir innehar to typer kopperområder; type I og type II (36). Type I innehar elektroner som overføres til type II som er det katalytiske setet der substratet bindes. Enzymet benytter hovedsakelig azurin og pseudoazurin som elektrondonor.

1.3.5 *Nor*-genene

NO reduktaser kodes av genene *norC* og *norB* der enzymene NorC og NorB danner subenhetene i komplekset til NO-reduktasen. Der *norC* koder for den membranbundne subenheten som overfører elektronene til den katalytiske subenheten NorB (21). Et operon *norCBQD* koder for proteinet. NorQ og NorD er med på at NorBC skal aktiveres. Noen denitrifiserende bakterier innehar også genene *norEF* som koder for proteiner som stabiliserer og modner NorBC (31). For å transkribere *nor* kreves det i *P. denitrificans* og *P. aerguinosa* Fnr-regulatoriske proteiner. Disse aktiverer transkripsjon når oksygen er fraværende. Genene som koder for disse regulatorene finnes nær *nor*-genene (21).

1.3.6 NO reduktaser

For å forhindre celleødeleggelse må NO reduseres raskt for å unngå toksiske konsentrasjoner. Dette krever reduktaser som fungerer effektivt under denitrifisering (13, 20). Enzymet som er ansvarlig for reduksjon av NO er NO reduktase (Nor) kodet av genet *norBC* (38). Dette enzymet katalyserer reaksjonen $2\text{NO} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ og er den reduktasen som danner N-N binding under denitrifiseringsprosessen (24, 39).

Det er beskrevet tre underklasser av enzymet i bakterier, basert på typen elektronoverføringsentre de benytter; cNOR (cytochrom c elektrondonor), qNOR (quinol elektrondonor) og qCu_A Nor (20, 40). qNor finnes i denitrifiserende bakterier, men også i bakterier og arker som benytter reduktasen i forsvar mot NO (40). Av de tre underklassene er cNor best beskrevet i litteraturen. Den består som nevnt av to subenheter NorC og NorB. Subenheten NorC (17 kDa) er en mono hem c-cytokrom og er membranbundet. Den har sin N-terminale ende som en enkel transmembral heliks inn mot cytoplasma. Denne fungerer som en elektronakseptor for elektrondonorene pseudoazurin og periplasmisk cytochrom c₅₅₀ og overfører elektronene til NorB via hem c-cytokromet i NorC til hem b i NorB (15, 20, 41). NorB (56kDa) er den største subenheten, Den fungerer som den katalytiske enheten og består av tolv hydrofobe transmembrane helikser som binder tre metallkofaktorer (hem *b*, hem *b*₃ og jern) Metallkofaktorene overfører elektroner fra hem c-cytokrom i NorC til hem *b*₃, som er det aktive setet (13, 15, 39).

1.3.7 *Nos-genene*

Det er funnet ti gener som er involvert i reduksjon av N_2O (18). Gener som koder for N_2O -reduktase er unikt for denitrifiserende bakterier og det er konservert (42). Det transkriberes fra de syv genene *nosRZDFYLX* (31, 43). Genet *nosZ* koder for den katalytiske reduktasen NosZ og er uttrykt fra hele seks promotore, mens *nosDFYL* koder proteiner som sørger for at kopper inkorporeres i reduktasen. *nosRX* er med på å regulere transkripsjon av *nosZ*, aktivere enzymet og inkorporere kopper (13, 31).

1.3.8 N_2O reduktaser

N_2O reduktase katalyserer reduksjonen av N_2O til N_2 og er det siste steget i denitrifikasjonsprosessen (20, 42). N_2O reduktase, som forøvrig er den eneste kjente reduktasen som reduserer N_2O til N_2 , er lokalisert i periplasma hos bakterien og består av en homodimer der hvert av monomerene er bundet med seks kopperioner fordelt på de to områdene Cu_A og Cu_Z . Disse to områdene befinner seg på to ulike domener på monomeren; Cu_A befinner seg på den C-terminale enden, og Cu_Z på den N-terminale enden. På denne måten vil det ikke kunne være mulig at det skjer en elektronoverføring innad i monomeren på grunn av avstanden (40 Å). Det vil derimot skje en elektronoverføring på tvers av monomerene da de er bundet antiparallelt med Van der Waals bindinger i de hydrofobe områdene. Dimerstrukturen gjør at Cu_A og Cu_Z kan danne en katalytisk enhet (15, 20, 26). Cu_A er et Cu-elektronoverføringscenter som overfører sine elektroner til Cu_Z , en μ_4 sulfid-Cu bundet tetranukleær katalytisk senter på den N-terminale enden (18, 20). Hvordan Cu_Z reduserer og binder N_2O er ikke helt forstått enda, men i *Paracoccus pantotrophus* blir Cu_Z katalytisk aktiv når N_2O -reduktase reagerer med cytokrom c og aktiverer en elektronoverføring mellom Cu_A og Cu_Z (20, 26). Reduktasen binder to kalsiumioner på hver monomer som er med på å danne dimerstrukturen i enzymet og er med på å sørge for elektronoverføring mellom elektronoverføringscenteret til det katalytiske setet (18, 26).

Reduktasen er foreløpig kun isolert fra gram negative denitrifiserende bakterier, men enkelte gram positive bakterier som *Desulfitobacterium hafniense* er bærer av en *nosCZ-orf-nosDLFY* gruppe i genomet (18, 27).

1.4 Regulering av denitrifisering

Størst betydning for regulering av denitrifisering og uttrykk av denitrifikasjonsgener er oksygen, nitrat og NO. Produkter fra reduksjon av et substrat vil fungere som substrat for neste reaksjon i denitrifikasjonen noe som også er med på å regulere uttrykk av genene (20, 31). Regulatoriske faktorer i de ulike denitrifiserende bakteriene varierer mye, men disse er stort sett homologer eller ortologer av hverandre. I de aller fleste tilfeller uttrykkes denitrifikasjonsgener kun når oksygenkonsentrasjonen er lav eller fraværende og nitrat eller nitritt er tilstede. Grunnen til dette er at ved tilstrekkelig høye konsentrasjoner av oksygen er det energetisk mer gunstig å respirere aerobt i forhold til å denitrifisere (31).

Oksygensensorer som har betydning for regulering i denitrifisering er FixL (i enkelte arter av *Bradyrhizobium*) og proteiner som ligner Fnr (fumarat og nitratreduktaseregulatorisk protein) (31). FixL er et membranbundet sensorprotein som er i kompleks med FixJ. FixJ fungerer som regulatoren. FixL har en hem-gruppe som binder oksygen. Dette resulterer i en endring i proteinet som inaktiverer kinaseaktiviteten som igjen hindrer autofosforylering av fosfat som normalt er overført til FixJ. FixJ vil da ikke kunne aktivere transkripsjon av genene den er regulator for (31, 44). Fnr er et transkripsjonelt regulatorprotein funnet i *E.coli* som er ansvarlig for regulering av gener involvert i anaerob metabolisme. Den er medlem av Crp-Fnr regulatorfamilien som finnes i nesten alle grupper av *Bacteria*, spesielt i γ -*proteobacteria* der de er best studert og forstått. Den kan fungere både som en aktivator og repressor og kan også regulere seg selv (45). Regulatorproteinet Fnr har et domene med 4Fe-4S-gruppe som er følsomt for signal fra oksygen. Binding av oksygen vil føre til at gruppen deles i biter og dermed inaktiverer Fnr ved at den ikke kan bindes til DNA. En senkning i oksygenivået vil føre til at 4Fe-4S-gruppen samles igjen og gjør at Fnr kan bindes til en Fnr boks på en promotor (31, 44). Mange homologer av Fnr er funnet i denitrifiserende bakterier. I *Pseudomonas aeruginosa* finner man homologen Anr (anaerob regulering av arginin deiminase og nitrat reduktase) og i *Paracoccus denitrificans* FnrP. (13, 20, 31, 45). Dnr/Nnr er som nevnt en regulator ansvarlig for regulering av nitritt- og NO-gener. Det finnes flere ortologer av denne i flere denitrifiserende bakterier som har gener for Nir og Nor, og er ansvarlig for transkripsjon av disse genene som respons på NO. Regulatorene kan også være fylogenetisk ulike etter om de regulerer genene for NirS eller NirK (31).

For nitrat og nitritt er sensorene NarXL, NarQP og NarR av betydning i flere denitrifiserende bakterier (23, 31). NarX som en del av NarXL komplekset og NarQ som en del av NarQP komplekset fungerer som sensorer følsomme for nitrat og nitritt, der NarX har høyest affinitet for nitrat og NarQ har høyest affinitet for nitritt. Binding av de respektive substratene fører til at selve regulatorene i kompleksene (NarL og NarP) vil binde DNA og kontrollere ekspresjon av reduktaser som er ansvarlig for reduksjon. NarXL kontrollerer ekspresjon av *narGHJ* (31, 43). NarR, en mulig erstatning for NarXL i *Brucella suis*, *B. melitensis*, *P.denitrificans* og *P.pantotrophus* og er nødvendig for transkripsjon av *narKGHJ* genene. Proteinet krever nitrat eller nitritt for å uttrykkes (31, 44). Det er beskrevet flere NO-følsomme Fnr-regulatorer: i *Pseudomonas spp* og noen β -proteobakterer finner man Dnr, *P. denitrificans* og *Bradyrhizobium japonicum* har NnrR (21, 23). Hvordan Dnr og NnrR fungerer som regulatorer er ikke fullt ut forstått med tanke på deres respons til NO (44). For NO-signalet i noen β -proteobakterier er NorR viktig for reguleringen av transkripsjonen av NO reduktaser. NorR kan binde NO til et jernsenter i proteinet. Dette stimulerer ATPase-aktivitet i NorR og vil aktivere RNA polymerase og dermed transkripsjon av NO reduktaser (23, 31). Dette er et viktig trinn i denitrifikasjonen siden det er kritisk for bakterien å holde et lavt nivå av NO. Flavohemoglobin fungerer som en viktig beskytter mot NO. Proteinet kan redusere NO til N₂O eller oksidere det til nitrat. I *E. coli* er genet for flavohemoglobin uttrykt når NO når forhøyede konsentrasjoner og forårsaker stress. Dette krever en Fnr_{EC} som binder DNA og fungerer som en repressor for uttrykket av flavohemoglobin (44).

1.5 Thauera

Slekten *Thauera* isolater hører til β -subklassen av Proteobacteria og finnes ofte i aerob eller anaerob jord, kontaminert jord, sediment og kloakkrensaneanlegg . De lever på metabolisering av lavmolekylære aromatiske og non-aromatiske substrat under aerob respirasjon og denitrifikasjon, men er begrenset i katabolisering av karbohydrater (46-48). Det er funnet at *Thauera* og *Azoarcus* er to viktige genera i rollen for å fjerne quinolin under denitrifikasjon (49). *Thauera* er en kompleks genus som består av mange morfologier og fysiologiske trekk. Slekten plassering er basert på 16s fylogeni, og er estimert til å ha 64-69% mol G-C innhold (48). Bakteriene er mesofile og hovedsaklig gram negative staver og i enkelte tilfeller kokkoide eller korte staver. De vokser best under pH 7,5-8,0 og temperatur mellom 28-40 °C

, og krever karbondioksid eller bikarbonat i sitt vekstmedium (46-48). Bakteriene kan være mobile ved hjelp av peritriker (*T.terpentica*, *T.mechnichensis*) eller polare flageller (*T. aromatica* og *T.chlorobenzoica*), eller immobile og uten flageller som *T.linaloolentis*(46).

I denitrifikasjonen benytter *Thauera* NirS for reduksjon av nitritt, NorB for reduksjon av NO og NosZ for reduksjon av N₂O til N₂. De stammene som ble benyttet i denne oppgaven (*Thauera* sp.27, *T.sp. 28* og *T.linaloolentis*) har ulike utgaver av genet *nirS*. Det er blitt funnet at *T.sp. 27* har to utgaver av genet *nirS* (*nirS1* og *nirS2*). *T.sp 28* har kun *nirS2*, og *T.linaloolentis* har kun *nirS1* (50). Som denitrifiserende bakterier danner de mellomprodukter som NO og N₂O. Dette er gasser som er beskrevet som skadelige klimagasser. Tidligere er det funnet stammer innen *Thauera* som har forkortet denitrifikasjon. *T.phenylacetica* mangler reduktaser N₂OR, og reduserer dermed ikke N₂O til N₂.(9)

1.6 Målet med oppgaven

Denitrifikasjon er en måte for bakterier å overleve perioder av anoksiske forhold. Et av mellomproduktene ved denitrifikasjon er lystgass (N₂O), som er en av de mest betydningsfulle klimagassene, og også den viktigste årsaken til ødeleggelsen av stratosfærisk ozon. Et overordnet mål i forskningsgruppen ved IKBM, UMB er å finne løsninger på hvordan utslippet av biologisk produsert lystgass kan minkes. For dette trengs det økt kunnskap om hvordan ulike bakterier regulerer overgangen fra aerob respirasjon til denitrifikasjon i respons til ulike miljøfaktorer, og hvordan dette påvirker deres nettoproduksjon av mellomproduktet lystgass, N₂O.

Denitrifikasjon er kjent fra et bredt spektrum av heterotrofe bakterier, men er bare blitt studert mer i detalj for noen få modellorganismer, fremfor alt innen gruppen α -proteobakterier. I denne oppgaven har vi sammenlignet ulike stammer fra slekten *Thauera*. Dette er en gruppe bakterier som tidligere er relativt lite studert. I Etchebehere og Tiedje (50) er det beskrevet at *T.sp.27* uttrykte genet *nirS1* etter respons på nitrat, mens genet *nirS2* ble uttrykt uavhengig av nitrat eller oksygen. I oppgaven er det også fokusert på nettopp dette. Til sammenligning ville man også til *T.sp.28* med *nirS2* og *T.linaloolentis* med genet *nirS1*. Et riktig bilde av det genotypiske og fenotypiske denitrifikasjonsmønsteret (denitrification regulatory phenotype, DRP) og genotype til disse bakteriene ville man få når

man kombinerte et robotisert inkuberingsystem som målte gasser produsert under aerobe og anaerobe forhold, samt å måle ekspresjon med real-time PCR ved å bruke tilpassede primere og prober. I denne prosessen kunne man derfor samle datasett for å bedre forstå *Thauera* i forhold til andre denitrifiserende organismer, deres respons på varierende konsentrasjoner av oksygen, overgangen fra aerobe til anaerobe forhold, og deres kinetikk av mellomprodukter produsert under denitrifikasjon (NO, N₂O og N₂)

2 Material og metoder

2.1 Teori

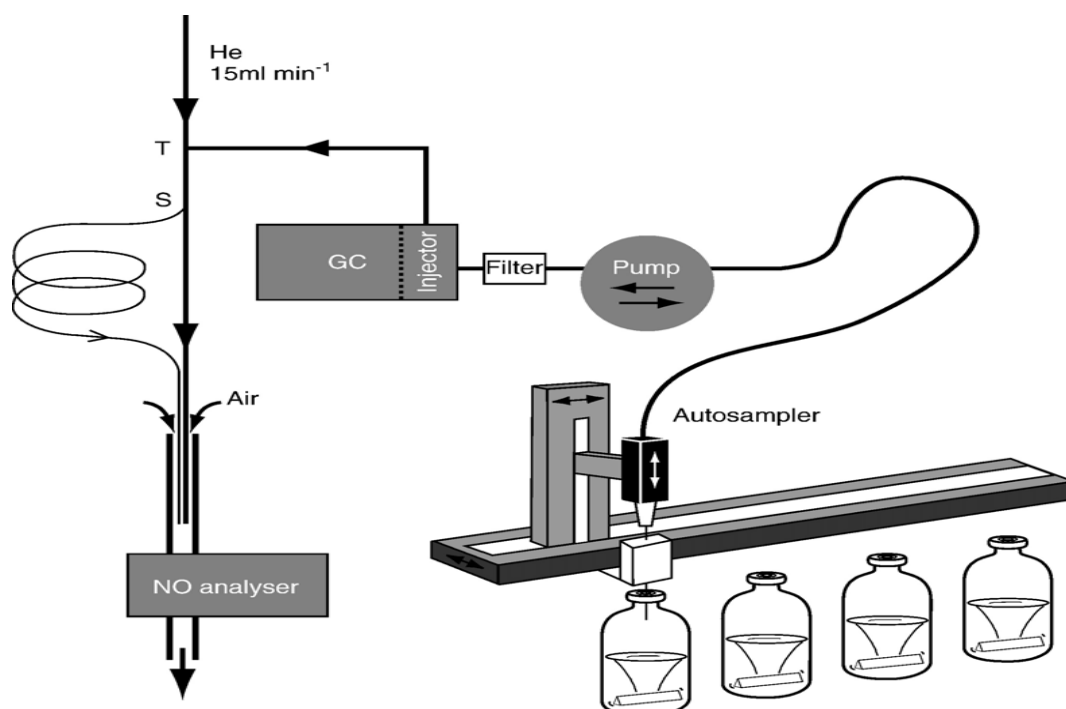
2.1.1 Inkubasjonsrobot

Hos IPM ved UMB ble det utviklet et semiautomatisk inkubasjonssystem som gir et fenotypisk bilde av denitrifikasjonsmønsteret hos bakterier i renkulturer eller i mer komplekse økologiske system som for eksempel jord. Denne semiautomatiske metoden tillater oss å karakterisere de denitrifiserende organismene etter hvordan de akkumulerer eller reduserer gasser (O_2 , NO, N_2O , N_2 og CO_2) under aerobe og anaerobe forhold. Slike studier kan gjøres i kombinasjon med genotypiske studier med fokus på ekspresjon av NOx-reduktaser under ulike stadier av denitrifikasjonen (51). Fenotypiske eksperimenter foregår under strengt kontrollerte forhold hvor utgangskonsentrasjoner av elektronakseptorer (oksygen, nitritt, nitrat) reguleres nøyaktig og nivået av molekylært nitrogen (N_2) holdes på et minimum. Dette gjøres ved at den naturlige atmosfæren i hver flaske erstattes med helium i gjentatte sykluser av evakuering og heliumfylling. Hver flaske er på forhånd tilsatt kjente konsentrasjoner nitritt eller nitrat og rent oksygen sprøytes inn etter heliumrensing. I robotens vannbad er det plass til 15 120 mL serumflasker med røring (850 rpm), i tillegg til seks 120 mL flasker uten røring. Konstant og kraftig røring er viktig ved dyrking av bakteriekulturer for å sikre god gassutveksling mellom medium og gassfase, samt hindre at cellene aggregerer. For å få standardiserte forhold i de forseglede flaskene blir de "vasket" med helium før analysering. Evakuering av eksisterende gasser i flasken og fylling av helium skjer ved repetitive sykluser under røring. Røringen er også her spesielt viktig for å få en god gassutveksling mellom væske og gassfasen i flasken. Overtrykket som dannes i flasken elimineres ved å stikke en sprøyte fylt med vann gjennom septa. Da vil overtrykk gå ut og luft vil ikke kunne gå inn i flasken.

En automatisk prøvetaker (Figur 2.3) tar prøver fra hver av de 15 flaskene i tillegg til en lav, høy og NO-standard. Sammensetningen av standardene er beskrevet i Tabell 2.1. De 15 prøvene står i et vannbad under en konstant temperatur og røring på 950 RPM, og standardene står i de plassene i vannbadet uten røring.

Tabell 2.1: Oversikt over sammensetning av standarder benyttet i inkuberingsforsøk.

Standard	Komponent	Konsentrasjon i parts per million (ppm).
Høy standard	CO ₂	10000
	CH ₄	10000
	N ₂ O	150
Lav standard	CO ₂	361
	N ₂ O	585 (ppb)
	CH ₄	1,84
	O ₂	210000
	N ₂	780000
NO standard (i N ₂)	NO	25



Figur 2.3 Fremstilling av det semiautomatiske inkubasjonssystemet sammen med en gaskromatograf og en NO analyser. For videre forklaring henvises det til teksten (51).

Den automatiske prøvetakeren er av typen Gilson Model 222 (Gilson, leBel, Frankrike) og benytter en peristaltisk pumpe av typen Gilson Minipuls 3.

For hver gang det tas en prøve vil det pumpes inn samme mengde helium som det er tatt ut prøve for å holde det samme trykket i flasken (51). N_2O , N_2 , O_2 og CO_2 i prøvene analyseres ved en Varian CP4900 microGC. Gasskromatografen har to separate kolonner (10m poraPLOT U og 20m 5Å Molsieve) hver med sin injektor og TCD (thermal conductivity detector). NO ble målt ved hjelp av en kjemoluminisent NO_x analysator (51). Nålen på prøvetakeren penetrerer septa på ulike plasser hver gang den tar prøver. Dette hindrer feilkilder som lekkasje. Eventuelle lekkasjer som likevel måtte oppstå, blir tatt høyde for i beregningen av data på et senere tidspunkt (51).

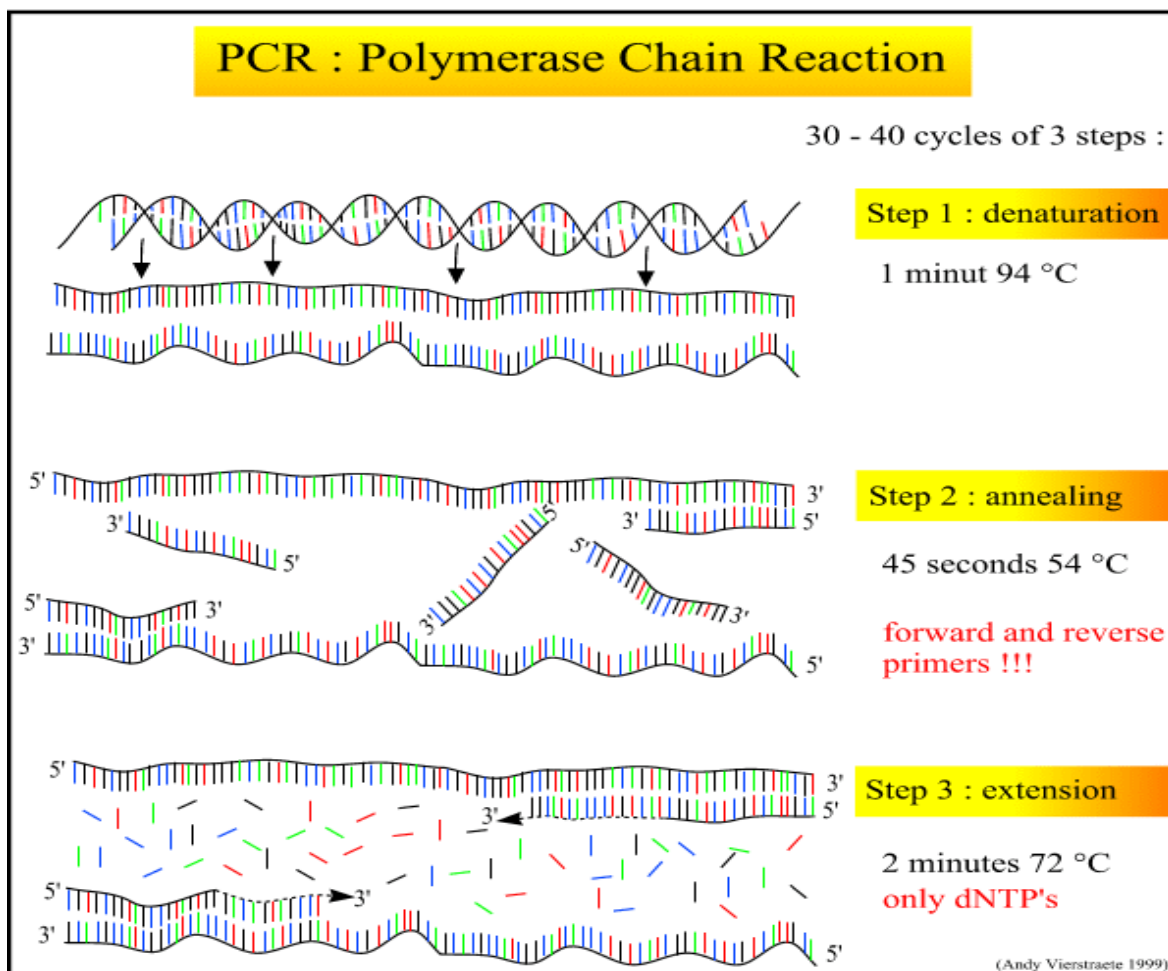
2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction er en sensitiv metode der en DNA sekvens av interesse oppamplifiseres ved å bruke en DNA polymerase i kombinasjon med primere som er komplementære til ønsket sekvens. Metoden går ut på at man har en syklus som amplifiserer den ønskede sekvensen og produserer et konsentrert produkt basert på primerne som er valgt. En PCR-reaksjon har tre faser: Eksponensiell fase, lineær fase og en platåfase (Figur 2.4). I begynnelsen har man den eksponentielle fasen der produktet i hver syklus øker eksponentielt. I den lineære fasen øker mengden av PCR-produkt lineært i hver syklus på grunn av at reagenser reaksjonen begynner å bli begrensede. Deretter inntreer platåfasen. Her skjer det en liten eller ingen økning som følge av at PCR-reagenser er oppbrukte, eller at polymerasen er inaktiv.

I en syklus er det flere steg; det første steget har en høy temperatur (94 °C) som sørger for denaturering av DNA til to enkeltråder ved at hydrogenbindingene mellom nukleotidene brytes. Dette krever energi og derfor en høy temperatur. Smeltetemperaturen til en gitt DNA sekvens bestemmes av antall A/T (2 hydrogenbindinger) mot antall G/C (3 hydrogenbindinger). Sekvenser med høyt G/C-innhold har en høyere smeltetemperatur enn

sekvenser med høyt A/T-innhold (52). I neste trinn senkes temperaturen til det nivå som er optimalt for annealing av det gitte primerparet, vanligvis mellom 50 til 60 °C. Optimal annealingstemperatur kan bestemmes ved hjelp av en gradientPCR hvor samme reaksjonsblanding utsettes for ulike temperaturer i annealingtrinnet. Dette trinnet gjør at primerne (forward og reverse primer) festes til komplementære sekvenser på det enkelttrådede DNAet i prøven (52). Deretter økes temperaturen til 70-72 °C og en varmetolerant DNA polymerase vil feste seg til primerne og syntetisere komplementære fragment til targetDNA. I dette trinnet blir varigheten justert etter lengden av fragmentet man ønsker, en må også beregne polymerasens hastighet da dette kan variere for ulike produsenter.

Etter dette trinnet vil syklusen begynne på et nytt denatureringssteg. Teoretisk vil antall kopier av det aktuelle fragmentet dobles i hver syklus (52).



Figur 2.4: Fremstilling av trinnene i en PCR reaksjon. Trinnene er beskrevet i teksten (53).

Denne oppgaven ble det utviklet en ERIC-PCR (enterobacterial repetitiv intergenic consensus PCR) metode for å undersøke om kulturene ble kontaminert under inkuberingsforsøkene. ERIC-PCR er en reproducerbar, billig og relativ enkel fingerprintingmetode som gir en profil over ulike stammers repetitive DNA (54). Sekvensene som er undersøkt er konserverte (55). Alle studerte gram negative stammer har disse repetitive sekvensene i sitt DNA, og det er disse sekvensene som kan amplifiseres ved hjelp av PCR, og deretter kan PCR-produkt synliggjøres på en gel der de gir en profil med båndmønstre som kunne sammenlignes med andre profiler (56).

2.1.3 Revers transkripsjon PCR

En kan benytte prinsippet for PCR også for RNA i en metode som er kjent som revers transkripsjon. I denne metoden konverteres RNA i en prøve til cDNA (complementary DNA) for senere å kunne detektere produktet ved kvantitative metoder som Real-time PCR ved bruk av primere som er spesifikke for en ønsket DNA-sekvens.

Første steget i konverteres RNA til cDNA ved hjelp av en RNA avhengig DNA polymerase og danner en komplementær cDNA-streng av mRNA. For at polymerasen skal kunne transkribere benyttes oligonukleotidprimere eller tilfeldige heksamerprimere (3, 52). Deretter kan man benytte vanlig PCR for å amplifisere cDNA.

2.1.4 Gelelektroforese

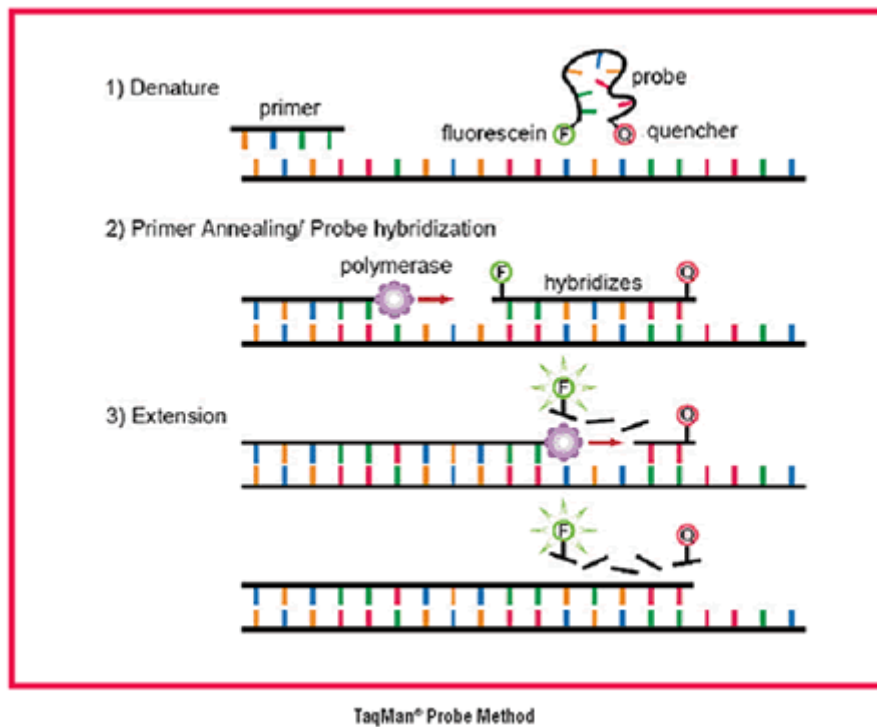
Etter en PCR reaksjon kan man kontrollere produktet på en agarosegel tilsatt ethidiumbromid. Denne metoden går ut på at gelen som består av små "porer" separerer DNA-fragmentene etter størrelse ved at den negativt ladede DNA-tråden vandrer fra negativ pol til positiv pol ved hjelp av strøm. Lange fragment vil møte stor motstand og vil ikke kunne vandre så raskt, men et lite fragment vil kunne vandre raskere. Derfor vil man kunne separere fragmenter og dessuten synliggjøre de ved UV-bestråling. Man sammenligner fragmentet mot en størrelsesmarkør med kjente fragmentstørrelser.

Prøvene blir tilsatt en loadingbuffer som er tyngre enn 1xTAE bufferen i elektroforesekaret, og gjør at prøven lett synker i bunnen av brønnen. Den tilsatte ethidiumbromiden vil binde seg til DNA og gjøre det synlig i UV-lys der intensiteten korrelerer til mengde DNA-produkt.

2.1.5 Real Time PCR

Real time polymerase chain reaction er en metode basert på der en måler og kvantifiserer data ved å måle fluorescensen av amplifisert DNA eller cDNA i en prøve etter hver PCR-syklus der fluorescensen øker proporsjonalt med mengde av PCR-produkt. (57, 58). Denne teknikken har mange fordeler i forhold til andre metoder. Den er sensitiv og kan detektere kun en eneste kopi av et gen i en prøve. En annen fordel er at man ikke behøver å bearbeide prøvene i ettertid (57). En ulempe er at den krever kostbart utstyr og reagenser.

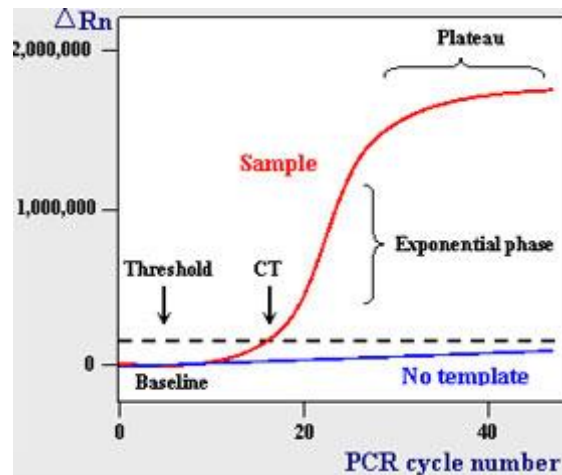
Det kan benyttes både genomisk DNA og cDNA som templat, og prinsippet kan baseres på DNA bindende farge som SYBR green eller hybridiseringsprober (58). SYBR green er en ikke-spesifikk fluorofor som ikke avgir fluorescens i ubunden form. Når den bindes til dobbeltrådet DNA vil den avgi fluorescens som korrelerer til mengde produkt. Den skiller ikke mellom uspesifikke produkter, og alt dobbeltrådet DNA vil gi signal. I denne oppgaven er det blitt benyttet hybridiseringsprober. TaqMan prober (Applied Biosystems) inneholder en fluorofor i 5`enden og en "quencher" i 3`enden som sitter tett sammen (Figur 2.5). Quencheren blokkerer fluoroforen fra å sende ut signal. Når proben bindes til en spesifikk sekvens på DNA-tråden, vil polymerase kløyve proben slik at fluorofor og quencher ikke vil interagere. Fluoroforene gir et målbart signal som korrelerer til mengde PCR-produkt (3). Taqman-metoden velges når man for eksempel er ute etter flere ulike gener i en og samme prøve, siden denne metoden er mer spesifikk på grunn av bruken av prober i tillegg til primere.



Figur 2.5: Fremstilling av Taqman-metoden steg for steg. For detaljert forklaring henvises det til teksten (59).

Signal for positivt PCR-produkt må være høyere enn bakgrunnssignalet (baseline) eller terskelverdien (treshold). C_t -verdien er den syklusen en prøve krysser terskelverdien, eller kan settes der PCR-reaksjonen er i en eksponentiell fase. Dette vil si at C_t verdien synker med økende antall genkopier i utgangsreaksjonen (Figur 2.6).

For å kvantifisere produkt i prøver med ukjent konsentrasjon, benyttes det en standardkurve der prøver med kjente konsentrasjoner benyttes til å kalkulere mengde templat.



Figur 2.6: Fremstilling av hvordan en real-time PCR kan se ut. Mengde produkt plottes mot syklusnummeret. Figuren viser også syklusens lineære fase, eksponentielle fase og platåfase (60).

2.1.6 Sekvensering

”Chain termination” DNA sekvensering er basert på en metode der singeltrådede DNA-molekyler separeres fra hverandre etter deres lengde for å bestemme rekkefølgen på baseparene ved hjelp av fluorescensmerkede dideoksynukleotider (52). Før en sekvenseringsanalyse blir det ønskede DNA-fragmentet amplifisert ved PCR. Produktet vurderes ved synliggjøring på gel og brukes deretter i en sekvenserings-PCR. DNA-fragmentene blir deretter separert til enkeltrådede sekvenser ved at forward og reverse primer blir benyttet i separate reaksjoner. I enkelte tilfeller der man er ute etter lengre fragmenter kan man benytte flere primere. Fire dideoksynukleotider forkortet ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, og ddCTP) inkorporeres i de enkeltrådede DNA-fragmentene av en DNA polymerase, som ikke skiller mellom en dNTP og en ddNTP. Hver av disse nukleotidene er fluorescensmerket med ulike farger, og mangler en 3`hydroksylgruppe. Når en ddNTP inkorporeres i DNAtården, vil reaksjonen terminere på grunn av den manglede 3`hydroksylgruppen. Videre syntetisering vil ikke kunne fortsette siden flere nukleotider ikke vil kunne etablere en binding til den foregående ddNTP (52). Etter gjentatte sykluser med termineringer, vil resultatet være DNA-fragmenter av ulike lengder der alle har en fluorescent ddNTP på enden. Fragmentene separeres etter størrelse ved gelelektroforese på kapillærkolonner og endenukleotidene detekteres ved hjelp av en fluorescensdetektor (52).

2.2 Materialer og metoder

2.2.1 Bakteriestammer

Tabell 2.2 Beskrivelse av stammene benyttet i denne oppgaven.

Stamme	Opprinnelse	Sted	Referanse
<i>Thauera sp. 27</i>	Anaerob slam	Michigan, USA	Etchebehere og Tiedje (2005)
<i>Thauera sp.28</i>	Anaerob slam	Michigan, USA	Etchebehere og Tiedje (2005)
<i>Thauera linaloolentis</i>	Aktivert slam	Tyskland	Mechichi <i>et al.</i> (2002)

2.2.2 Medier

Materialer

5 % komplekst medium:

NH₄Cl 0.45g

K₂SO₄ 0.05g

MgCl₂·6 H₂O 0.1g

CaCl₂·2H₂O 0.025g

NaHCO₃ 0.04g

NaAC 0.2g

Pepton 0.5g

Kjøtttekstrakt 0.3g

Metode

Kjemikaliene ble veid opp og overført til en målekolbe og pH ble justert med fosfatbuffer (Na₂HPO₄+ NaH₂PO₄) til en konsentrasjon på 0,1 M og pH 7.8.

Den tillagde løsningen ble sterilfiltrert i en autoklavert blåkorkflaske og lagret ved 4 °C.

2.2.3 Kultivering av bakterieisolat

Materialer

5 % komplekst medium fra punkt 2.2.2

120 mL serumflasker

Metode

Bakteriene i slekten *Thauera* ble dyrket i autoklaverte serumflasker i 50 mL sterilfiltrert 5 % komplekst medium ved 25 °C og røring (950 rpm). Ved dyrking av bakterier til eksperimenter ble bakteriene håndtert under sterile omgivelser for å hindre kontaminering. Bakterier fra frysestokk ble inokulert i 50 mL sterilfiltrert 5 % komplekst medium og inkubert aerobt i 25 °C under røring kraftig røring (950rpm). Dette ble gjort for å hindre aggregering av cellene som kunne ha ført til anaerobe mikromiljø i kulturen.

2.2.4 Lagring av bakteriekultur

Materialer

50 % autoklavert og sterilfiltrert glyserol

Nunc kryorør (Thermo Scientific)

Metode

Bakteriekulturene ble oppbevart i sterile kryorør i 15 % glyserol ved -80 °C. Glyserol ble sterilfiltrert før tilsetning.

2.2.5 Standardkurve celletall mot OD

Instrument:

Fluorescensmikroskop (Varian)

Spektrofotometer (Pharmacia)

Materialer

Akridinoransje

Nucleopor Track-Etch membran (Whatman)

Glass microfiber filter 25mm GF/F (Whatman)

Objektglass (Menzel-Gläzer)

Dekkglass (Menzel-Gläzer)

Okular med rutenett

Metode

For å lett kunne estimere tettheten av celler pr mL i en renkultur av bakterier ble det benyttet en standardkurve. Ved å bruke denne kunne tettheten regnes ut kun ved å måle OD₆₀₀.

For å lage standardkurve ble en tett dyrket bakteriekultur med maksimal OD₆₀₀ på 0,302 fortynnet med 5 % komplekst medium (1:1) i en fortynningsrekke på fem punkter. Det ble vurdert hvor mye prøve det skulle amplifiseres på Nucleopor Track-Etch membran-filtrene (Whatman) etter tettheten på celleduspensjonen. Ved mikroskopering ble det benyttet et okular med et rutenett der de ulike vannrette linjene i rutenettet ble kalt A, B, C og D med en loddrett linje Z. Linjene B, Z og C dannet en rute der en skulle telle cellene, og ideelt skulle bakterietettheten være på fem celler pr BZC-rute. Celleduspensjon ble blandet med lik mengde sterilfiltrert akridinoransjeløsning og inkubert i fem minutter. Et Nucleopor-filter ble plassert på en filtreringsanordning med et underliggende mikrofiberfilter for å beskytte Nucleoporfilteret fra å ødelegges under vaakum fra filtreringsanordningen. Den fargede celleduspensjonen ble tilsatt membranen med en sprøyte for å sikre jevn fordeling av cellene

utover membranen. Cellesuspensjonen ble sugd gjennom membranen ved hjelp av vakuum. I tillegg ble membranen vasket to ganger med sterilfiltrert MilliQ-vann. Membranen ble lagt på et objektglass med en dråpe parafin under og over membranen. Telling av celler ble gjort ved hjelp av et fluorescensmikroskop og okularet med rutenett. Det ble telt celler i tilfeldige områder over hele filteret. Deretter ble antallet bakterier på filteret beregnet ved formelen $N * (2 * 10^6)$ der N står for gjennomsnittet av talte bakterier pr BCZ rute. Konsentrasjon og fortykning ble tatt med i beregningene ved kalkulering av standardkurven.

2.2.6 Isolering av genomisk DNA

Materialer

QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen)

Metode

Genomisk DNA fra 1mL kultur av bakterier dyrket i 5 % komplekst medium ble isolert ved bruk av QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) etter protokoll i vedlegg 1. Det genomiske DNA som ble isolert ble benyttet som templat i PCR-reaksjoner.

2.2.7 Måling av DNA/RNA konsentrasjon

Instrument

Qubit fluoreometer (Invitrogen)

Materialer

Quant-iT[™] dsDNA BR buffer (Invitrogen)

Quant-iT[™] dsDNA BR reagent 200x (Invitrogen)

Quant-iT[™] dsDNA assay Kit (Invitrogen)

Quant-iT[™] RNA buffer (Invitrogen)

Quant-iT[™] RNA reagent 200x (Invitrogen)

Quant-iT™ RNA assay Kit (Invitrogen)

Metode

Konsentrasjon av DNA og RNA ble målt på Qubit fluoremeter (Invitrogen). 1 µL Quant-iT™ reagent ble blandet i 199µL Quant-iT™ buffer. Deretter ble 5µL av prøven (DNA eller RNA) som skulle kvantifiseres tilsatt 195 µL av bruksløsningen. I noen tilfeller måtte mengde DNA eller RNA tilsatt justeres om konsentrasjonen i produktet var høyere eller lavere enn kalibreringsområdet. Kalibreringskurven ble satt opp ved bruk av standarder i Quant-iT™ assay kit i henholdt til manual (vedlegg 2)

2.2.8 Primere

PCR ble benyttet til å oppamplifisere ønskede sekvenser av DNA. Til dette ble det benyttet primere fra invitrogen (Tabell 2.3).

Tabell 2.3 Oversikt over primere benyttet til PCR og deres sekvens i 5`til 3`retning brukt for å isolere nitrogen reduktaser. Primerne er produsert av Invitrogen.

Stamme	Gen	Primer	Primersekvens (5`til 3`)
<i>T.sp.27</i>	<i>nirS 1</i>	Forward	CGT GGC CGC CAT CAT C
		Reverse	GCC GGT TTC CTT CAC ATT GA
	<i>nirS 2</i>	Forward	ATC CGC AGT TCG GTC CG
		Reverse	AGA TCA GCG AAA CCA CG
	<i>nosZ</i>	Forward	GGC TGC AAG TTC TCC AAG GA
		Reverse	GCC GGA GAT GTC GAC AAA CT
	<i>CnorB(61)</i>	Forward 1	GAR TTY CTN GAR CAR CC
		Forward 2	GAC AAG NNN TAC TGG TGG T
		Reverse 6	GAA NCC CCA NAC NCC NGC
		Reverse 7	TGN CCR TGN GCN GCN GT

<i>T.linaloolentis</i>	<i>nirS</i>	Forward	GGC CGC TAC TTC CCT GGT T
		Reverse	CTT GCC GGT CTT GGT ATC GA
	<i>nosZ</i>	Forward	GCA GCC CAA GCA GGT GTA
		Reverse	GCC TCC TTC GCA TCC TTG A

2.2.9 Amplifisering av *nirS*, *norB*, og *nosZ* genene til benyttelse av standardkurve

Instrument

2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Materialer

Mastermix (se Tabell 2.4)

Forward primer (Tabell 2.3)

Reverse primer (Tabell 2.3)

MilliQ

Metode

PCR ble benyttet som metode for amplifisering av fragmenter av genomisk DNA.

Genomisk DNA ble tilsatt en mastermix beskrevet i Tabell 2.4. Det ble benyttet spesifikke primere fra tabell 2.2 etter hvilke gener som skulle amplifiseres. PCR reaksjonen ble utført etter Tabell 2.5

Tabell 2.4: Oversikt over reagenser og konsentrasjon benyttet for mastermix benyttet i PCR-reaksjonene for amplifisering av *nirS*, *norB* og *nosZ*

Reagens	Reagenskonsentrasjon	Volum	Konsentrasjon i løsning
GoTaq Buffer	5x	10µl	1x
MgCl	25mM	4 µl	2mM
dNTP	2,5mM	4 µl	0,2mM
Forward primer	10µM	2,5 µl	0,5mM
Reverse primer	10µM	2,5 µl	0,5mM
GoTaq polymerase	5U/mL	0,25 µl	0,05mM
Templat		5 µl	
H2O		21,75 µl	
Total		50 µl	

Tabell 2.5: Parametrene benyttet i amplifisering av *nir*, *nor* og *nos*

Temperatur i °C	Tid	Sykluser
95	2min.	
95	30sek.	33
62	30sek.	
72	20sek.	

72	5min.	
4	∞	

2.2.10 Gradient PCR

Instrument

Mastercycler gradient (Eppendorf)

Materialer

Se punkt 2.2.9

Metode

Gradient PCR ble utført for å kontrollere beste annealingtemperatur for primerne.

Mastermix ble laget ut i fra Tabell 2.4. Det ble testet for temperaturer ± 55 (45, 45.3, 46.4, 48.2, 50.4, 53, 55.8, 58.5 61 63,1 64.7, 65.6 °C) Programmet for PCR ble utført i følge Tabell 2.6

Tabell 2.6: Oversikt over prosedyren brukt for gradient PCR

Temperatur i °C	Tid	Sykluser
95	2min.	
95	30sek.	30
55 \pm 10	30sek.	
72	20sek	
72	5sek	
4	∞	

2.2.11 Touch down PCR

Instrument

Mastercycler Gradient (Eppendorf)

Materialer

Se punkt 2.2.9

Metode

For NorB ble det i Braker & Tiedje, 2003 anbefalt å benytte en touch down PCR. Denne ble utført i henhold til Tabell 2.7

Tabell 2.7: Metoden benyttet for touch down PCR.

Temperatur i °C	Tid	Antall sykluser
95	5 min	
95	30sek	10
57-52.5 (-0,5 pr syklus)	40 sek	
72	1 min	
95	30 sek	30
55	40 sek	
72	1 min	

2.2.12 ERIC PCR

Instrument

2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Materialer

Mastermix (Tabell 2.8)

Metode

Det ble laget en fingerprintprofil av alle *Thauera*-stammene som ble benyttet i forsøket.

Genomisk DNA fra alle stammene ble brukt som templat i en PCR reaksjon som i Tabell 2.8 og kjørt med PCR program vist i Tabell 2.9.

På en 1,5 % agarosegel ble 5 µL amplifisert produkt og 2 µL loading dye tilsatt. Gelen ble kjørt på 70V i 90 minutter.

Tabell 2.8: Komposisjon av ERIC-PCR bruksløsning

Reagens	Volum
PCR buffer 5x	5 µL
25mM Mg ²⁺	2 µL
2mM dNTP	2,5 µL
50uM Eric R1 primer	0,5 µL
50uM Eric R2 primer	0,5 µL
5U/Taq polymerase	0,35 µL
ddH ₂ O	Opp til 25 µL
DNA	20-40 ng
Totalvolum	25 µL

Tabell 2.9: PCR programmet benyttet for ERIC PCR

Temperatur i °C	Tid	Antall sykluser
95	7	
94	1	8
52	1	
65	8	
65	8	
4	∞	

2.2.13 Agarose gelelektroforese

Materialer

Agarose (Sigma)

TAE buffer 1x

Ethidumbromid (Arcus)

Størrelsesmarkør (BioLabs)

Loadingbuffer (Invitrogen)

UV-fotokammer(Bio-Rad)

Metode

Det ble laget en 1.5 % agarose gel (0,75 g agarose i 50mL 1xTAEbuffer) med 40 µL ethidumbromid. Agarosen ble fullstendig løst i TAE-bufferen ved bruk av mikrobølgeovn og nedkjølt før tilsetning av ethidumbromid. Gelen ble støpt i et støpekammer i romtemperatur slik at den kunne stivne. Deretter ble den satt i et elektroforesekammer fylt med 1xTAE buffer.

Templat og størrelsesmarkør, samt eventuelle kontroller ble applisert med loadingbuffer i brønnene nær den negative polen. Ved endt gelelektroforese ble gelen plassert i et kammer og fotografert ved benyttelse av GelDoc XR programvare. Fragmenter ble sammenlignet med størrelsesmarkøren.

2.2.14 Rensing av PCR produkt

Materialer

Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare)

Metode

Rensing av PCR produkt ble utført for å fjerne primerrester og elementer fra mastermix som ville kunne interferere med videre bruk av DNA til sekvensering.

PCR produkt ble rensset etter følgende metode fra manual. (vedlegg 3)

2.2.15 Sekvensering

Materialer

Forward primer (Tabell 2.3)

Reverse primer (Tabell 2.3)

Ready reaction mix

BigDye Sequencing buffer (Applied Biosystems)

MilliQ vann

3M Na-Acetate

96 % Etanol

70 % Etanol

125mM EDTA

Metode

Det ble lagd en mastermiks som i Tabell 2.10. En for forward-, og en for reverse primer. Mengde templat benyttet ble noe justert etter konsentrasjon av PCR produkt målt med qubit fluoremeter. Prøvene ble amplifisert i PCR-maskin etter program i Tabell 2.11, og deretter ble sekvenseringsproduktet renset ved at produktet (20 µL) ble overført til et sterilt eppendorfrør og tilsatt 52 µL 96 % etanol, 2 µL 125 mM EDTA og 2 µL 3M Na-Acetat. Dette ble vortexet og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter, og så sentrifugert ved 13000 rpm i 30 minutter. Supernatanten ble fjernet forsiktig med en pipette, og deretter ble det tilsatt 70 µL 70 % etanol ved at etanolen ble tilført slik at det gled sakte ned langs røret på motsatt side av pelleten. Dette ble så sentrifugert ved 13000 rpm i 15 minutter. Supernatanten ble fjernet, og pelleten ble lufttørket i sterilskap. Det rensede produktet ble fryst i -20 °C og levert til sekvensering. Resultat av sekvenseringen ble analysert i BioEdit og gjort om til FASTA-format. Sekvensene ble benyttet til design av primere til PCR-reaksjon og primer/prober til benyttelse i Real-time PCR.

Tabell 2.10: Komposisjon av bruksløsning benyttet i reaksjon for sekvensering

Reagens	Volum
Ready Reaction Premix	4 µl
BigDye Sequencing buffer	2 µl
Primer(3,2pmol)	3,2 µl
Templat(20-40ng)	4 µl
MilliQ Q H ₂ O	6,8 µl
Total	20 µl

Tabell 2.11: PCR programmet benyttet for amplifikasjon av sekvenseringsprodukt.

Temperatur i °C	Tid	sykluser
96	1 min.	
96	10 sek.	25
50	5sek.	
60	4 min.	
4	∞	

2.2.16 Forsøk med semiautomatisk inkubasjonssystem

Instrument

Allergra TM 25R Centrifuge (Beckman Coulter)

Semiautomatisk inkubasjonssystem (IPM)

Spektrofotometer (Pharmacia)

Materialer

5 % Komplekst medium

120 mL serumflasker

RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen)

Nunc Disposable Canial tubes 50 mL (Greiner)

Eppendorf Biopur 1,5 mL (Sigma-aldrich)

Metode

Bakterier fra glycerolstokk oppbevart ved -80°C ble dyrket dyrket aerobt i 50 mL fortynnet mineralmedium (0.5X). Under inkubering ble kulturene rørt med tresidet magnetrører i 950 rpm i 28 °C. Et fortynnet medium sørget for bedre kontroll av bakterievekst og lavere

celletall, og hindrer aggregering som kan forårsake anaerobe forhold og denitrifiseringsprosess på grunn av lavere celletetthet. Autoklaverte medisinflasker ble tilsatt 50 mL sterilfiltrert 5 % komplekst medium og 100 μ L nitrat og deretter forseglet med en etanolvaskede gummisepta med tilstammede aluminiumshetter rundt. Ved forsøkets start ble det tilsatt bakteriekultur, der mengden som ble tilsatt ble vurdert etter kulturens OD₆₀₀.

For å analysere bakterienes gassproduksjon ble det benyttet et semiautomatisk inkuberingssystem for å måle gassene i kulturene. Vannbadet hadde en temperatur på 25 °C med plass til 14 bakteriekulturer samt en blank under røring på 850 rpm, og en høy standard, en lav standard og NO standard var uten røring. Vannbadet hadde også ytterligere tre plasser uten mulighet for røring. Standardenes innhold og konsentrasjoner vises i Tabell 2.1. Blank inneholdt kun sterilfiltrert medium og var ikke inokulert med bakterier. På forhånd hadde prøvene, samt standardene blitt "vasket" med helium for å fjerne luft i flaskene. Dette ble gjort i sju sykluser med evakuering og fylling med helium ved hjelp av et semiautomatisk system bestående av en vakuumpumpe og en heliumtank. Under "vaskingen" ble prøvene rørt ved hjelp av en tresidet magnet ved 950 rpm. Overtrykket i flaskene ble utlignet og det ble deretter tilsatt 1 % oksygen. Under inkuberingen ble N₂, N₂O, O₂, CO₂ og NO målt i alle flaskene med to timers mellomrom. De 14 parallellene ble tatt ut ved ulike tidspunkt som var interessante for forsøket og fordelt nøyaktig på to 50 mL sentrifugerør (NUNC). I tillegg ble det tatt ut to mL prøve til nitritt og en mL til måling av OD₆₀₀. NUNC-rørene ble deretter sentrifugert (Allergra TM 25R Centrifuge) på 5100 rpm i 10 min ved 4 °C. Supernatanten ble forsiktig helt ut, og cellepellet ble tilsatt RNA protect. Cellene ble resuspendert og inkubert i fem minutter for så å bli overført til et Biopur eppendorfrør spesielt for RNA-analyser. Disse prøvene, samt nitrittprøvene, ble sentrifugert i 10 min ved 13400rpm. Supernatanten av RNA-pelletene ble helt av, og pelleten ble oppbevart ved -20 °C. For nitrittprøvene ble supernatanten overført til et nytt rør og fryst ved -20 °C. Etter endt forsøk ble prøvene oppbevart i -80 °C fram til de ble analysert.

2.2.17 Isolering av RNA

Materialer

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

β -mercaptoetanol (Sigma)

Lysozym (Merck)

TE-buffer (Sigma)

RNase Zap (Ambion)

Etanol

Metode

Cellepellet behandlet med RNA-protect fra punkt 2.2.16 ble tint og fortynnet slik at den inneholdt 5×10^8 - $7,5 \times 10^8$ celler.

Konsentrasjonen ble bestemt ut i fra OD_{600} målt i punkt 2.2.16 og sammenlignet med standardkurve lagd for den aktuelle stammen. *T.sp.28* ble antatt å ha samme vekstegenskaper som *T.sp.27* slik at den samme standardkurven ble benyttet. Standardkurve fra Øystein Andreassen ble benyttet for *T.linaloolentis*. Isoleringen av RNA ble utført i sterilbenk behandlet med RNase-zapp for å fjerne RNase. Også utstyr som ble benyttet under isoleringen og i tillaging av lysozymløsning ble behandlet med RNase-zapp for å hindre degradering av RNA i prøven. Videre behandling av cellepelleten ble utført i henhold til vedlegg 4. Først ble cellepelleten behandlet med en lysozymløsning $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ lysozym i TE-buffer. Løsningen ble lagd ny hver for hver isolering på grunn av degradering av lysozym. Etter utførelse av de videre trinnene i manualen før etanolelueringen ble det undersøkt om det var synlig cellemateriale i prøven etter behandlingstrinnene. Om det var det, ble det utført et ekstra sentrifugeringstrinn der prøven ble spunnet ned ved 13400 rpm i 5-10 minutter. Etanoleluering ble utført ved bruk av 96% etanol før lysatet ble overført til en RNeasy minispinn-kolonne og videre behandlet i henhold til manualen.

Konsentrasjonen av isolert RNA ble deretter målt med Qubit fluoremeter. For å hindre kontaminering av RNase ble løsninger beskrevet i punkt 2.2.7 laget i sterilbenk.

2.2.18 DNase-behandling

Materialer

DNase I kit (Sigma)

Nukleasefritt vann (BDH biochemical)

Metode

Før konvertering til cDNA måtte isolert RNA behandles med DNase for å fjerne genomisk DNA. Isolert RNA fra punkt 2.2.17 ble behandlet med DNase I kit etter protokoll for DNasebehandlig fra sigma (Vedlegg 5)

Tidligere har det ble vist at 15 minutters inkubering kan være for lite til å fjerne alt genomisk DNA. DNasebehandlingen ble derfor utvidet til to timer i romtemperatur, der løsningen med DNase og isolert RNA ble blandet med jevne mellomrom.

2.2.19 Syntese av cDNA

Instrument

2720 Thermal Cyclers (Applied Biosystems)

Material

High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems)

Metode

For å kunne analysere RNA med real time PCR må prøven bli konvertert til cDNA.

DNasebehandlet RNA fra punkt 2.2.18 ble konvertert til cDNA ved hjelp av High Capacity RNA-to DNA Master Mix etter metode beskrevet i Tabell 2.12.

Mengde DNasebehandlet RNA benyttet i reaksjonen ble bestemt ut i fra konsentrasjonen av RNA målt med Qubit fluoremeter.

Tabell 2.12 PCR program benyttet til cDNA syntese

Temperatur i °C	Tid	sykluser
25	5 min.	1
42	30 min.	
85	5 min.	
4	∞	

2.2.20 Standardkurve til bruk i real time PCR

Instrument

Qubit fluoremeter (Invitrogen)

Materialer

PCR-produkt (*nirS*, *norB* eller *nosZ*)

Nukleasefritt vann (BDH biochemical)

Metode

Standardkurve ble satt opp av PCR produkt fra punkt 2.2.9 for det aktuelle genet det skulle testes. Konsentrasjoner fra 10^7 kopier* μL^{-1} til 1 kopi* μL^{-1} i tillegg til en negativ kontroll på 0 kopier* μL^{-1} ble lagd.

Dette ble gjort ved å regne ut det primære PCR produkt med kjent konsentrasjon i $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ målt med Qubit fluoremeter, og lage en fortytning som tilsvarte 10^8 kopier* μL^{-1} . Deretter ble det fortyntet 1:10 helt ned til 1 kopi* μL^{-1} . Formelen som ble benyttet i utregningen var følgende:

$$\text{Masse}(m) = \text{basepar} \times \frac{660g \cdot \text{mol}^{-1}}{6,022 \times 10^{23}} \quad \text{Antall kopier} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}}{m}$$

2.2.21 Real time PCR.

Primere

Tabell 2.13: Oversikt over primer/probes fra Applied Biosystems benyttet i real-time PCR.

Stamme	Gen	Primer	Primersekvens (5` til 3`)
<i>T.sp.27</i>	<i>nirS 1</i>	Forward	CGTGGCCGCCATCATC
		Reverse	GCCGGTTTCCTTCACATTGA
		Probe	CCTCGCACTTCAACCCGGAGTTCTT
	<i>nirS 2</i>	Forward	ATCCGACAGTTCGGTCCG
		Reverse	AGATCAGCGAAACCACGTCTG
		Probe	TGGGCAACGGGTACCTGGGT
	<i>nosZ</i>	Forward	GGCTGCAAGTTCTCCAAGGA
		Reverse	GCCGGAGATGTGACAAACT
		Probe	CCTGCCCGTCGGCCCG
<i>CnorB (61)</i>	Forward 2	CGGTACGCCGGAGTACTG	
	Reverse 6	GAAGGCGAACACGGTCATG	
	Probe	CCGATCCCGTTCTTCG	
<i>T.linaloolentis</i>	<i>nirS</i>	Forward	GGCCGCTACTTCTGGTT
		Reverse	CTTGCCGGTCTTGGTATCGA
		Probe	CCGCAGCAACCTTGTTT
	<i>nosZ</i>	Forward	GCAGCCCAAGCAGGTGTA

		Reverse	GCCTCCTTCGCATCCTTGA
		Probe	ACATAACGACTTCCC

Instrument

StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems)

Materialer

cDNA fra punkt(Syntese2.2.19)

TaqMan® Gene Expression Mastermix (Applied Biosystems)

Primer/probe mix (Applied Biosystems)

Nukleasefritt vann (*BDH biochemical*)

MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate (*Applied Biosystems*)

MicroAmp optical Adhesive film (*Applied Biosystems*)

Metode

Det ble lagd en bruksløsning med mastermix, primer/probe- miks og vann etter Tabell 2.14. Av denne ble 18 μL tilsatt i hver brønn i en MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate. Deretter ble 2 μL templat tilsatt i brønnene med tre paralleller for hver prøve. I tillegg ble det benyttet negative kontroller for å kontrollere uspesifikt amplifisert produkt. Signal på prøve som var lik eller mindre enn signal fra negativ kontroll ble ansett som negativ. Det ble beregnet deteksjonsgrense fra hver av analysene ved å ta utgangspunkt i de negative kontrollenes standardavvik ganger ti, og så deretter omregne det til mRNA kopier* μL^{-1} (62).

For å kunne bestemme konsentrasjoner av PCR-produkt i de ukjente prøvene, ble det benyttet en standardkurve som beskrevet i punkt 2.2.20. Reaksjonsløsningen til standardkurven ble lagd på samme måte som til prøvene.

Prøvene ble analysert ved et forhåndsinnstilt program på StepOnePlus Real time PCR.

Tabell 2.14: Oversikt over komponentene benyttet i reaksjonen ved real-time PCR.

Reagens	Volum	Sluttkonsentrasjon
Mastermix	10	1x
Primer/Probe mix(20x)	1	1x
Templat	2	
H2O	7	
Total	20	

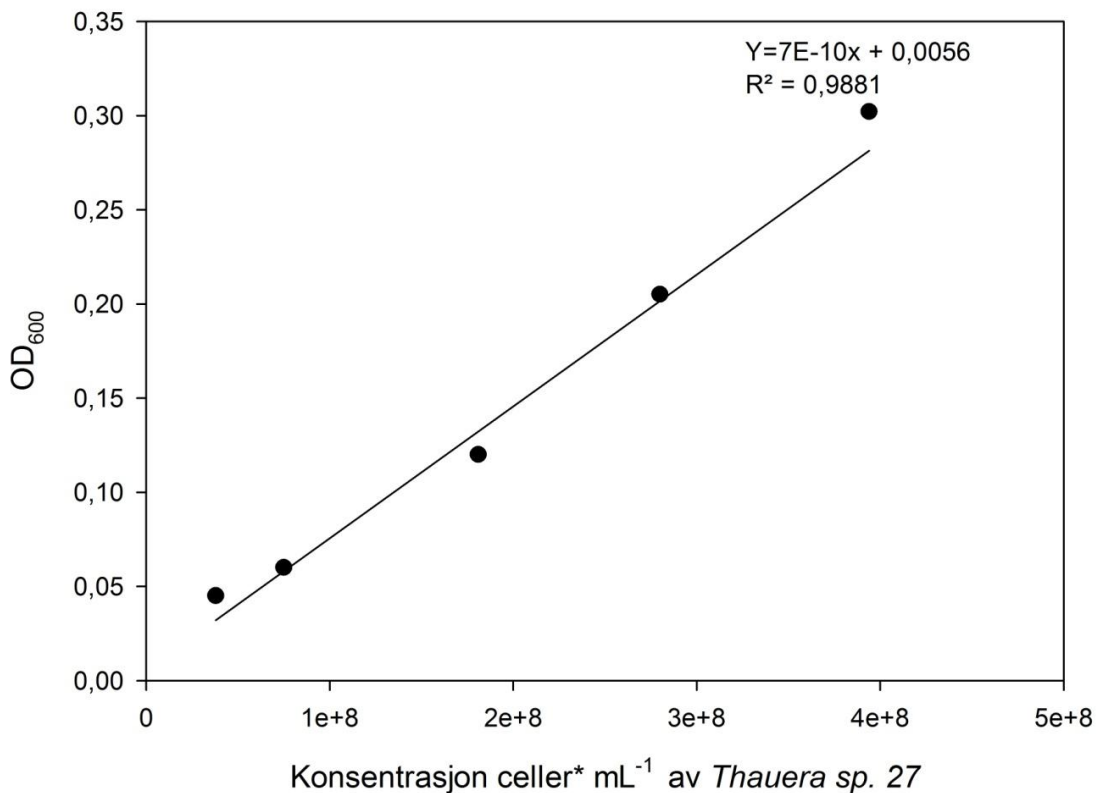
3 Resultat

Denitrifiserende bakterier har ulik respons på ulike miljøfaktorer. Et eksempel på dette kan være pH og tilgang på elektronakseptorer. I overgangen fra aerob til anaerob respirasjon er det funnet store forskjeller på mengden mellomprodukter som blir akkumulert under denitrifikasjonen (9). Begrepet DRP (denitrification regulatory phenotype) er beskrevet i en artikkel av Bergaust *et al.* 2010. Når ulike stammer sine denitrifikasjonsmønstre undersøkes, samles det datasett der det er benyttet ulike parametre som gjør at en kan sammenligne stammene med henblikk på mikrobenes evne til å respondere på tilgjengelighet av elektronakseptorer under definerte miljø, overgangen fra anaerobe til aerobe forhold og hvordan mikroben bidrar til utslipp av NO_x til omgivelsene (63). I denne oppgaven ble det gjort en komparativ analyse av DRP til tre bakteriestammer innen slekten *Thauera*; *Thauera sp. 27*, *T. sp. 28* og *T. linaloolentis* i forbindelse med overgangen fra aerob respirasjon til denitrifikasjon. Det er tidligere blitt funnet at disse bakteriene kan bære på gener som koder for to ulike typer av nitrittreduktase, *nirS1* og *nirS2* (Etchebehere and Tiedje, 2005). I den studien ble det presentert resultater for *Thauera sp. 27* som indikerte at disse to genene uttrykkes i ulik grad og at *nirS1* er regulert av tilgang på nitrat, mens *nirS2* er konstitutivt uttrykt (64). I mitt arbeid ble det gjennomført en mer detaljert studie av disse mekanismene. Et nylig utviklet semiautomatisk inkubasjonssystem gjorde det mulig å overvåke oksygenivå i kulturene og gi presise målinger av gasskinetikk som kunne relateres til genekspressjon ved overgang til anoksiske forhold. Det var også fokusert på at kulturene ikke skulle aggregere under aerob dyrking ved at kulturene ble inkubert under kraftig omrøring. Dette for å unngå lokale anaerobe forhold og initiering av denitrifikasjon. Under dyrking med 1 % initiell oksygen i medium som inneholdt karbonkilde (fra kjøttekstrakt, pepton og acetat) og 2mM KNO₃, ble gassene NO, N₂O, N₂ og O₂ målt av det semiautomatiske inkubasjonssystemet med jevne mellomrom. På bakgrunn av disse målingene ble det tatt ut hyppige prøver før, under og etter overgangen fra oksiske til anoksiske forhold, og underveis i denitrifikasjonsprosessen, for å kvantifisere ekspresjon av de funksjonelle genene *nirS* type 1 og 2, *norB* og *nosZ* ved hjelp av real-time PCR. Totalt ble det utført fire forsøk som er beskrevet i dette kapitlet.

I forkant av forsøkene ble det laget en standardkurve for *T.sp 27* og *T.sp. 28* for bestemmelse av celledannelse* mL^{-1} i kulturene basert på optisk densitet (Figur 3.7). For genet *norB* fantes det ikke tidligere beskrevne sekvenser for stammene benyttet i denne oppgaven. Det ble derfor valgt å prøve ut ulike primerkombinasjoner som var beskrevet i Braker og Tiedje, 2003 (61). Det ble også utviklet standardkurver for kvantifisering av mRNA-kopier av genene *nirS1* og/eller *nirS2*, *norB* (med unntak av *T. linaloolentis*) og *nosZ* ved real-time PCR. I tillegg ble det kjørt ERIC-PCR før og etter eksperimentene for enkelt å kunne konstatere om en kultur var kontaminert i løpet av inkubasjonsforsøkene.

3.1 Bestemmelse av celledannelse

For å kunne beregne antall celler* mL^{-1} i kulturene, basert på måling av optisk densitet (OD), ble en kultur med *Thauera sp.27* dyrket opp til $\text{OD}_{600} = 0,302$ og deretter fortynnet med sterilfiltrert medium for å få laget en standardkurve (Figur 3.7). Se material og metodekapittelet, punkt 2.2.5, for en mer detaljert beskrivelse av metoden. For å kontrollere at punktene til standardkurven var riktige, ble det dyrket nye kulturer der prøver ble tatt ut ved ulike OD_{600} og talt på samme måte. Resultatene var i overensstemmelse med standardkurven. Relasjonen mellom OD_{600} og celledannelse* mL^{-1} var $Y=7E-10x+0.0056$

Standardkurve for *Thauera sp. 27*

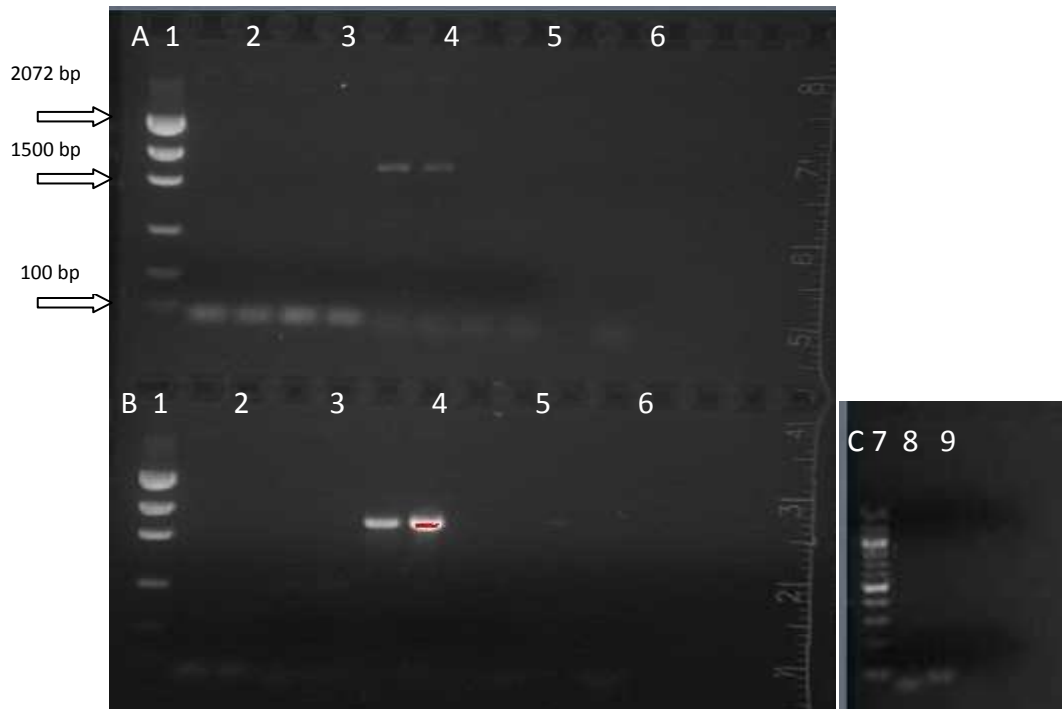
Figur 3.7: Antall celler av *Thauera sp.27* per milliliter i forhold til målt OD₆₀₀.

3.2 PCR

3.2.1 PCR produkt til standardkurve

Reduktasegenene som ble uttrykt under inkuberingsforsøkene ble kvantifisert relativt til standardkurver utviklet for hvert av genene. Standardkurvene benyttet for kvantifikasjon av prøver undersøkt ved real-time PCR ble produsert for hver av de genene som var aktuelle. Metoden var basert på PCR amplifisering av isolert genomisk DNA fra *T.sp 27*, (*nirS1*, *nirS2*, *norB* og *nosZ*) *T.sp 28* (*nirS2*, *norB* og *nosZ*) og *T. linaloolentis* (*nirS1* og *nosZ*). På forhånd var annealingtemperaturen til primerne optimert ved å utføre en gradient PCR metode for *nirS1* med genomisk DNA fra *Thauera sp. 27* fulgt av agarose gel elektroforese av PCR-produktene. En visuell vurdering av intensitet på båndene viste at beste annealingtemperatur var 63.1 °C (resultat ikke vist). Framgangsmåten og beregningene som ble benyttet for å konstruere standardkurvene er vist i material og metode under punkt 2.2.21.

PCR-reaksjonen med *nirS1* og *nirS2* ga forventede bånd (ca 60 bp) for *T.sp. 27* og *T.sp.28*, men uspesifikke bånd for *T. linaloolentis*, og ingen bånd for *T. phenylacetica* (Fig. 3.2 A og B). Fragmenter av forventet størrelse ble amplifisert ved benyttelse av primere designet til *nirS1* og *nosZ* for *T. linaloolentis*. (Figur 3.8, bilde C).



Figur 3.8: PCR-produkt av genet *nirS2* (bilde A) for *T.sp. 27* og *nirS1* (bilde B) for *T. sp.27* (2), *T. sp.28* (3), *T. linaloolentis* (4) og *T. phenylacetica* (5). Bildet viser også 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (1) og negativ kontroll (6). Bilde C viser 100bp ladder (BioLabs) (7), *nirS1* (8) og *nosZ*(9) for *T. linaloolentis*.

DNA konsentrasjonen ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) i PCR-produktene ble deretter målt ved hjelp av dsDNA broad-range assay i et Qubit fluoremeter. Ved benyttelse av PCR-produktene til standardkurve for real-time PCR ble det tatt hensyn til størrelse på fragmentet (antall basepar) der molvekten per basepar er ca $660 \text{ gram} \cdot \text{mol}^{-1}$ og deres konsentrasjon $\cdot \text{mL}^{-1}$. Ut i fra beregningene vist i punkt 2.2.21, ble rensert PCR-produkt fortynnet i vann for å få 1×10^8 kopier $\cdot \mu\text{L}^{-1}$. Denne løsningen ble deretter videre fortynnet 1:10 helt ned til $1 \text{ kopi} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Tabell 3.15 Konsentrasjonen av de ulike PCR-produktene der genomisk DNA isolert fra *T.sp.27*, *T.sp.28* og *T. linaloolentis* ble benyttet som templat. DNA konsentrasjonen i rensert PCR-produkt ble målt med Qubit fluoremeter. For *norB* er primerkombinasjonen beskrevet. Tabellen viser også antall (Kopier* μL^{-1})* 10^{10}

Bakterie	Gen	Konsentrasjon $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	(Kopier* μL^{-1})* 10^{10}
T.27	<i>nirS1</i>	1.62	4.36
	<i>nirS2</i>	3.01	2.30
	<i>norB</i> (2F.6R)	6.92	2.17
	<i>nosZ</i>	3.44	3.87
T.28	<i>nirS2</i>	2.36	4.77
	<i>norB</i> (2F.6R)	3.36	3.08
	<i>nosZ</i>	2.74	3.09
T.linaloolentis	<i>nirS1</i>	2.93	3.87
	<i>nosZ</i>	3.33	4.75

3.2.2 Deteksjongrense ved real time PCR

Deteksjongrense er definert som den minste målbare konsentrasjon eller kvantitet av en analytt som kan detekteres for en prosedyre, og er den nedre grensen for å gi et resultat for en analyse (65). Ved å benytte de negative kontrollene fra real-time PCR, ble deteksjongrensen for hver av analysene beregnet ved å finne ti ganger gjennomsnittet av de negative kontrollenes standardavvik, for så beregne det om til mRNA kopier* celle^{-1} (62).

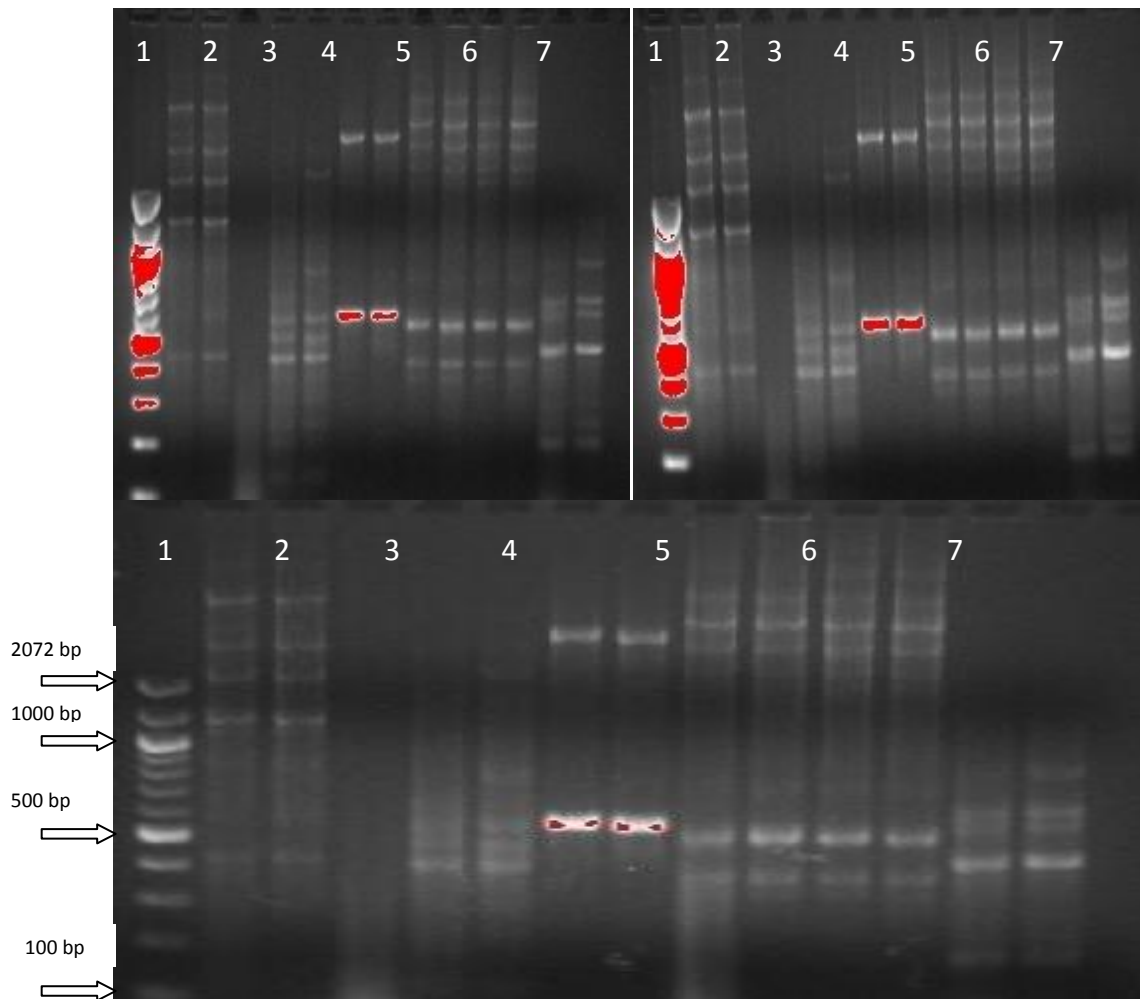
Tabell 3.16 Deteksjongrense for analyse av hver av de undersøkte genene. Tallene er oppgitt i mRNA kopier * celle^{-1} .

	<i>T.sp 27</i> forsøk 1	<i>T.sp 27</i> forsøk 2	<i>T.sp 28</i>	<i>T.linaloolentis</i>
<i>nirS1</i>	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$		$8.4 \cdot 10^{-4}$
<i>nirS2</i>	$3.9 \cdot 10^{-4}$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	
<i>norB</i>		$1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.7 \cdot 10^{-4}$	
<i>nosZ</i>	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$8.6 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$

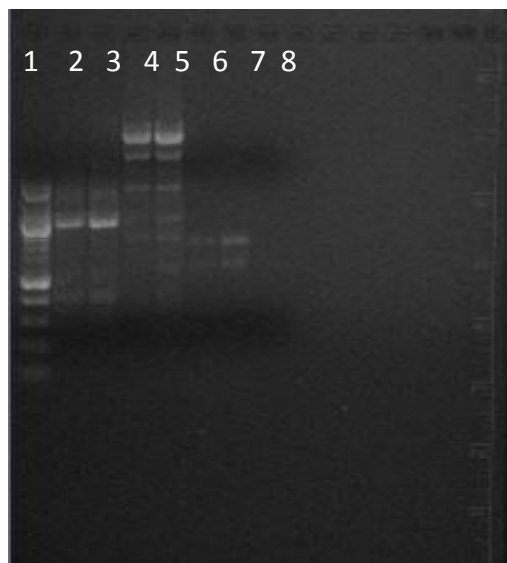
3.3 ERIC PCR

Ved forberedelser før og under inkuberingsforsøk og under aerob dyrking av kulturer som skulle benyttes i forsøkene var det en risiko for kontaminering av kulturene. Metoden som ble benyttet for å undersøke om kulturene var kontaminert var ERIC-PCR (punkt 2.2.12) hvor DNA ekstrahert fra oppdyrkede frysestokker ble benyttet som templat. De samme PCR-produktene fra de tre bakteriestammene ble analysert på tre ulike geler ved ulike tider for å undersøke reproduserbarhet, og hvert PCR-produkt ble applisert to ganger på hver gel. Resultatene etter ERIC PCR på isolert genomisk DNA av stammene benyttet i forsøket viste profiler som var reproduserbare (Figur 3.9). Det viste seg at isolert genomisk DNA fra prøve 5 var en kontaminering. Det var forventet at denne prøven skulle være *T.linaloolentis*.

Siden metoden viste seg å fungere for disse bakteriene, ble den benyttet ved de følgende inkuberingsforsøkene. Det ble tatt ut prøver fra før og etter hvert forsøk og genomisk DNA ble isolert. Agarose gel elektroforese for *T. sp.27* viste identiske profiler av genomisk DNA isolert før og etter inkuberingsforsøk (Fig. 3.4). Tydelige bånd kan ses ved 1200, 1000 og 600 basepar. Samme profil sees for den tidligere analysen av frysestokker (Fig. 3.3). Profilene fra før og etter inkuberingsforsøket for *T. linaloolentis* viser ingen forskjeller. Sammenlignet med profilen i Figur 3.9 var båndene vesentlig svakere, men det kunne sees tydelige bånd ved 800 og 700 bp. De tilsvarende båndene var også tydeligst i de opprinnelige profilene (Figur 3.9). På bakgrunn av profilene ble det bedømt at ingen av kulturene var blitt kontaminert i løpet av inkuberingene.



Figur 3.9 : ERIC PCR produkt fra fire ulike Thauerstammer: 1: 100 bp DNA størrelsesmarkør (Biolabs), 2: *T.27*, 3: Negativ kontroll, 4 *T. 28*, 5: Kontaminert prøve, 6: *T. linaloolentis* (stamme 1) 7: *T. linaloolentis* (Stamme 2) 8: *T. phenylacetica*



Figur 3.10. ERIC PCR profiler av stammer benyttet i inkuberingsforsøk. Her vises 100bp DNA størrelsesmarkør (Biolabs) (1); *T.sp.27* forsøk 2 før (2) og etter (3) inkuberingsforsøk; *T.sp.28* før (4) og etter (5) inkuberingsforsøk; *T. linaloolentis* før (6) og etter (7) inkuberingsforsøk, og negativ kontroll (8).

3.4 Ekspresjon av denitrifikasjonsgener ved aerob dyrking

De aerobt dyrkede kulturene som ble benyttet til inkuberingsforsøkene ble undersøkt for ekspresjon av NO_x reduktasegener ved hjelp av real-time PCR og utviklede Taqman primer/probesett. For å bekrefte resultatene ble det dyrket ytterligere tre kulturer av de ulike stammene av *Thauera* benyttet i forsøket. Den optiske densiteten i alle kulturene ble holdt lav for å unngå aggregering.

Resultatene i Tabell 3.17 viste en lav transkripsjon gitt som mRNA kopier celle⁻¹ for *nirS1* og *nirS2* i kultur 1 og 3, men noe høyere i kultur 2 der tettheten av celler var høyere. Uttrykket av *nosZ* celle⁻¹ var målt høyest av de fire genene i alle kulturene av *T.sp. 27*.

Tabell 3.17: Ekspresjon av *nirS1*, *nirS2*, *norB* og *nosZ* under aerob dyrking av *T.sp. 27*. Tallene er oppgitt i mRNA kopier* celle⁻¹

Kultur	OD ₆₀₀	<i>nirS1</i>	<i>nirS2</i>	<i>norB</i>	<i>nosZ</i>
1	0.003	0.0026	0.00015	0.00029	0.026
2	0.01	0.022	0.00025	0.013	0.2
3	0.002	0.0077	0.00013	0.062	0.96

Ekspresjonen av denitrifikasjonsgenene *nirS2*, *norB* og *nosZ* fra *T.sp.28* under aerob dyrking er fremstilt i Tabell 3.18. Transkripsjonen av *nirS2* og *norB* under aerobe forhold var lavere enn ekspresjonen av *nosZ* i alle parallellene.

Tabell 3.18: Ekspresjon av *nirS2*, *norB* og *nosZ* under aerob dyrking av *T.sp 28*. Tallene er oppgitt i mRNA kopier* celle⁻¹.

Kultur	OD ₆₀₀	<i>nirS2</i>	<i>norB</i>	<i>nosZ</i>
1	0.010	0.000046	0.000011	0.025
2	0.003	0.00035	0.0026	0.011
3	0.002	0.00035	0.000048	0.014

Den aerobe ekspresjonen av *nirS1* var noe høyere per celle enn *nirS1* hos *T.sp.27*. Den detekterte ekspresjonen av *nosZ* under aerob dyrking var høyere hos *T.linaloolentis* (Tabell 3.6) enn hos *T.sp 27* og *T.sp 28*.

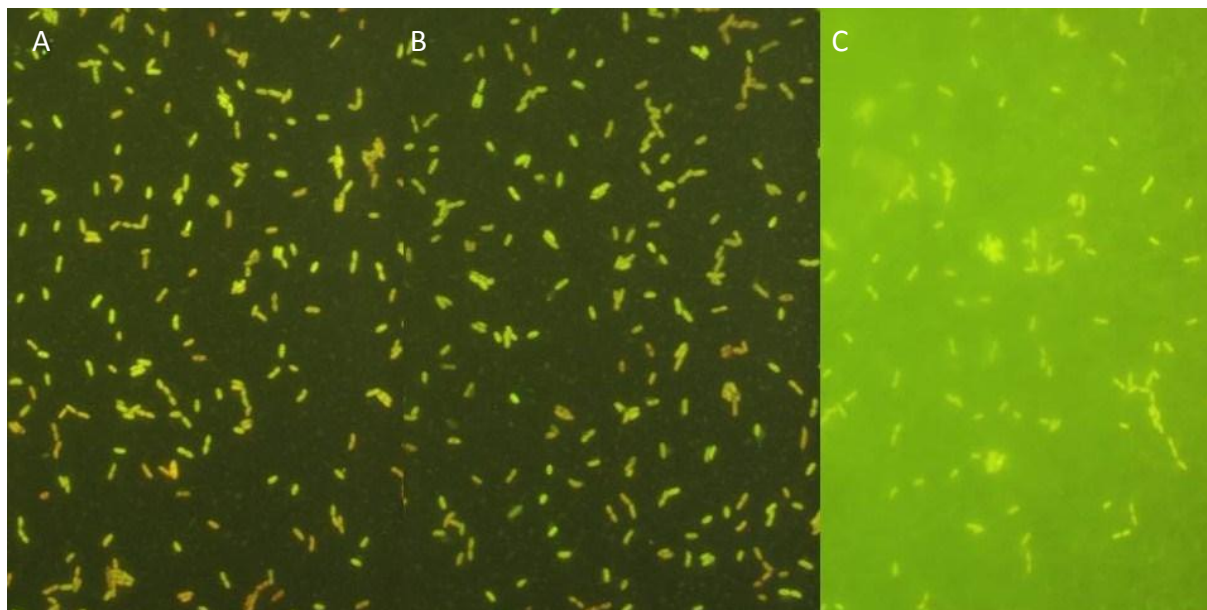
Tabell 3.19: Ekspresjon av *nirS1* og *nosZ* under aerob dyrkning av *T.linaloolentis*. Tallene er oppgitt i mRNA kopier* celle⁻¹.

Kultur	OD ₆₀₀	<i>nirS1</i>	<i>nosZ</i>
1	0.216	0.0013	0.13
2	0,199	0.0055	0.75
3	0,248	0.0024	0.4

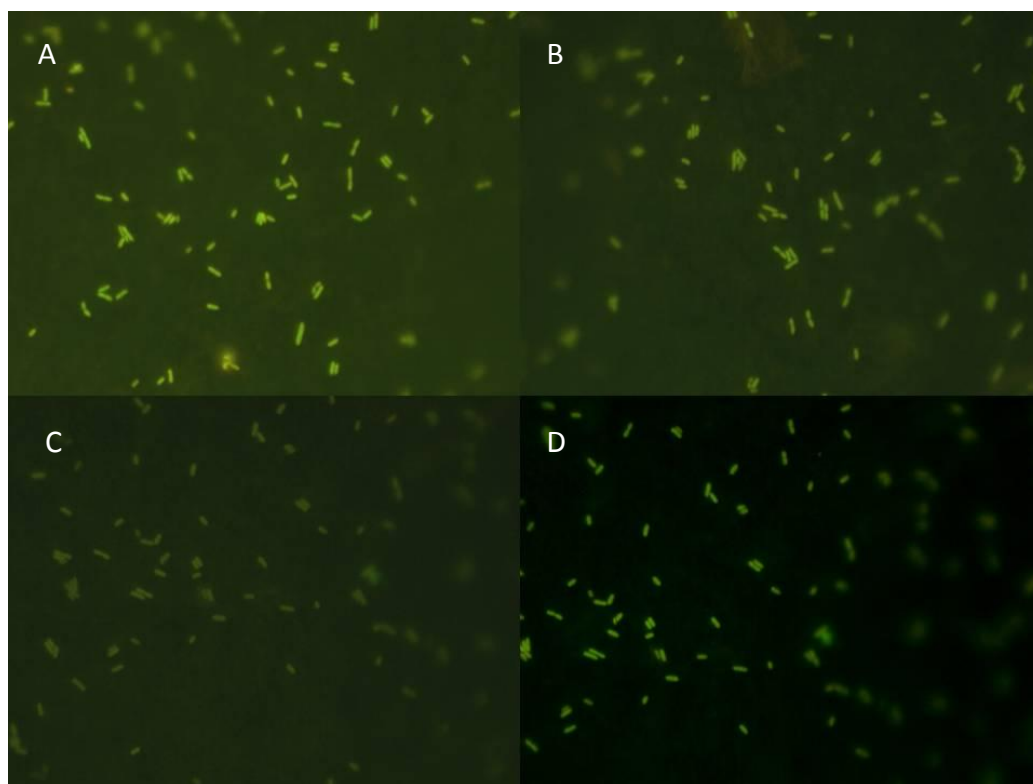
3.5 Undersøkelse av aggregering

Denitrifikasjon skjer i miljø som er anaerobe og semi-anaerobe, og i miljø (som i kulturer) der tettheten av celler blir høy nok kan det dannes mikromiljø der cellene aggregerer og starter denitrifikasjonsprosessen. Dermed blir det produsert mellomprodukt som dannes under denitrifikasjonen. Dette forsøket ble utført for å utelukke aggregering i de aerobt dyrkede kulturene som ble benyttet i inkuberingsforsøkene, og i de parallellene som ble dyrket i tillegg for å undersøke aerob ekspresjon (punkt 3.4).

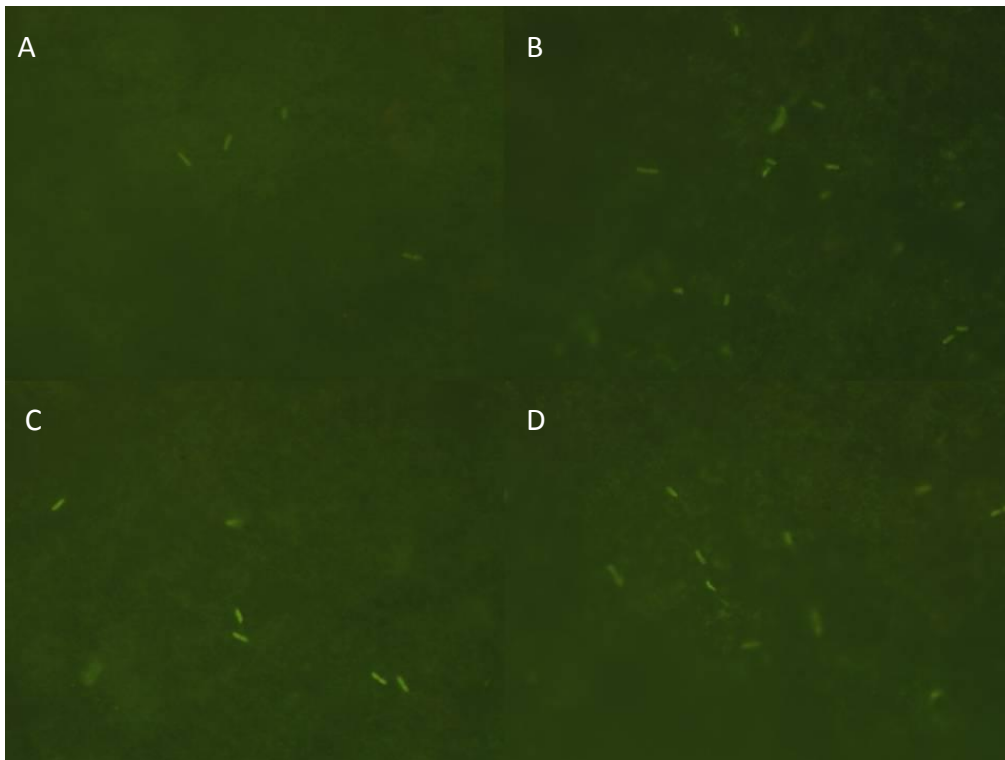
Det ble brukt samme prosedyre for denne undersøkelsen som ved telling av celler i fluorescensmikroskop ved farging med acridinorange. Framgangsmåte for fargingen er beskrevet i material og metode punkt 2.2.5. De aerobe kulturene fra *T.sp* 27 (Figur 3.11) viste ingen aggregering og dermed forventes det ikke at det var dannet anaerobe mikromiljøer. For *T.sp*.28 (Figur 3.12) og *T. linaloolentis* (Figur 3.13) observeres det ingen aggregering av kulturene, og dermed ingen mikromiljø hvor initiering av denitrifikasjon er sannsynlig.



Figur 3.11 Bilder tatt med fluorescensmikroskop av aerobt dyrkede kulturer av *T.sp.27*, henholdsvis parallell 1(A), parallell 2 (B) og parallell 3 (C)



Figur 3.12: Bilder tatt med fluorescensmikroskop av aerobt dyrkede kulturer av *T.sp.28*, henholdsvis startkultur (A), parallell 1(B), parallell 2 (C) og parallell 3 (D)



Figur 3.13: Bilder tatt med fluorescensmikroskop av aerobt dyrkede kulturer av *T.linaloolentis* henholdsvis startkultur (A), parallell 1(B), parallell 2 (C) og parallell 3 (D)

3.6 Sekvensering av *norB*

Genomisk DNA fra *T.sp.27*, *T.sp.28* og *T.linaloolentis* ble benyttet i en PCR-reaksjon der primere for *norB*, beskrevet av Braker og Tiedje, 2003 (61), ble satt sammen i ulike kombinasjoner for å se hvilke primerkombinasjoner som ville gi produkt for dette genet. Både for *T.sp 27* og *T.sp 28* ga primerkombinasjonen beskrevet i litteraturen som "2 forward", "6 reverse" beste PCR-produkt. For *T. linaloolentis* ga ingen av kombinasjonene PCR-produkt.

Da det ikke foreligger sekvenser beskrevet i litteratur for genet *norB* hos *T.sp 27* for stammene benyttet i forsøkene, ble produkt for *T.sp. 27* fra PCR-reaksjon med *norB*-primere (2F og 6R) sekvensert. Sekvensen ble deretter redigert i programmet BioEdit. Den redigerte sekvensen ble så brukt i søk i BLAST på NCBI sine hjemmesider (66). Treff i BLAST ble sammenlignet med genomiske DNA-sekvenser fra *Thauera merchernichensis*, og en fikk da bekreftet at det sekvenserte PCR-produktet var *norB*.

3.7 Gasskinetikk og ekspresjonsprofil hos *T.sp. 27*. Forsøk 1

3.7.1 Gasskinetikk

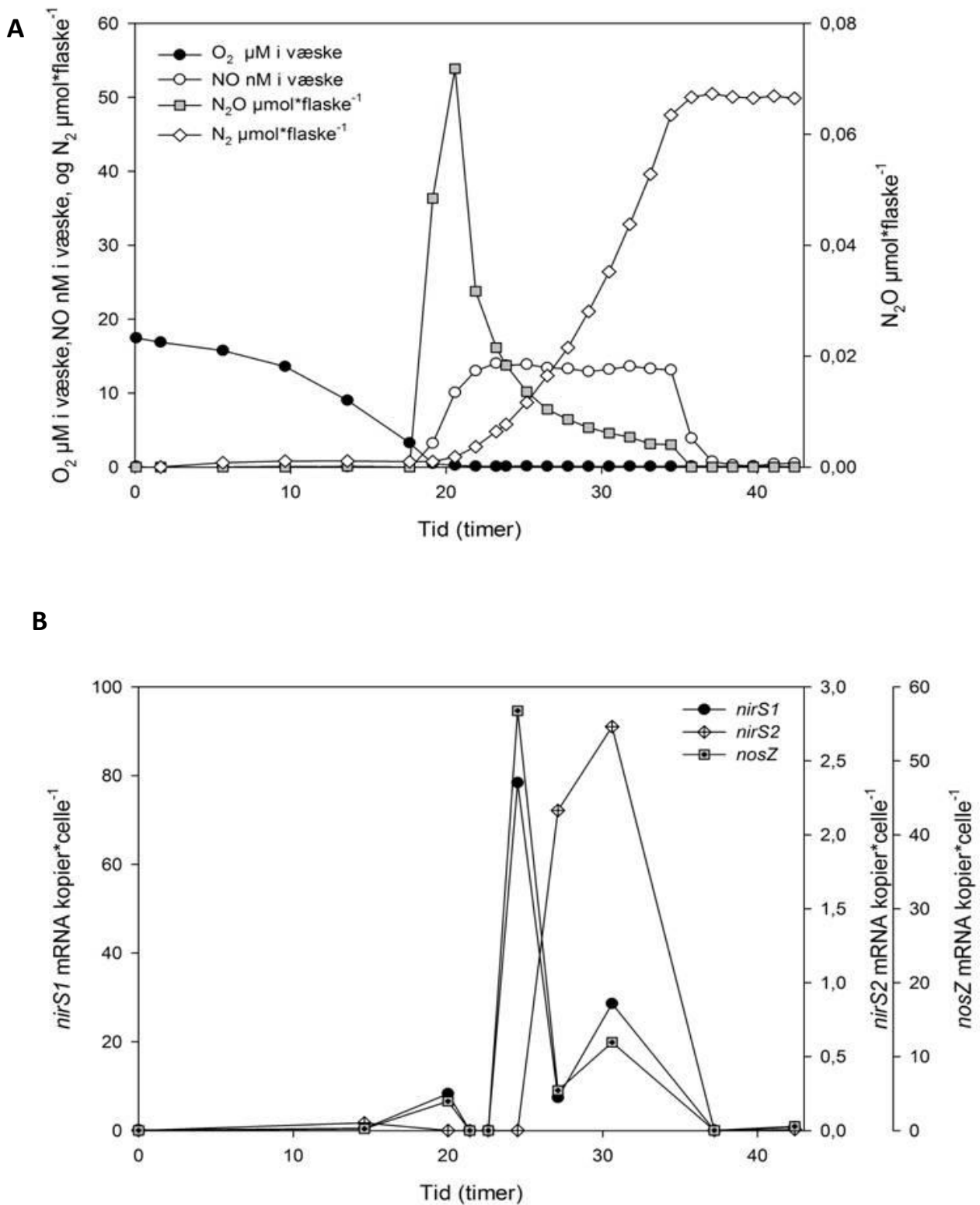
Dette inkuberingsforsøket ble utført med henblikk på *T. sp. 27* sin respons på overgangen fra aerob til anaerob respirasjon og påfølgende gasskinetikk og ekspresjonsprofil. Alle flaskene ble tilsatt 2 mM KNO₃ og initiell pH var 7.8. Etter heliumvasking, der luft i flaskene ble fjernet, ble det tilsatt 1 mL ren oksygen som tilsvarte omtrent 1 % oksygen i flaskens headspace. Konsentrasjonen av oksygen i væsken var dermed 17.5 μM i alle kulturene ved forsøkets start. Beregningene av de målte gassene er beskrevet i Molstad *et al.*, 2007 (67). I Figur 3.14 er det vist gasskinetikk av O₂, NO, N₂O og NO under inkuberingsforsøkets forløp. Ti timer ut i forsøket begynte konsentrasjonen av oksygen å synke, til konsentrasjonen var tilnærmet 0 μM i mediet etter ca 20 timer. Omtrent to timer før dette begynte NO å øke i konsentrasjon. Mellom time 22-34 var konsentrasjonen av NO i mediet jevnt på ca 14 nM til konsentrasjonen sank til 0 nM etter 37 timer. Samtidig med at akkumulering av NO ble detektert startet også akkumulering av N₂O. Den økte raskt til en maksimumkonsentrasjon på 0.07 μmol*flaske⁻¹ etter 19 timer i alle kulturer, før N₂O konsentrasjonen sank jevnt. Reduksjon av N₂O til N₂ startet etter ca 22 timer, og konsentrasjonen økte jevnt til fram til 37 timer ut i forsøket der N₂ hadde nådd en maksimumverdi på 49.5 μmol*flaske⁻¹. Dermed var alt nitrat redusert, siden 2 mM nitrat gir 50 μmol N₂ ved fullstendig elektronoverføring.

3.7.2 Ekspresjonsprofil av *Thauera sp. 27*. Forsøk 1

Under inkuberingsforsøket ble flasker tatt ut ved interessante tidspunkt der man ønsket å undersøke ekspresjonsmønsteret. Cellepelletten i hver flaske ble behandlet med RNA-protect for å fikse cellene og hindre degradering av RNA. Etter endt forsøk ble totalRNA isolert, DNase-behandlet og konvertert til cDNA ved hjelp av revers transkripsjon. Ekspresjonen av *nirS1*, *nirS2*, og *nosZ* ble estimert ved hjelp av real-time PCR hvor antall mRNA kopier i hver prøve ble beregnet relativt til standardkurve med kjente kopitall av det aktuelle genfragmentet (se metode under punkt 2.2.20). Det ble satt opp tre paralleller av alle punktene i standardkurven og resultatene er presentert som en middelvei av replikatene. De paralleller som var utenfor to standardavvik ble betraktet som avvikende og ble

ekskludert fra beregningene. Ekspresjonen til *norB* ble ikke analysert i dette forsøket da det ikke var utviklet primere for genet på det tidspunktet forsøket ble utført. En beregning av deteksjonsgrense ble også utført (Tabell 3.16). Det ble her tatt hensyn til standardavviket i de negative kontrollene ved real-time PCR. I dette forsøket ble deteksjonsgrensen satt til å være $1.4 \cdot 10^{-3}$ mRNA kopier * celle⁻¹ for *nirS1* $3.9 \cdot 10^{-4}$ mRNA kopier * celle⁻¹ for *nirS2* og $1.1 \cdot 10^{-3}$ mRNA kopier * celle⁻¹ for *nosZ*. Av ekspresjonsdataene hadde *nirS1* et uttrykk på ca 1.4 mRNA kopier * celle⁻¹ ved forsøkets start. Antall kopier økte noe der konsentrasjonen av oksygen var lavere, før ekspresjonen tilsynelatende sank til 0.02 mRNA kopier * celle⁻¹. Ekspresjonen økte da tilgjengelig oksygen var redusert til 78 mRNA kopier * celle⁻¹ etter 24.5 timer, hvor ekspresjonen var på det høyeste. Dette kunne sees i sammenheng med gassdataene (Figur 3.16), der reduksjonen av nitrat til NO hadde ført til en maksimal konsentrasjon av NO på 14 nM i mediet etter omtrent 22 timer. Ekspresjonen av *nirS2* viste et noe annet mønster enn *nirS1*, og var ikke like sterkt uttrykt i forhold til mRNA kopier * celle⁻¹. Ekspresjonen var fra begynnelsen av forsøket målt til en verdi som var under deteksjonsgrensen ($1 \cdot 10^{-5}$ til $1 \cdot 10^{-4}$ mRNA kopier * celle⁻¹) før en økning 30 timer etter forsøkets start, der ekspresjonen nådde en topp på 0.3 mRNA kopier * celle⁻¹.

Genet *nosZ* hadde en lignende ekspresjonsprofil som *nirS1* i dette forsøket. Ekspresjonen nådde et maksimum på 56 mRNA kopier * celle⁻¹, 24 timer etter forsøkets start. Som for de andre genene nådde ekspresjonen av *nosZ* en ny topp senere i forsøket på 11 mRNA kopier * celle⁻¹ etter 30 timer.



Figur 3.14 Gasskinetik inkuberingsforsøk 1 med *Thauera* sp. 27 (A), og ekspresjonsdata fra de samme kulturene der mRNA kopier*celle⁻¹ for *nirS1*, *nirS2* og *nosZ* ble målt med real-time PCR. (B).

3.8 Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av *T. sp 27*. Forsøk 2

På bakgrunn av tidligere inkuberingsforsøk (forsøk 1), ble det gjort et nytt forsøk for å undersøke ekspresjonen mer detaljert i tidsrommet hvor bakteriene i kulturen skiftet fra aerob respirasjon til anaerob respirasjon (denitrifikasjon) ved å ta ut flere prøver i dette da dette skjedde. Det var også interessant å se om gasskinetikken og ekspresjonsprofilen fra det tidligere forsøket var reproducerbart.

3.8.1 Gasskinetikk

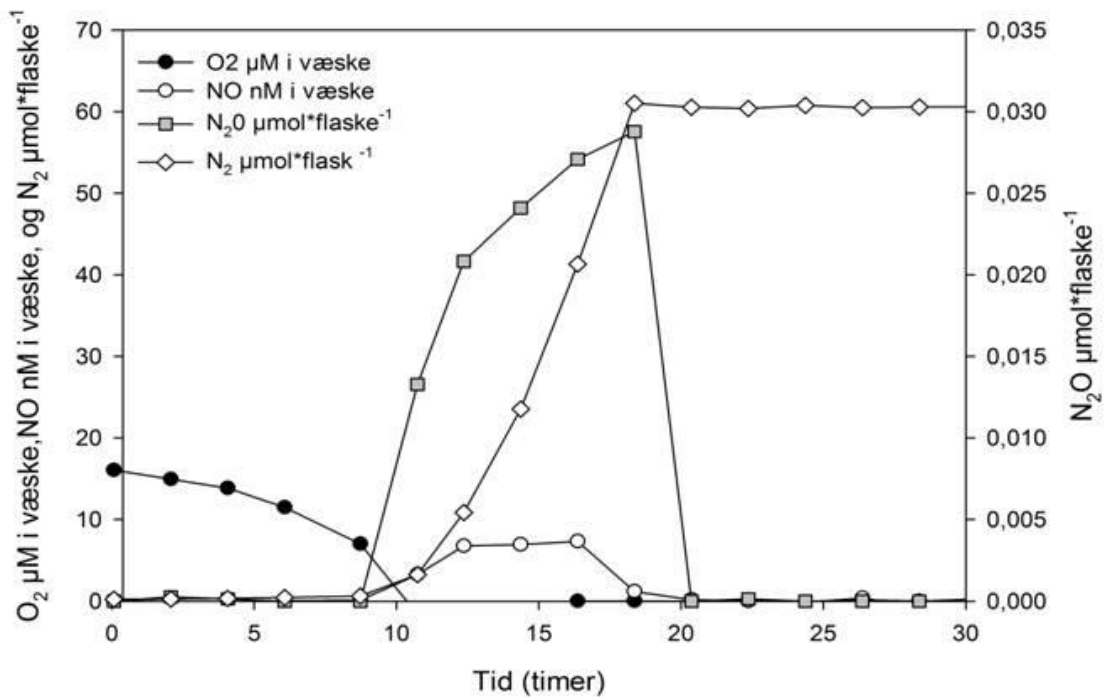
I Figur 3.15 vises resultat etter inkuberingsforsøk 2 med samme betingelser som forsøk 1 med *T.sp 27*. Ved forsøkets start var konsentrasjonen av oksygen 17.1 μM i mediet. Respirasjon av oksygen førte til anoksiske forhold i kulturen etter omtrent 11 timer. Rett før kulturen ble anaerob kunne en se en begynnende økning i N_2O og NO . Akkumulering N_2 startet ikke å øke før etter 11 timer. Gassdataene viste en økning av NO etter ca 9 timer (Figur 3.15), til det nådde en konsentrasjonstopp etter 12 timer. Her holdt konsentrasjonen seg på et jevnt nivå på ca 7 nM mellom time 12 og 16. Tilgjengeligheten av elektronakseptorer avtok etter 16 timer, og dermed avtok reduksjon av nitritt til NO . Konsentrasjonen av NO i mediet sank fra 7 nM og var 0 nM etter omtrent 20 timer. Konsentrasjonen av N_2O økte raskt fra en konsentrasjon på 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$ ved ni timer til ca 0.030 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$ etter 18 timer, og sank deretter raskt. Mellom time 18 og 20 ble det observert et fall fra 0.030 til 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$. Man kunne se en svak økning av N_2 rett etter at oksygenet i kulturen var fullstendig redusert. Da konsentrasjonen av N_2O avtok, økte akkumuleringen av N_2 og gassen nådde en maksimal konsentrasjon på ca 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$ etter 20 timer. Etter dette ble det ikke akkumulert noe N_2O og N_2 -nivået holdt seg stabilt på rundt 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$ helt ut forsøkets slutt som følge av at det ikke var noen tilgjengelig N-oksider å redusere videre, og dermed ingen elektronakseptorer.

3.8.2 Ekspresjonsprofil

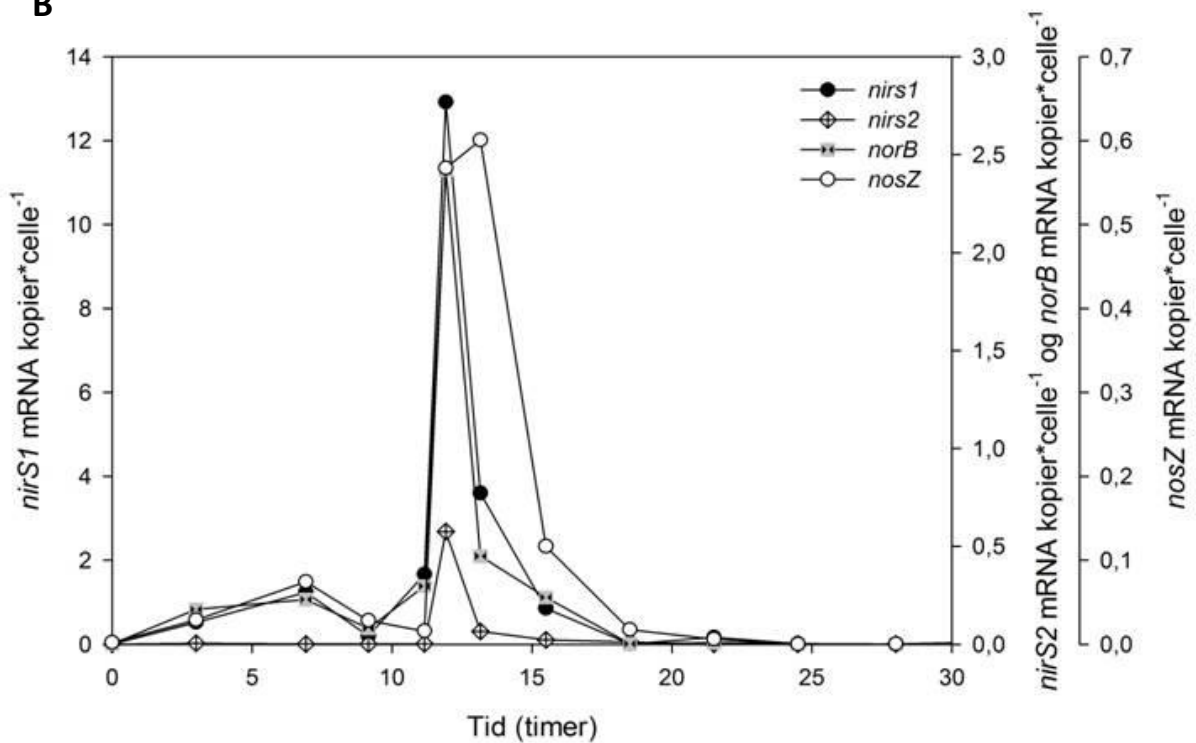
I dette forsøket viste alle de undersøkte genene et likt ekspresjonsmønster, men uttrykt i ulik grad. Eneste unntak var ved forsøkets start da det ble observert en svak økning av ekspresjon for *nirS1*, *norB* og *nosZ*, mens *nirS2* ble uttrykt i liten grad sett i forhold til deteksjonsgrensen, som var på $4.9 \cdot 10^{-6}$ mRNA kopier \cdot celle $^{-1}$. Det kunne sees av gasskinetikkprofilen (Figur 3.15) at konsentrasjonen av oksygen sank til tilnærmet 0

$\mu\text{M} \cdot \text{flaske}^{-1}$ etter ca 11 timer. En kunne da se en liten senkning i ekspresjonen av alle genene før de økte til uttrykket var høyest etter ca. 12 timer, og så sank etter 28 timer. Genet *nirs1* detektert til å være sterkest uttrykt av alle de fire undersøkte genene. På det høyeste ble det detektert omtrent 13 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$, nesten fem ganger mer enn den høyeste verdien for *nirs2*. Etter 28 timer og frem til forsøkets slutt var uttrykket på mellom 0.01-0.05 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$. Det var detektert gjennomgående mye lavere uttrykk av *nirs2* enn *nirS1* for *Thauera sp.27* og nådde et maksimum etter 12 timer der genet var uttrykt ved 2.7 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$. Som *nirs1* og *norB*, var det målt at *nosZ* hadde noe uttrykk under aerobe og semiaerobe forhold i kulturen. Som uttrykket til de andre genene, falt også kopiantallet av *norB* raskt etter 12 timer. Omtrent 18 timer ut i forsøket var kopiantallet på sitt laveste. Det høyeste nivået av målt mRNA for *nosZ* før kulturen ble anaerob var målt til 0.2 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$. Rett etter at kulturene ble anaerobe som følge av aerob respirasjon, økte ekspresjonen fra 0.08 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$ til 24 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$ etter 12 timer. Det genet der det ble detektert lavest ekspresjon av de fire denitrifikasjonsgenene var *nosZ*. Før kulturen hadde respirert oksygenet hadde *nosZ* et uttrykk på 0.07 kopier RNA $\cdot \text{celle}^{-1}$ (sju timer etter forsøkets start). Antallet kopier falt til 0.015 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$ rett etter at alt oksygenet var redusert og økte siden til 0.6 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$ etter 12 timer. I motsetning til de andre genene, som falt i kopiantall etter time 12, nådde *nosZ* et maksimum etter 13 timer, med 0.6 mRNA kopier $\cdot \text{celle}^{-1}$. Etter 24 timer kunne det ikke måles noen ekspresjon for *nosZ*.

A



B



Figur 3.15 (A) Gasskinetikk (O₂, NO, N₂O og N₂) og (B) *nirS1*, *nirS2*, *norB* og *nosZ* ekspresjon (målt som mRNA kopier*celle⁻¹) for *Thauera sp.27* fra inkubasjonsforsøk 2.

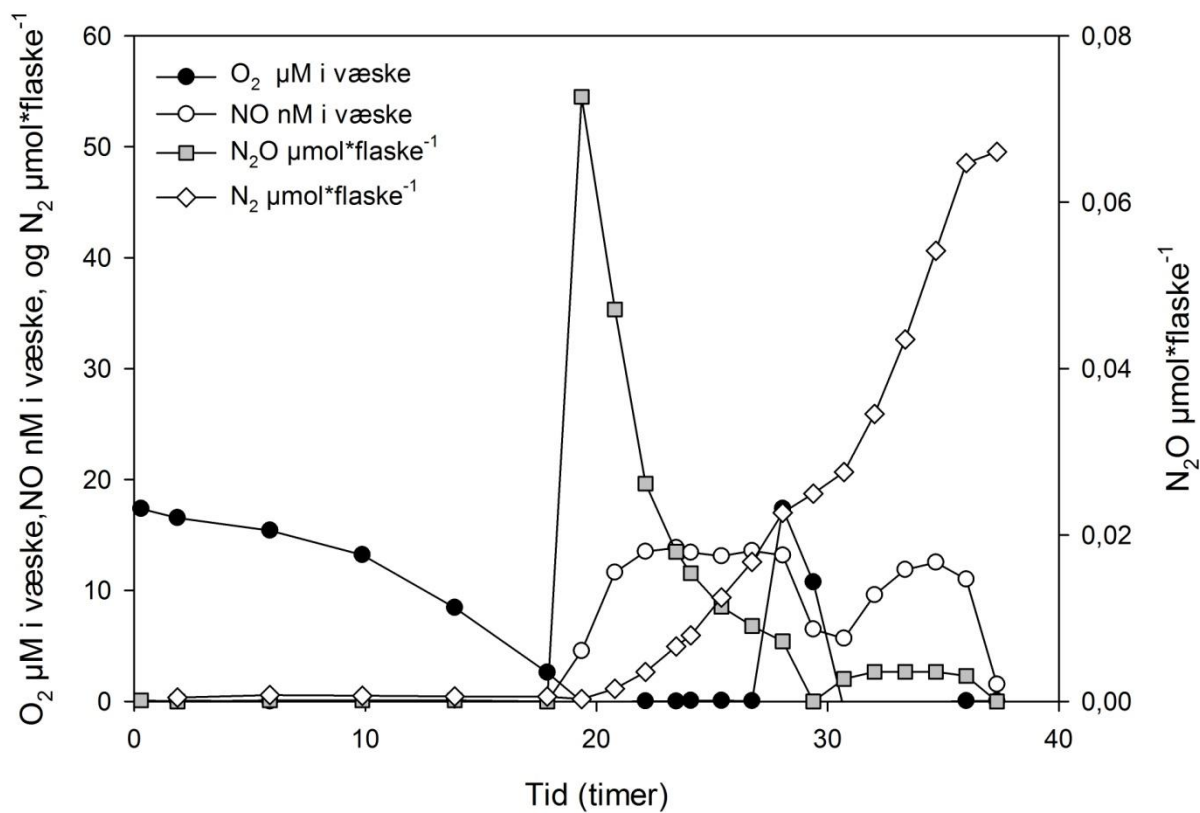
3.9 Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av *T.sp.27* med ny puls av oksygen

3.9.1 Gasskinetikk

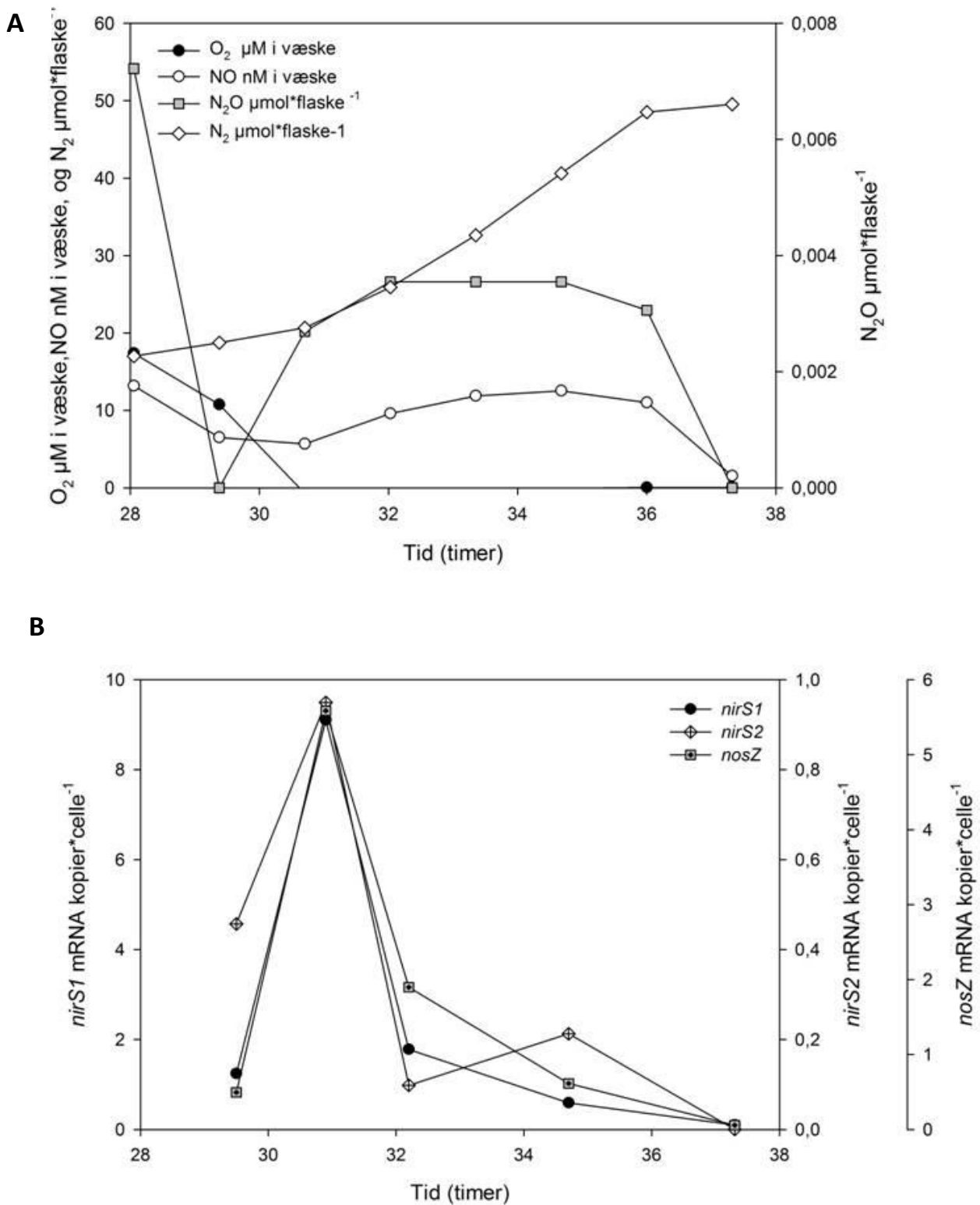
Vi ønsket å undersøke gasskinetikk og uttrykk av denitrifikasjonsgener i *T. sp. 27* ved en plutselig overgang fra anoksiske til oksiske forhold, derfor ble det gjort et forsøk der det ble tilsatt 1 mL oksygen til kulturene tilsvarende 10.7 $\mu\text{M O}_2$ i væskefasen i fem av flaskene under aktiv denitrifikasjon. Dette inkuberingsforsøket ble utført samtidig som forsøk 1 med *T.sp 27*. Gasskinetikken i disse flaskene (Figur 3.16) viser en identisk profil som gasskinetikken i forsøk 1 (Punkt 3.7.1) fram til time 28. Et mer detaljert bilde av gasskinetikken etter time 28 er vist i Figur 3.17. Det tilsatte oksygenet ble raskt eliminert i kulturen ved respirasjon. Konsentrasjonen av NO umiddelbart etter oksygentilsetningen ble omtrent halvert. Den økte igjen seks timer etter oksygentilsetningen til 12.5 nM før gassen ble tilnærmet 0 nM i mediet kulturen etter 37 timer. Etter tilsetning av den nye pulsen av oksygen sank konsentrasjonen av N_2O til en tiendedel av konsentrasjonen før oksygentilsetning, og var den gassen som sank mest etter tilsetningen. En svak økning kunne observeres etter ca 31 timer og fram til 36 timer der konsentrasjonen var 0.00035 $\mu\text{mol} \cdot \text{flaske}^{-1}$. Akkumuleringen av N_2 så også ut til å være påvirket av oksygentilsetningen. Den jevne økningen av N_2 ble noe hemmet mellom time 28 og 31, men fortsatte likevel å øke.

3.9.2 Ekspresjonsprofil

Etter tilsetning av ny puls med oksygen ble det vist av resultatene i ekspresjonsprofilene (figur 3.8) en plutselig økning av ekspresjon for alle tre genene, før de raskt sank igjen. Gasdataene i samme figur viser en senkning i NO-konsentrasjon etter 28 timer. Ekspresjonen av *nirs1* økte i dette tidsrommet fra 1.2 mRNA kopier*celle⁻¹ til 9.1 mRNA kopier*celle⁻¹ og sank raskt igjen til 0.58 mRNA kopier*celle⁻¹ etter 34 timer. Ekspresjonen av *nirS2* viste et noe likt mønster som de to andre genene, men hadde et mye lavere uttrykk av mRNA kopier*celle⁻¹. Ekspresjonen ble doblet i tidsrommet etter oksygentilsetningen (fra 0.05 til 0.09 mRNA kopier*celle⁻¹), og sank raskt igjen mot forsøkets slutt. For genet *nosZ* ble det detektert et høyere uttrykk enn *nirS2* og var på det meste uttrykt ved 0.6 mRNA kopier*celle⁻¹ etter oksygentilsetningen.

Gasskinetikk *T.sp.27*

Figur 3.16: Konsentrasjoner av O₂, NO, N₂O og N₂ målt under inkuberingsforsøket med *T.sp.27* der det ble tilført en ny puls med 1 mL oksygen 28 timer etter forsøkets start.



Figur 3.17: Gasskinetikk (A) og ekspresjonsdata (B) fra inkuberingsforsøk med *T.sp 27* med tilsatt 1 mL oksygen etter 28 timer. Det øverste bildet viser gasskonsentrasjoner for O₂, NO, N₂O og N₂ under forsøkets forløp mellom time 28 og 38. Figuren nede til venstre viser ekspresjon mRNA kopier*celle⁻¹ av *nirS1*, *nirS2* og *nosZ* målt med real-time PCR etter kulturene er blitt tilsatt 1 mL oksygen.

3.10 Gasskinetikk og ekspresjonsprofil av *T.sp.28*

3.10.1 Gasskinetikk

Det ble utført et inkuberingsforsøk med *T.sp.28* med de samme betingelsene som de tidligere forsøkene der en ønsket å se på denne stammens regulering av denitrifikasjonsgenene og da spesielt ekspresjon av *nirS2*. Figur 3.18 viser konsentrasjonene av gassene akkumulert under inkuberingsforsøket med *T.sp. 28*. Oksygenkonsentrasjonen var initielt 16.5 μM , og sank til 0.17 μM etter 20 timer. Etter at oksygenet ble respirert i kulturene slik at den ble anoksisk, kunne det observeres en jevn økning av NO-konsentrasjonen fram til time 30, da den nådde et maksimum på 9.5 nM. 17 timer etter forsøkets start begynte konsentrasjonen av N_2O å øke. Det ble observert to konsentrasjonstopper; etter time 19, der gassen nådde en konsentrasjon på 0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{flaske}^{-1}$, og etter time 29, der det ble observert en konsentrasjon på 0,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{flaske}^{-1}$. Deretter stupte konsentrasjonen etter ca 32 timer. Reduksjon av N_2O til N_2 begynte omtrent samtidig som reduksjon av nitritt til NO. Etter 19 timer begynte konsentrasjonen av N_2 å øke, til den nådde en topp på 52 $\mu\text{mol}\cdot\text{flaske}^{-1}$ etter 32 timer, da tilgjengelig nitrat var redusert.

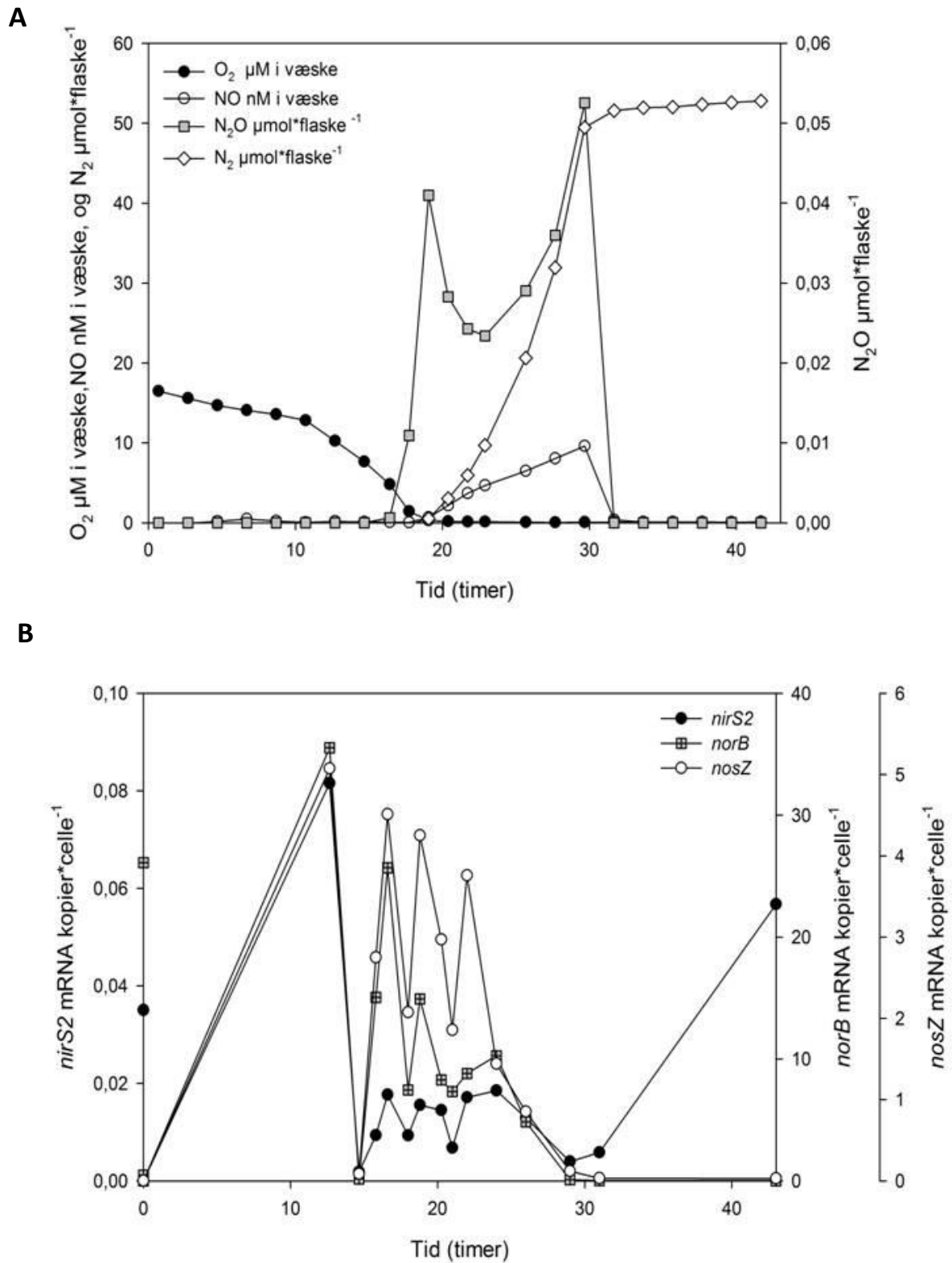
3.10.2 Ekspresjon av denitrifikasjonsgener

Figur 3.18 viser ekspresjonsprofilen av denitrifikasjonsgenene *nirS2*, *norB* og *nosZ* for *T.sp.28*. Det høyeste antallet mRNA kopier*celle⁻¹ ble funnet etter ca 12 timer for alle tre genene. Gjennom hele forsøket kunne en observere det samme ekspresjonsmønsteret for alle genene. Det ble målt at genet *nirS2* hadde det laveste ekspresjonstallet per celle av alle genene gjennom hele forsøket. Den høyeste ekspresjonen på 0.08 mRNA kopier*celle⁻¹ var målt etter 12 timer, hvor den så sank raskt til ingen detekterbar ekspresjon etter ca 15 timer. Deretter ble det detektert at ekspresjonen av *nirS2* var variabel mellom time 15-26 der en det ble målt en ekspresjon på gjennomsnittlig 0.014 mRNA kopier*celle⁻¹. Mellom time 26-31 ble det detektert en nedgang i kopitall. Den siste målingen viste en høyere ekspresjon der kopiantallet ble estimert til 0.02 mRNA kopier*celle⁻¹. Selv om disse målingene var lave, var det over deteksjonsgrensen for analysen som var $1.6\cdot 10^{-4}$ mRNA kopier*celle⁻¹. Genet for NO-reduktasen NorB var det genet som hadde høyest detektert uttrykt av de undersøkte genene i forsøket. Det høyeste kopiantallet var, som de andre genene, etter 12 timer. Der

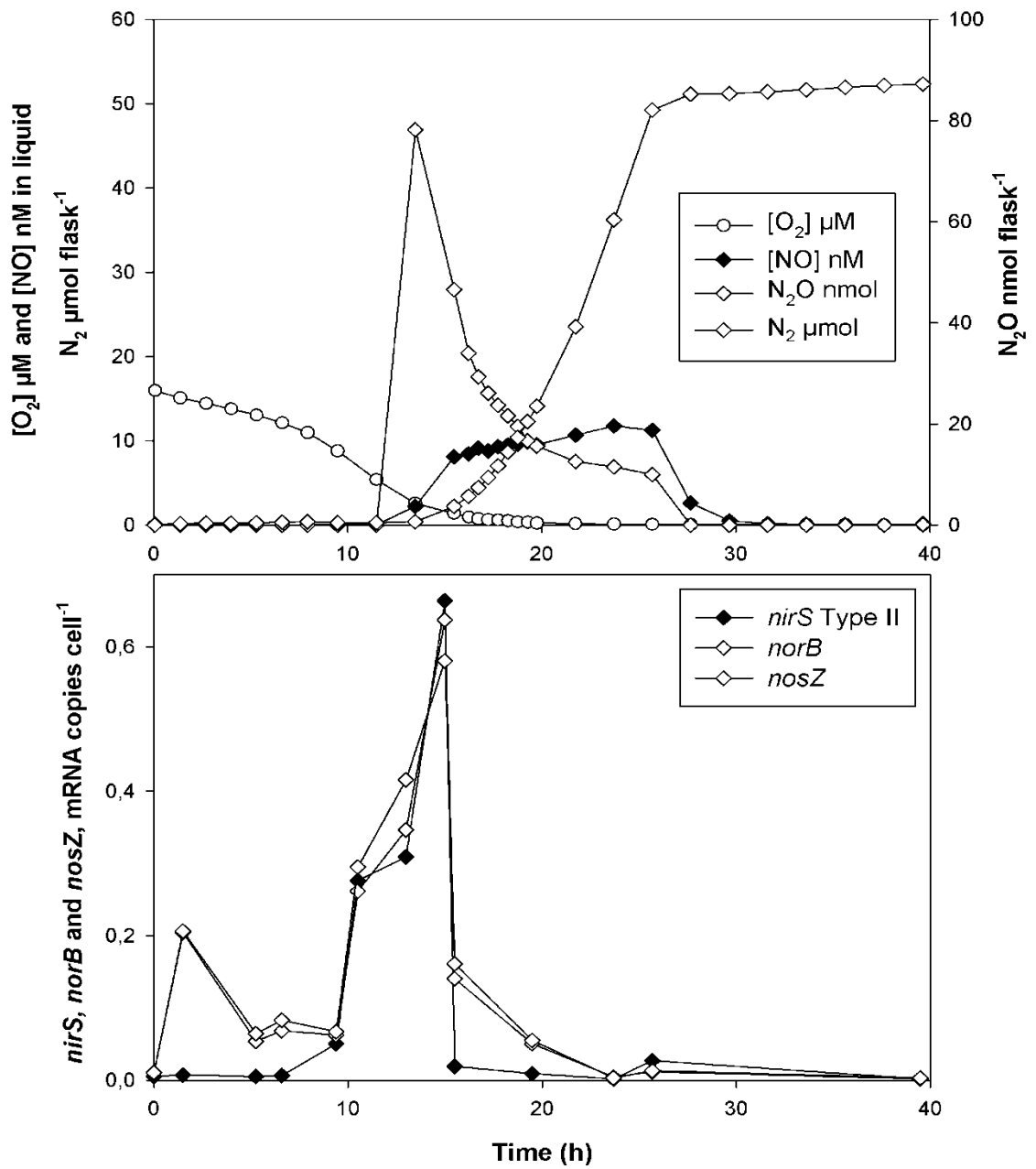
nådde ekspresjonen en topp på 35 mRNA kopier*celle⁻¹, hvor den så sank til 0.16 mRNA kopier*celle⁻¹ etter 15 timer, fem timer før kulturen ble anaerob som følge av oksygenrespirasjon. Ekspresjonen økte så igjen etter 16 timer og varierte noe under forsøkets forløp fram til time 24, der en kunne observere at ekspresjonen sank til et lavere kopitall. Etter 33 timer og frem til forsøkets slutt holdte ekspresjonen seg på et gjennomsnittlig nivå på 0.05 mRNA kopier*celle⁻¹. Antall *nosZ* transkripter nådde etter 12 timer en topp på 5 mRNA kopier*celle⁻¹, for så å ikke være uttrykt etter 15 timer. Det ble detektert en variasjon i ekspresjon mellom time 16-26 timer der det ble målt et variabelt kopitall fra time til time, før ekspresjonen sank til 0.03 mRNA kopier*celle⁻¹ etter 31 timer. Ekspresjonen av *nosZ* holdt seg deretter stabil helt til forsøkets slutt.

I etterkant av arbeidet med denne oppgaven, utførte Linda Liberg Bergaust et nytt forsøk med *T.sp 28* etter de samme kriterier som inkuberingsforsøkene i denne oppgaven. En kan se av Figur 3.19, at gasskinetikk og denitrifikasjonsmønster ligner de profilene som ble funnet av inkuberingsforsøkene med *T.sp 27* i denne oppgaven. Gasskinetikken i forsøket med *T.sp 28* utført av Linda Liberg Bergaust ga en nesten identisk profil som gasskinetikken fra forsøket med *T.sp 27*, under punkt 3.5.2.

Av den detekterte ekspresjonen ble det funnet at *nirS2* ikke øker i ekspresjon før oksygenet i kulturene er på omtrent 5 µM i kulturene. De andre undersøkte genene *norB* og *nosZ* har en noe lavere detektert ekspresjon i forhold til funn i forsøk med *T.sp 28* under punkt 3.8.



Figur 3.18: Figuren viser gasskinetikk (A) der konsentrasjonen av O_2 , NO, N_2O og N_2 er målt i et inkuberingsforsøk med *T.sp. 28*. Ekspresjonen som ble målt underveis i inkuberingsforsøket vises i ekspresjonsprofilen (B) der mRNA kopier* $celle^{-1}$ ble målt for *nirS2*, *norB* og *nosZ*.



Figur 3.19: Fremstilling av resultat fra inkuberingsforsøk med *T.sp 28* utført med de samme betingelser som tidligere forsøk i denne oppgaven. Figuren er lånt fra Linda Liberg Bergaust, som har utført dette forsøket.

3.11 Gasskinetikk og ekspresjonsprofil for *T. linaloolentis*.

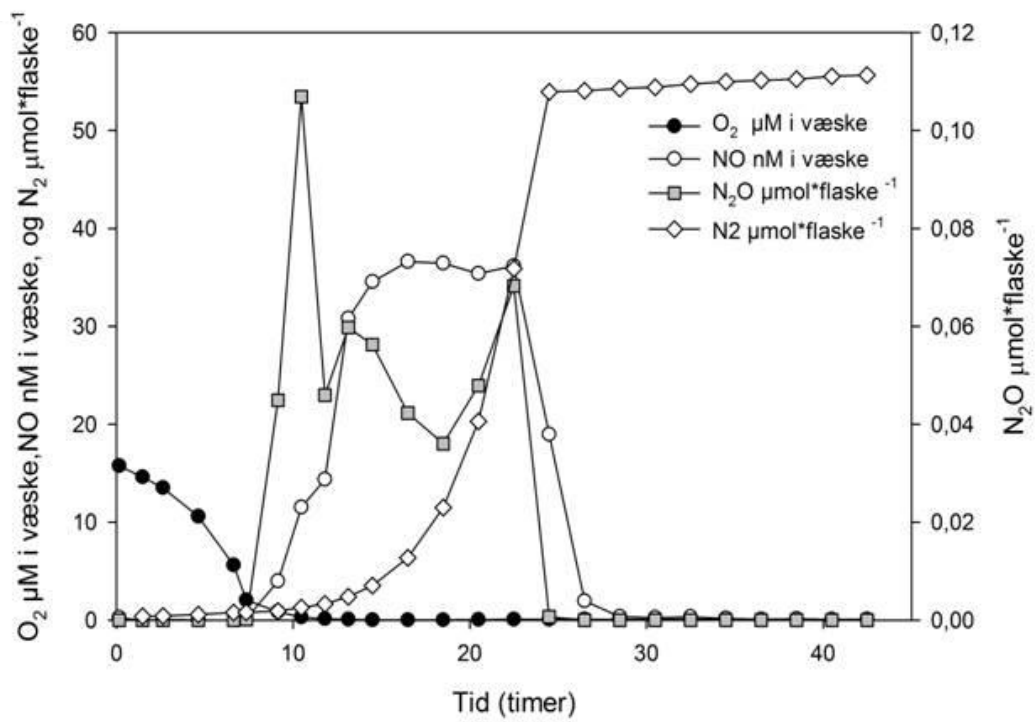
3.11.1 Gassdata

Forsøket med *T. linaloolentis* ble utført med samme betingelser som tidligere forsøk i denne oppgaven. Oksygenet ble målt til 15.5 μM i medium i starten av forsøket. Som vist i Figur 3.20, var konsentrasjonen av oksygen etter ca 10 timer tilnærmet null. Akkumulering av NO i kulturene startet sju timer etter forsøkets start. Gassen nådde en topp etter 16.5 timer der konsentrasjonen ble målt til 36 nM. Her holdt konsentrasjonen seg jevn fram til 22.5 timer der den sank og nådde en konsentrasjon tilnærmet null etter 26 timer. Konsentrasjonen av N_2O ble akkumulert i kulturen også etter ca sju timer og nådde raskt en topp på 0.1 $\mu\text{mol*flaske}^{-1}$ etter 10.5 timer. Etter en nedgang tidligere i forsøket, nådde konsentrasjonen en ny topp på 0.07 $\mu\text{mol*flaske}^{-1}$ etter 22 timer, før den sank raskt til en konsentrasjon på null etter 26 timer. Reduksjonen av N_2O til N_2 ga en rask økning i konsentrasjon av N_2 mellom 16.5 - 24.5 timer hvor konsentrasjonen nådde 53.9 $\mu\text{mol*flaske}^{-1}$.

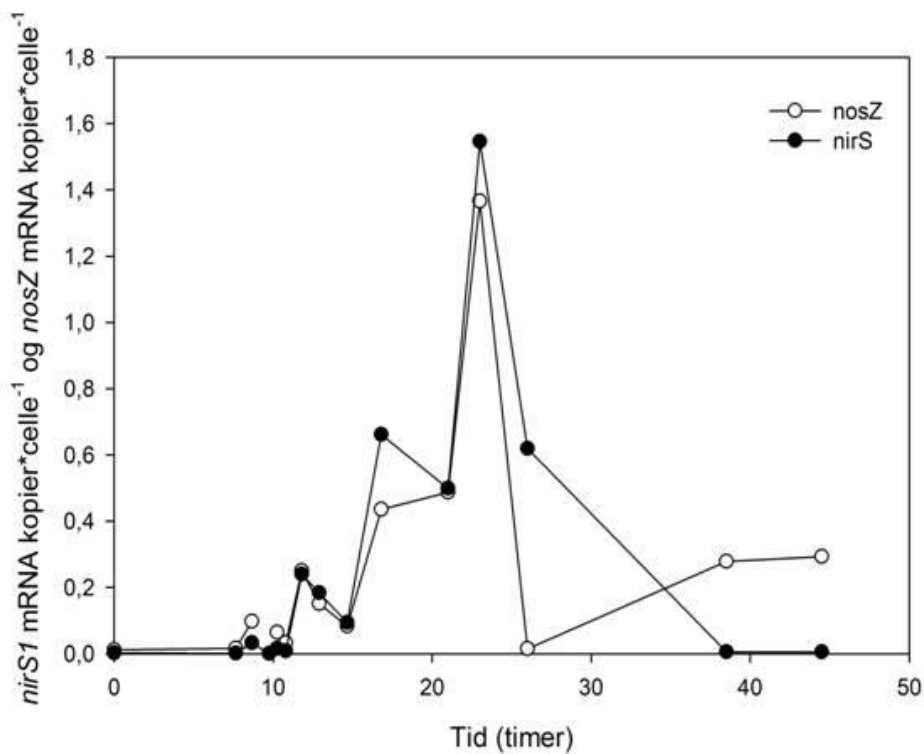
3.11.2 Ekspresjon av denitrifikasjonsgener

For *T. linaloolentis* var det utviklet primer/probes for genene *nirS1* og *nosZ*. Figur 3.20 viser ekspresjonen av disse genene underveis i inkuberingsforsøket. Det var ikke detektert en ekspresjon under deteksjonsgrensen av *nirS1* ved aerob dyrking av stammen, mens *nosZ* hadde en ekspresjon på 0.03 mRNA kopier* celle⁻¹. Ekspresjonen økte til 0.06 mRNA kopier* celle⁻¹ for *nirS1* og 0.01 mRNA kopier* celle⁻¹ for *nosZ* etter ca 10 timer, hvor ekspresjonen sankt igjen rett før oksygenet ble fullstendig respirert, og kulturene ble anaerobe. Deretter ble det detektert en økning i ekspresjon fram til time 23, der det ble målt 1.5 mRNA kopier* celle⁻¹ for *nirS1* og 1.4 mRNA kopier* celle⁻¹ for *nosZ*. Som vist i Figur 3.20 sank konsentrasjonen av NO og N_2O i flaskene etter ca 26 timer. Det samme kan sees av genekspresjonen, som nådde lavere kopitall. I motsetning til *nirS1* økte uttrykket av *nosZ* noe i slutten av forsøket, og holdte et kopitall på 0.3 mRNA kopier* celle⁻¹.

A



B



Figur 3.20: Gasskinetikk (A) der konsentrasjonen av O₂, NO, N₂O og N₂ er målt i et inkuberingsforsøk med *T. linaloolentis*. Ekspresjonen som ble målt underveis i inkuberingsforsøket vises i figur for genekspresjon (B) der mRNA kopier*celle⁻¹ er målt for *nirS1* og *nosZ*.

3.12 DRP sammenfatning av grunnleggende parametre

De grunnleggende egenskapene som faller innunder begrepet denitrification regulatory phenotype (DRP) karakteriseres utfra en organismes observerte gasskinetikk ved overgang fra aerob til anaerob respirasjon under standardiserte forhold. Parametrene for DRP for de ulike stammene er basert på konsentrasjon av O₂ i kulturen ved første deteksjon av NO, høyeste målte verdi av NO og N₂O i kulturene og ratioen mellom den lineære regresjonen av oksisk og anoksisk vekst ($\mu_{\text{anoksisk}} : \mu_{\text{oksisk}}$). Ved å benytte slike parametre kan man se hvordan de ulike stammene reagerer på overgangen fra oksiske til anoksiske forhold, og hvordan stammene akkumulerer gassene i kulturen (68).

I Tabell 3.20 er det vist en oversikt over de nevnte parametrene for stammene *T.sp 27*, *T.sp 28* og *T.linaloolentis*. I overgangen fra oksisk til anoksiske forhold virker *T.sp 28* å starte denitrifikasjon ved en noe lavere oksygenkonsentrasjon enn de to andre stammene. Denne parameteren gir en indikasjon på hvordan stammen reagerer på lavere konsentrasjon av oksygen. Mengden NO akkumulert i kulturene varierer her mellom alle tre kulturene. *T.sp 27* og *T.sp 28* holder NO på et kontrollert lavt nivå, i forhold til *T.linaloolentis* der NO akkumuleres til en konsentrasjon tilsvarende tre ganger så mye i kulturene. Mengde akkumulert N₂O virker å være noe mer jevnt for alle de tre undersøkte stammene. Parametrene μ_{anoksisk} og μ_{oksisk} gir oss en verdi på vekstraten til stammen ved anoksisk og oksisk vekst. Ved å se på ratioen mellom disse ratene kan man få en indikasjon på en gitt organismes evne til effektive overganger mellom respirasjonsstrategier og relativ energikonservering ved denitrifikasjon (68).

Tabell 3.20 Parametere basert på gasskinetikk av *T.sp 27*, *T.sp 28* og *T. linaloolentis* ved pH 7.8 og 1 % O₂ og 2mM KNO₃. Standardavvikene for beregningene er angitt i parentes.

	[O ₂] ved deteksjon av NO (μM)	NO _{max} (μM)	N ₂ O _{max} (μmol*flaske ⁻¹)	$\mu_{\text{anoksisk}} / \mu_{\text{oksisk}}$
<i>T.sp 27</i>	0.99 (0.7)	11.27 (3.9)	0.044 (0.02)	0.53 (0.2)
<i>T.sp 28</i>	0.34 (0.04)	8.35 (1.62)	0.042 (0.01)	0.35 (0.006)
<i>T. linaloolentis</i>	1.01 (0.17)	36.32 (1.2)	0.068 (0.001)	0.43 (0.014)

4 Diskusjon

Biokjemi, genetikk og regulering av denitrifikasjon er studert i detalj kun hos et fåtall modellorganismer tilhørende hovedsaklig α - og γ -*proteobacteria*. Inngående studier av et bredere utvalg denitrifiserende bakterier vil øke forståelsen av denne prosessen med implikasjoner for NO og N₂O emisjoner fra komplekse systemer som jord. Nylig er begrepet "Denitrification regulatory phenotype" (DRP) introdusert i en artikkel av Bergaust *et al.* (2010). En standardisering av parametre og datasett vil gjøre det mulig å sammenligne stammer og komplekse denitrifiserende samfunn genotypisk og fenotypisk. Denitrifikasjon spiller en stor rolle i emisjonen av drivhusgasser som NO og N₂O, og det er viktig å forstå hvordan prosessen er regulert hos ulike stammer av denitrifiserende bakterier, og særlig hos de som spiller en nøkkelrolle i naturlige økosystemer (6). Hensikten med dette arbeidet var å studere et utvalg av stammer tilhørende *Thauera*; deres regulering av denitrifikasjon og akkumulering av mellomprodukter fra prosessen. Slekten *Thauera* tilhører β -*proteobacteria*, og har en stor andel av denitrifiserende bakterier isolert fra jord og sediment, og den er en dominerende slekt i enkelte typer renseanlegg som kloakkrenseanlegg der avfallsvannet er rikt på nitrat, og det er til nå isolert over 50 stammer av *Thauera*. (49, 69, 70). Det er også kjent at slekten kan bryte ned lavmolekylære aromatiske hydrokarboner aerobt og anaerobt (71). Stammen *T.sp 27* har to utgaver av cytokrom *cd₁* nitrittreduktasen NirS som reduserer nitritt til NO; NirS1 og NirS2 (50). På bakgrunn av at genene som koder for reduktasene er noe fylogenetisk ulike (57 % sekvenslikhet for deler av genet) , er det foreslått at *nirS1* er overført til stammen via horisontal genoverføring (9, 50, 72). I et senere arbeid av Jones *et al.* (2008) er det beskrevet at de to utgavene av *nirS* i *Thauera* har en fylogenetisk ulikhet som indikerer en ulik evolusjonær bakgrunn. Det er her foreslått at det ikke er like sannsynlig med horisontal genoverføring, og at genet er blitt duplikert i stammen og forskjellene i gensekvensene er et resultat av evolusjonær utvikling (70, 72). Det ble også valgt å undersøke to ytterligere stammer av *Thauera* stammene som har hver sin utgave av reduktasen NirS. *T.sp 28* har reduktasen NirS2, og *T.linaloolentis* har reduktasen NirS1.

Parameteren $\mu_{\text{anoksisk}}:\mu_{\text{oksisk}}$ er en indikasjon på relativ energikonservering under aerob og anaerob respirasjon. En høy ratio en rask vekst under anoksiske forhold, noe som har vist seg å være tilfellet for *A. tumefaciens* ved benyttelse av nitritt som elektronakseptor og 1% oksygen (68). Forholdet mellom oksisk og anoksisk vekst hos de undersøkte stammene av *Thauera* i denne oppgaven viste seg å gi omtrent den samme ratioen som *P.denitrificans* med 1% oksygen og 2mM nitrat. I den senere studien av Liu *et al.* (innsendt til tidsskrift) viste resultatene at ratioen var noe høyere for *T.sp 28* og *T.linaloolentis*, noe som indikerte en raskere initiering av denitrifikasjon enn i mine forsøk (68). Da aerob respirasjon gir høyere energigevinst ($\Delta G^\circ = -238$ kJ) enn denitrifikasjon ($\Delta G^\circ = -224$ kJ), er det mest gunstig for denitrifiserende bakterier å ha et strengt reguleringsapparat rundt NO_x reduktasene, slik at elektronene styres mot O_2 så langt det er mulig. Utbyttet av ATP er tilnærmet halvparten ved denitrifikasjon sammenlignet med aerob respirasjon, der utbyttet er 5 ATP for hvert karbonatom (73). Hos flere studerte denitrifiserende organismer er det vist at oksygen inhiberer ekspresjon av denitrifikasjonsgener (13, 74). Inhiberingen kan skje på flere måter ved at de oksygensensitive regulatorene FixL og FNR regulerer transkripsjon av denitrifikasjonsgener. FixL autofosforyleres ved nærvær av oksygen, og aktiverer i sin tur FixJ, som aktiverer transkripsjon av respektive gener. FNR i *E.coli* har en oksygensensitiv [4Fe-4S]-gruppe som i kontakt med oksygen inaktiverer FNR. Inhibering kan også skje ved at oksygen direkte konkurrerer ned nitrat, og hindrer transport av nitrat gjennom periplasma gjennom den cytoplasmiske membran slik at nitrat ikke kan bli redusert av Nar (75, 76).

En av parametrene som faller under DRP beskrevet i denne oppgaven er konsentrasjon av oksygen ved første deteksjon av NO. De tre stammene undersøkt i denne oppgaven akkumulerte NO ved lave mikromolare nivå av oksygen (0.34-1.01 μM). I en studie av Liu *et al.* (70), starter akkumuleringen av NO hos *T.sp 27* og *T.sp 28* ved høyere oksygenkonsentrasjoner, og det er foreslått at disse stammene har evnen til å utføre denitrifikasjon under aerobe forhold. En slik konklusjon kan ikke trekkes ut i fra de resultatene funnet i denne oppgaven. I alle forsøkene viste resultatene at de undersøkte stammene holder et lavt nivå av NO i kulturene. Dette er viktig, da NO er toksisk ved høye konsentrasjoner og kan føre til celledød (6). En strikt regulering av NO bør derfor være tilstede i organismen slik at gassen ikke akkumuleres, eventuelt at stammen lever i miljø der

andre mikroorganismer fjerner NO. (6, 23) *T. sp.27* og *T.sp 28* er de stammene som holder NO-konsentrasjonen lavest i kulturene i forhold til *T. linaloolentis*, der det ble detektert to til tre ganger høyere konsentrasjon av NO. Dette kan tyde på en noe mindre stringent regulering av NO hos denne stammen slik at NO akkumuleres i større grad i kulturene. Konsentrasjonen er derimot ikke så høy at det virker toksisk for kulturen. Lignende resultater er funnet for *Paracoccus denitrificans* som også virker å ha en kontrollert regulering av NO i kulturen ($\text{NO}_{\text{max}} < 50\text{nM}$) (6). For *Agrobacterium tumefaciens* er det estimert akkumulert konsentrasjon av NO opp til $10\mu\text{M}$ i mediet, noe som kunne inhibere ytterligere reduksjon av nitrat (6). Dette er ikke tilfelle for noen av de undersøkte stammene i denne oppgaven noe som kan tenkes er på grunn av deres sensitivitet for NO.

I inkuberingsforsøkene med *T.sp 27* viser gasskinetikken (figur 3.5 og 3.6) at akkumuleringen av N_2O er noe ulik mellom forsøkene. Dette kan tyde på at regulering av N_2O ikke er veldig strengt regulert i denne stammen, eller i de andre undersøkte stammene. *T. linaloolentis* virker å være den stammen der det akkumuleres mest N_2O . Det at ikke N_2O blir strengt regulert hos disse stammene kan bety at de akkumulerer N_2O , noe som kan føre til utslipp av gassen. I *Pseudomonas aeruginosa* er regulering av *nos* genene kontrollert av regulatorer fra Crp-Fnr, familien, regulatorer som er funnet i forbindelse med denitrifikasjon hos flere stammer. Det er beskrevet at N_2O kun har en svak påvirkning av *nosZ* i motsetning til NO, som er en sterk regulator (77). Siden inkubasjonsforsøkene skjedde i lukkede kulturer, ble alt N_2O redusert til N_2 . I naturen er det ikke sikkert at dette ville dette ikke skjedd. Akkumulert N_2O kunne ha lekket til omgivelsene dersom produsert N_2O var høyere enn redusert N_2O i et miljø og bidratt til nedbrytning av ozon i stratosfæren.

Det ble undersøkt om *Thauera*-stammene benyttet i forsøkene i denne oppgaven uttrykte noen av denitrifikasjonsgenene under aerobe forhold. Av de undersøkte genene *nirS1*, *nirS2*, *norB* og *nosZ* ble det estimert kopitall som lå tett deteksjonsgrensen for analysen, og det ble konkludert med at stammene ikke uttrykte genene konstitutivt. Det kunne være en sannsynlighet at noe proteom fra frysestokk var grunnen til den detekterte ekspresjonen. Denne feilkilden ble tatt høyde for, ved at kulturene stadig ble fortynnet i nye medium for å fortynne proteom, samtidig var kulturene av så lav celletetthet at cellene ikke skulle

aggregere, og dermed hindre anoksiske mikromiljø og tidlig ekspresjon av reduktasegenene. En konstant lav ekspresjon av NO_x reduktasegenene kan være en fordel i miljøer der tilgangen på oksygen varierer sterkt. På denne måten vil bakterien raskt kunne gå fra aerob til anaerob respirasjon og ikke bli fanget i anoksiske miljø uten å ha muligheten til å benytte seg av elektronakseptor (78). Resultatene viste at stammene startet å uttrykke de undersøkte denitrifikasjonsgenene allerede før tilgjengelig oksygen var redusert (utenom *nirS2* fra *T.sp.27*). Maksimal ekspresjon inntraff ved nær fullstendig anaerobe forhold og i nærvær av NO. Ved å inneha et (NO_x) respirasjonsapparat som er sensitivt for synkende oksygenkonsentrasjoner og som sannsynligvis trigges ytterligere av nanomolare konsentrasjoner NO vil stammen kunne gå raskt og effektivt over til denitrifikasjon. Mikroorganismer som ikke har denne egenskapen, eller som ikke kan benytte andre anaerobe strategier eller fermentering, vil kunne befinne seg i et anoksiske miljø uten å ha tilgjengelige elektronakseptorer, og vil sannsynligvis gå over til en hvilefase (79).

Figur 3.8 viser gasskinetikk og ekspresjonsprofil (*nirS1*, *nirS2* og *nosZ*) i *T.sp.27* ved innsprøytning av 1 % oksygen under aktiv denitrifikasjon. Resultatene viste en fullstendig nedgang i konsentrasjonen av N₂O, og gassen ble ikke akkumulert i kulturen under den oksiske perioden. På det tidspunktet dette forsøket ble utført, var det enda ikke utviklet primere for *norB*, derfor ble *norB* ikke undersøkt. Av gasskinetikken ser det ut som om reduksjonen av NO til N₂O ikke skjer i denne perioden og det kan derfor tenkes at ekspresjonen av *norB* blir inhibert av oksygen, eller at selve reduktasen blir inhibert (61). I en studie der det ble fokusert på denitrifiserende bakterier fra jordprøver ble det vist at kulturer som ble tilsatt oksygen under denitrifikasjon ved anoksiske forhold fortsatte denitrifikasjonen der endeproduktet ble N₂O på grunn av inhibering av N₂OR (80) I et nylig arbeid med *Thauera* av Liu *et al.* (Innsendt til tidsskrift) ble det også tilsatt oksygen i kulturene etter indusering av denitrifikasjon. Det ble her tilstatt oksygen gjentatte ganger, noe som så ut til å inaktivere NosZ, men ikke de andre undersøkte reduktasene. Dette kom ikke klart fram av resultatene i denne oppgaven, trolig på grunn av at det ble tilsatt for lite oksygen til å kunne gi utslag på NosZ (70).

I forsøk med *T.sp 27* ble det undersøkt hvordan stammen responderte på overgangen fra anoksiske til oksiske forhold under primære DRP egenskaper. I Etchebehere og Tiedje (2004) er det foreslått at *nirS1* uttrykkes konstitutivt og ikke er under oksygen eller nitratregulering, mens *nirS2* responderer på nitrat, men ikke oksygen (50). Av undersøkelsene av ekspresjon med *T.sp 27* viste resultatene at *nirS1* var lavt uttrykt under aerobe forhold uten nitrat, men overgangen til anoksiske forhold i kulturene resulterte i en kraftig økning i ekspresjon av både *nirS1* og *nirS2*. Dette viser at reduksjonen av nitritt til NO er sterkt regulert av oksygentilgjengelighet, men NO er også en sannsynlig regulator. På grunn av den kraftige økningen i ekspresjon ved anoksiske forhold i kulturene kan en konkludere med at stammen ikke uttrykker genene som koder for nitrittreduktase type 1 eller type 2 konstitutivt. I et inkuberingsforsøk med *T.sp 27*, der det ble tilsatt ytterligere 1 mL oksygen 28 timer ut i forsøket, viste resultatene i figur 3.8 at ekspresjonen av begge genene tydelig responderte på oksygen ved at den detekterte ekspresjonen sank ved tilsetningen av oksygen. Deretter økte ekspresjonen 0.5-10 ganger der forholdene i kulturen var tilnærmet anoksiske. Det er likevel viktig å påpeke her at reduktasene fortsatt kunne være aktive. Resultatene viste at kulturen hadde evne til raskt å kunne gå fra anaerob til aerob respirasjon og så benytte denitrifikasjon når all oksygenet var redusert i kulturen. Stammen kan derfor være konkurransedyktig i skiftende miljø hvor oksygen kan være en begrensende faktor, og har evnen til å benytte denitrifikasjon selv ved lave oksygenkonsentrasjoner. Dette er også vist i alle forsøkene der en kan se av resultatene at ekspresjonen øker noe rett før kulturene blir anoksiske. Dette viser at stammene kunne uttrykke de undersøkte reduktasene allerede før alt tilgjengelig oksygen var redusert. På denne måten initierer stammen denitrifikasjonsapparatet på et tidspunkt før oksygenet er fullstendig redusert slik at den ikke blir "fanget" i miljøet uten å kunne benytte tilgjengelige elektronakseptorer. En annen forklaring på økningen av ekspresjonen kan være en reaksjon på endringen i oksygenkonsentrasjon fra dyrking i vanlig atmosfære (21 % oksygen) til en oksygenkonsentrasjon på 1 % ved inkubasjonsforsøkene.

Serien med eksperimenter som er beskrevet her ble utført under langt mer stringente betingelser enn forsøkene som lå til grunn for Etchebehere og Tiedjes konklusjoner (50). Kontinuerlig røring av kulturene var svært viktig for å sikre en god gassutveksling mellom

væske- og gassfase samt hindre aggregering av cellene i kulturen. Kulturene som ble benyttet som inokulanter til inkubasjonsforsøkene var av svært lav optisk densitet for å hindre anaerobe mikrokulturer. Det ble også undersøkt for aerob ekspresjon av denitrifikasjonsgener, samt at det ble lagd filterpreparater av disse kulturene, slik at man kunne se en eventuell aggregering. Det ble ikke påvist aggregering i noen av startkulturene, og ekspresjonen under aerobe forhold uten tilsatt nitrat i mediet, ble målt til betydelig lavere verdier enn den anaerobe ekspresjonen målt i inkubasjonsforsøkene. I Etchebehere og Tiedje (2004) ble den aerobe ekspresjonen av *nirS1* uten tilsatt nitrat i dyrkingsmediet estimert til å ha en 380 ganger høyere ekspresjon enn det som ble estimert i våre resultater. De største forskjellene mellom resultatene i Etchebehere og Tiedje (2004) og resultatene i denne oppgaven ble funnet for *nirS2*. Den aerobe ekspresjonen etter tilsetning av nitrat (KNO_3 i denne oppgaven) av *nirS2* var målt til 4.9 kopier mRNA*celle⁻¹ i motsetning til resultatene i denne oppgaven ble målt til $1.0 \cdot 10^{-2}$ kopier mRNA*celle⁻¹ som den høyeste aerobe ekspresjonen. Av deres resultat kommer det også frem at det ikke var noe betydelig forskjell i ekspresjon mellom aerob og anaerob dyrking med nitrat for *nirS2*, i motsetning til våre resultat der ble detektert 100 ganger høyere ekspresjon etter overgangen fra aerobe til anaerobe forhold i kulturene. Deres resultat tilsier, som nevnt tidligere, at *nirS1* uttrykkes i større grad aerobt (459 kopier mRNA*celle⁻¹) i forhold til anerobt (83.2 kopier mRNA*celle⁻¹). Våre resultat tilsier det motsatte, der man har en økning av ekspresjon på omtrent 1000 ganger ved anoksiske forhold.

Ved forsøk 1 og 2 med *T.sp 27* ble det funnet veldig store forskjeller i ekspresjonsnivå av denitrifikasjonsgenene. Grunnen til at resultatene fra forsøk 2 tilsynelatende hadde en lavere estimert ekspresjon enn forsøk 1 kunne være fordi denitrifikasjonshastigheten var mye høyere ved dette forsøket, slik at det var mye vanskeligere å få tatt en prøve nøyaktig der ekspresjonen var høyest. En annen teori som kan forklare forskjellen i ekspresjon er faktorer som gir en stokastisk ekspresjon som gir en forskjell i ekspresjon fra celle til celle. Hvor en celle befinner seg i cellyklusen kan påvirke ekspresjonen. Den høyeste ekspresjonen ble detektert ved anoksiske forhold i kulturene, og det kan derfor konkluderes med at ingen av stammene uttrykker de undersøkte genene konstitutivt.

I oppgaven ble det i tillegg utført inkubasjonsforsøk med *T.sp 28* og *T.linaloolentis*. Disse stammene innehar hver sin utgave av de nevnte nitrittreduktasene. *T.sp 28* som benytter *nirS2* for å redusere nitritt til NO, virker å uttrykke genet mye lavere enn *T.sp 27*. Dette er derimot en noe usikker antydning, da mye tyder på at mRNA har blitt degradert under behandling og analysing av prøvene. I et senere forsøk med *T.sp 28* utført av Linda Liberg Bergaust ga den detekterte ekspresjonen en bedre profil. Ekspresjonsmønsteret lignet ekspresjonen hos *T.sp 27*, men viste lavere ekspresjonen av *norB* og *nosZ*, og høyere ekspresjon av *nirS2* enn detektert for *T.sp 28* tidligere. Også hos *T.linaloolentis*, som benyttet NO reduktasen kodet av *nirS1*, var det detektert ekspresjon av *nirS1* som var over 550 ganger lavere enn for høyeste detekterte ekspresjon av genet hos *T.sp.27*. Man har tidligere sett at nivåer av ekspresjon har variert sterkt mellom stammer og isolater. En teori er at variasjoner i transkripsjon avhenger av faktorer som for eksempel celledyklus (81). I alle stammene ble det detektert ekspresjon av de respektive *nirS*-gener noe før NO ble akkumulert til detekterbare konsentrasjoner, det samme gjelder og for *norB*. Ut i fra resultatene fra inkubasjonsforsøkene kan en teori være at ekspresjon av *nor* krever at konsentrasjonen av oksygen ikke er for høy, samt et NO signal og en transkripsjonell faktor som under anaerobe forhold vil aktivere transkripsjon av både nitritt- og NO-reduktaser.

Når en sammenligner gasskinetikken og ekspresjonen av de undersøkte stammene, ser en store forskjeller i ekspresjonsmønsteret. *T. linaloolentis* virker å være en stamme der NO akkumuleres i større grad i kulturen enn i de andre stammene, og ekspresjon av de undersøkte denitrifikasjonsgenene er høyest der signal av NO er høyest. Alle stammene virker å ha en streng regulering av NO, noe som mest sannsynlig gjenspeiler deres sensitivitet for dette toksiske radikalet. NO er som nevnt et svært viktig signalmolekyl for ekspresjon av både *nir* og *nor* (82)

Forsøk som er basert på målinger av gasskinetikk under kontrollerte forhold gjør det mulig å samle datasett som en kan benytte som parametre under begrepet denitrification regulatory phenotype DRP . Sammen med detektering av ekspresjon ved real-time PCR utgjør det en studie av fenotypiske og genotypiske karakteristikk. Det har tidligere vært lite fokusert på denitrifiserende bakterier innen β -undergruppen av Proteobacteria, som *Thauera* hører til under. Alle stammene undersøkt i denne oppgaven virket å ha en stringent kontroll av NO,

noe som indikerte deres følsomhet for den toksiske gassen NO, i motsetning til mellomproduktet N₂O virket ikke å være strengt regulert.

Resultatene fra ekspresjon og regulering av *nirS1* og *nirS2* hos *T.sp 27* viste at *nirS1* ikke var konstitutiv uttrykt, og både *nirS1* og *nirS2* responderte tydelig på oksygen. Disse resultatene var noe motstridende for hva som var beskrevet i Etchebehere og Tiedje (2005). Forsøkene i denne oppgaven ble utført under mer kontrollerte forhold, noe som gir grunn til å til å konkludere med våre funn.

5 Referanseliste

1. Spanning, R. J. M. Richardson, D. J. & Ferguson, S. J. (red.). (2007). *Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification*. Biology of the Nitrogen cycle. Amsterdam: Elsevier.
2. Francis, C., Beman, M. & Kuypers, M. M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle; the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* (1): 19-27.
3. Maier, R. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*: Academic press.
4. Stolz, J. F. & Partha, B. (2002). Evolution of Nitrate Reductase: Molecular and Structural Variations on a Common Function. *ChemBiochem* (3): 198-206.
5. Lam, P., Lavik, G., Jensen, M., Vossenberg, J. v. d., Schmid, M., Woebken, D., Gutie, D., Amann, R., Jetten, M. S. M. & Kuypers, M. M. (2009). Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone *PNAS*, 106 (12): 4752–4757.
6. Bergaust, L. (2008). *Regulatory Biology Of Denitrification In Agrobacterium Tumefaciens And Paracoccus Denitrificans; Responses To Environmental Controllers*. Ås: UMB.
7. Bothe, H., Ferguson, S. J. & Newton, W. E. (2007). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier (red.). Amsterdam.
8. Ferguson, S., Richardson, D. J. & Spanning, R. J. M. (red.). (2007). *Biochemistry and Molecular Biology of Nitrification*. Biology of the Nitrogen Cycle. Amsterdam: Elsevier.
9. Frostegård, Å. (2010).
10. Huub, J. M., Camp, O. d., Jetten, M. S. M. & Strous, M. (2007). *Anammox*. Biology of the Nitrogen cycle: Elsevier.
11. Mohan, S. B. & Cole, J. A. (red.). (2007). *The Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonia by Anaerobic Bacteria*. Biology of the Nitrogen Cycle. Amsterdam: Elsevier.
12. Demanèche, S., Philippot, L., David, M. M., Navarro, E., Vogel, T., M. & Simonet, P. (2009). Characterization of Denitrification Gene Clusters of Soil Bacteria via a Metagenomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (2): 534-537.
13. Zumft, W. G. (1997). Cell biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (4): 533-616.
14. Hallin, S., Braker, G. & Philippot, L. (2007). *Molecular Tools to Assess the Diversity and Density of Denitrifying Bacteria in Their Habitats*. Biology of the Nitrogen Cycle: Elsevier.
15. Richardson, D. J., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A. & Baggs, E. (2009). Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle-could enzymatic regulation hold the key? *Trends in Biotechnology*, 27 (7): 388-397.
16. Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Goyer, C., Trevors, J. T., Zebbarh, B. J. & Burton, D. L. (2008). Nitric Oxide Reductase Gene Expression and Nitrous Oxide Production in Nitrate-Grown *Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (22): 6876-6879.
17. Patureau, D., Zumstein, E., Delegenes, J. P. & Moletta, R. (2000). Aerobic denitrifiers Isolated from Diverse Natural and Managed Ecosystems. *Microbial Ecology*, 39: 145-152.
18. Zumft, W. G. & Kroneck, P. M. H. (2007). Respiratory Transformation of Nitrous Oxide (N₂O) to Dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*, 52: 107-227.
19. Eutrofi. Tilgjengelig fra: <http://www.ytre-oslofjord.no/eutrofi.htm>.
20. Bergaust, L. (2008). *Regulatory Biology of Denitrification in Agrobacterium Tumefaciens and Paracoccus Denitrificans; Responses to Environmental Controllers*. Ås: UMB.
21. Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577: 355-376.
22. Cleemput, O. V. & Baert, L. (1984). Nitrite: a key compound in N loss processes under acid conditions? *Plant and Soil*, 76: 233-241.

23. Rodinov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J. & Gelfand, M. S. (2005). Dissimilatory Metabolism of Nitrogen Oxides in Bacteria: Comparative Reconstruction of Transcriptional Networks. *PLoS computational biology*, 1 (5).
24. Bartnikas, T. B., Tosques, I. E., Laratta, W. E., Jiarong, S. & Shapleigh, J. (1997). Characterization of the Nitric Oxide Reductase-Encoding Region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Journal of Bacteriology*, 179 (11): 3534-3540.
25. Bakken, L. R. & Dörsch, P. (2007). *Nitrous Oxide Emission and Global Changes: Modeling Approaches*. Biology of the Nitrogen Cycle: Elsevier.
26. Haltia, T., Brown, K., Tegoni, M., Cambilliau, C., Saraste, M., Mattila, K. & Djinić-Carugo, K. (2003). Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1,6Å resolution. *Biochem J*, 269: 77-88.
27. Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16s rRNA *narG*, *nirK*, and *nosZ* in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (8): 5181-5189.
28. Raloff, J. (2009). *Nitrous oxide fingered as monster ozone slayer*.
29. Etcebehere, C. & Tiedje, J. (2005). Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5642-5645.
30. Richardson, D. J., Berks, B. C., Russel, D. A., Spiro, S. & Taylor, C. J. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 165-178.
31. van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J. & Ferguson, S. J. (2007). *Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification*. Biology of the Nitrogen Cycle: Elsevier.
32. Richardson, D. J., Spanning, R. J. M. & Ferguson, S. J. (2007). *The Prokaryotic Nitrate Reductases*. Biology of the Nitrogen cycle: Elsevier.
33. Bru, D., Sarr, A. & Philippot, L. (2007). Relative Abundances of Proteobacterial Membrane-Bound and Periplasmic Nitrate Reductases in Selected Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (18): 5971-5974.
34. Richardson, D. J., Berks, B. C., Russel, D. A., Spiro, S. & Taylor, C. J. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 165-178.
35. Yan, T., Fields, M. W., Wu, L., Zu, Y., Tiedje, J. & Zhou, J. (2003). Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*NirK* and *NirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology*, 5 (1): 13-24.
36. Rinaldo, S. & Cutruzzolà, F. (2007). *Nitrite Reductases in Denitrification*. Biology of the Nitrogen Cycle: Elsevier.
37. Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16s rRNA *narG*, *nirK*, and *nosZ* in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (8): 5181-5189.
38. Horn, M. A., Drake, H. L. & Scramm, A. (2005). Nitrous Oxide Reductase Genes (*nosZ*) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogenetically Similar. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2): 1019-1026.
39. Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M. & Vartosis, C. (2002). Nitric-oxide Reductase. Structure and Properties of the Catalytic Site from Resonance Raman Scattering. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (26): 23407-23413.
40. Dandie, C. E., Miller, M. N., Burton, D. L., Zebarth, B. J., Trevors, J. T. & Goyer, C. (2007). Nitric Oxide Reductase-Targeted Real-Time PCR Quantification of Denitrifier Populations in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (13): 4250-4258.
41. Zumft, W. G. (2004). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of inorganic biochemistry*, 99: 194-215.

42. Scala, D. J. & Kerkhof, L. J. (1998). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS microbiology letters*, 162: 61-68.
43. Härtig, E. & Zumft, W. G. (1998). Kinetics of *nirS* Expression (Cytochrome *cd1* Nitrite Reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the Transition from Aerobic Respiration to Denitrification: Evidence for a Denitrification-Specific Nitrate and Nitrite-Responsive Regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 181 (1): 161-166.
44. Körner, H, Sofia, H. J. & Zumft, W. G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiology Reviews* (27): 559-592.
45. Philippot, L. & Højberg, O. (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446: 1-23.
46. Song, B., Palleroni, N. J., Kerkhof, L. J. & Häggblom, M. M. (2001). Characterization of halobenzoate-degrading denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 589-602.
47. Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N. & Fuchs, G. (2002). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch Microbiol*, 178: 26-35.
48. Staley, J., Brenner, D., Garrity, G. & Boone, D. (red.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume two: The proteobacteria (Part C)*. East Lansing: Springer Science.
49. Liu, B., Zhang, F., Feng, F., Liu, Y., Yan, X., Zhang, X., Wang, L. & Zhao, L. (2005). *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactors revealed by microbial community structure comparison. *FEMS microbiology letters*, 55 (2).
50. Etcebehere, C. & Tiedje, J. (2005). Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5642-5645.
51. Molstad, L., Dörsch, P. & Bakken, L. R. (2007). Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures. *Journal of microbiological methods*, 71: 202-211.
52. Brown, T. A. (2007). *Genomes 3*. 3 utg.: Garland science publishing.
53. web. PCR. Tilgjengelig fra: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
54. Burr, M. D., Josephson, K. L. & Pepper, I. L. (1998). An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 24-30.
55. Olive, M. D. & Bean, P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-based typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6): 1661-1669.
56. Brujin, F. J. (1992). Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (7): 2180-2187.
57. Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005). Real time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85.
58. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. J. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 85 (7).
59. Web. *TaqmanProbe*. Tilgjengelig fra: https://academics.skidmore.edu/wikis/bi_378_capstone/images/PCR_TPM.gif.
60. Web. *Real time PCR*. Tilgjengelig fra: <http://www.ionchannels.org/content/images/14-02.jpg>.
61. Braker, G. & Tiedje, J. (2003). Nitric Oxide Reductase (*norB*) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 3476-3483.

62. Liu, B., Mørkved, P. T., Frostegård, Å. & Bakken, L. R. (2010). Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS microbiology letters*, 72: 407-417.
63. Bergaust, L., Mao, Y., Frostegård, Å. & Bakken, L. R. (2010). Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6387-6396.
64. Etcebehere, C. & Tiedje, J. (2005). Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5642-5645.
65. Koch, D. D. & Peters, T. (2001). *Evaluation of Methods- with an Introduction to Statistical Techniques*. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: Saunders.
66. NCBI.
67. Molstad, L., Dörsch, P. & Bakken, L. R. (2007). Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures. *Journal of microbiological methods*, 71: 202-211.
68. Bergaust, L., Frostegård, Å. & Bakken, L. R. (2010). *Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria*.
69. Liu, B., Zhang, F., Feng, X., Liu, Y., Yan, X., Zhang, X., Wang, L. & Zhao, L. (2006). *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactors revealed by microbial communitystructure comparison. *FEMS microbiology letters*, 55: 274-286.
70. Liu, B. (2010). *Denitrification regulatory phenotypes and genotypes in the genus Thauera responses to NO_x, O₂ and different pH levels*. Upublisert manuskript.
71. Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N. & Fuchs, G. (2002). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch Microbiol*, 178: 26-35.
72. Jones, C. M., Blaz, S., Rosenquist, M. & Hallin, S. (2008). Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (9): 1955-1966.
73. Fenchel, T., King, G. M. & Blackburn, T. H. (1998). *Bacterial Biogeochemistry*: Elsevier.
74. Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M., Kostka, J. E., Lavik, G., de Beer, D., Zhou, H.-y. & Kuyper, M. M. (2009). Aerobic denitrification in permeable Wadden sea sediments. *The ISME Journal*, 4: 417-426.
75. Spanning, R. J. M., Richardson, D. J. & Ferguson, S. J. (2007). *Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification*. Biology of the Nitrogen Cycle: Elsevier.
76. Ferguson, S. (1994). Denitrification and its control. *Antoine van Leeuwenhoek*, 66: 89-110.
77. Zumft, W. G. & Körner, H. (2007). *Nitrous Oxide Reductases*. Biology of the Nitrogen Cycle. Amsterdam: Elsevier.
78. Bergaust, L., Shapleigh, J., Frostegård, Å. & Bakken, L. R. (2008). NO_x reductases in *Agrobacterium tumefaciens*: the influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental Microbiology*, 10 (11): 3070-3081.
79. Bergaust, L., Mao, Y., Bakken, L. R. & Frostegård, Å. *Transcription and expression of NO_x reductases in Paracoccus denitrificans driven by oxygen depletion; inhibitory effects of suboptimal pH*.
80. Morley, N., Baggs, E., Dörsch, P. & Bakken, L. R. (2008). Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂⁻ and O₂ concentrations. *FEMS microbiology letters*, 65: 102-112.
81. Raj, A. & Oudenaarden, A. (2008). Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell*, 135: 216-226.

82. Baek, S. H. & Shapleigh, J. (2005). Expression of Nitrite Oxide Reductases in Free-Living and Plant associated *Agrobacterium tumefaciens* C58 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4427-4436.

6 Vedlegg

6.1 Vedlegg 1

Third Edition

April 2010

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from

- whole blood
- plasma
- serum
- buffy coat
- lymphocytes
- dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only)
- body fluids
- cultured cells
- swabs
- tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)



Sample & Assay Technologies

2. Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample.

The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.

2a. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 ml microcentrifuge tube, and add 180 μ l of Buffer ATL. Proceed with step 3.

It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time.

2 ml microcentrifuge tubes may be better suited for lysis.

2b. Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 ml microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180 μ l of Buffer ATL. Proceed with step 3.

2c. Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 ml microcentrifuge tube containing no more than 80 μ l PBS. Homogenize the sample using the TissueRuptor or equivalent rotor-stator homogenizer. Add 100 μ l Buffer ATL, and proceed with step 3.

Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. Add 20 μ l proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.

Note: Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. In order to ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

5. If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.

- 5a. First add 4 µl RNase A (100 mg/ml), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 µl Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.**

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

- 5b. Add 200 µl Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.**

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

- 6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.**

It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

Do not use alcohols other than ethanol since this may result in reduced yields.

- 7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 × g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.***

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column.

Centrifugation is performed at 6000 × g (8000 rpm) in order to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Procedure

- C1. Place a small section (not more than 25 mg) of paraffin-embedded tissue in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).
- C2. Add 1200 µl xylene. Vortex vigorously.
- C3. Centrifuge at full speed for 5 min at room temperature.
- C4. Remove supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.
- C5. Add 1200 µl ethanol (96–100%) to the pellet to remove residual xylene and mix gently by vortexing.
- C6. Centrifuge at full speed for 5 min at room temperature (15–25°C).
- C7. Carefully remove the ethanol by pipetting. Do not remove any of the pellet.
- C8. Repeat steps C5–C7 once.
- C9. Incubate the open microcentrifuge tube at 37°C for 10–15 min until the ethanol has evaporated.
- C10. Resuspend the tissue pellet in 180 µl Buffer ATL and follow the "Protocol: DNA Purification from Tissues" from step 3 (page 34).

Isolation of genomic DNA from formalin-fixed tissues

- C1. Wash tissue sample twice with PBS to remove fixative.
- C2. Process sample according to the "Protocol: DNA Purification from Tissues" on page 33.

Appendix D: Protocols for Bacteria

These protocols have been used successfully for bacteria such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs, *Borrelia burgdorferi* from cerebrospinal fluid, and *Legionella pneumophila* from broncho-alveolar lavage. For other bacteria, follow the protocol for Gram-positive bacteria, especially other Gram-positive bacteria, which may be difficult to lyse.

For isolation of bacterial DNA from urine, either follow the protocol for biological fluids, or use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to destroy these inhibitors.

Some bacteria (particularly Gram-positive bacteria) require pre-incubation with specific enzymes such as lysozyme* or lysostaphin* (e.g., staphylococci) to lyse the rigid multilayered cell wall. In these cases the protocol for Gram-positive bacteria should be used.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

Additional reagents required

- For swabs: Phosphate-buffered saline (PBS)* containing a common fungicide*
- For Gram-positive and difficult-to-lyse bacteria: 20 mg/ml lysozyme or 200 µg/ml lysostaphin solution in 20 mM Tris-Cl, * pH 8.0, 2 mM EDTA, * 1.2% Triton®*

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Isolation of bacterial DNA from biological fluids

- D1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 × g (7500 rpm).
- D2. Resuspend bacterial pellet in 180 µl Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
- D3. Follow the "Protocol: DNA Purification from Tissues" from step 3 (page 34).

Isolation of bacterial DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs†

- D1. Collect samples and place in 2 ml PBS containing a common fungicide. Incubate for several hours at room temperature.
- D2. Follow the biological fluids protocol above from step D1.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

† See also "Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)" on page 37.



MOLECULAR PROBES®

Qubit™ dsDNA BR Assay Kits

For use with the Qubit® 2.0 Fluorometer

Table 1. Contents and storage information.

Material	Amount	Concentration	Storage	Stability
Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)	250 µL or 1.25 mL	200X concentrate in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> • Room temperature • Desiccate • Protect from light 	When stored as directed, kits are stable for 6 months
Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)	50 mL or 250 mL	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Room temperature 	
Qubit™ dsDNA BR standard #1 (Component C)	1 mL or 5 mL	0 ng/µL in TE buffer	<ul style="list-style-type: none"> • ≤4°C 	
Qubit™ dsDNA BR standard #2 (Component D)	1 mL or 5 mL	100 ng/µL in TE buffer		

NA = Not applicable.

Introduction

The Qubit™ dsDNA BR Assay Kits for use with the Qubit® 2.0 Fluorometer make DNA quantitation easy and accurate. The kit provides concentrated assay reagent, dilution buffer, and pre-diluted DNA standards. Simply dilute the reagent using the buffer provided, add your sample (any volume between 1 µL and 20 µL is acceptable), and read the concentration using the Qubit® 2.0 Fluorometer. The assay is highly selective for double-stranded DNA (dsDNA) over RNA (*Appendix*, Figure 1) and is accurate for initial sample concentration from 100 pg/µL–1,000 ng/µL. The assay is performed at room temperature, and the signal is stable for 3 hours. Common contaminants, such as salts, free nucleotides, solvents, detergents, or protein are well tolerated in the assay (*Appendix*, Table 2). In addition to the Qubit™ dsDNA BR Assay Kits described here, we offer other kits for assaying RNA, protein, and dsDNA at a lower concentration range (*Appendix*, Table 3).

To determine the purity of your sample, use the Qubit™ dsDNA BR Assay Kit together with the Qubit™ RNA Assay Kit. These measurements will give you a much better indication of sample purity than that produced by an A_{260}/A_{280} measurement. To measure protein contamination in nucleic acid samples, simply run 1–20 µL of the sample in the Qubit™ protein assay.

Note: All Qubit™ assay kits can also be used with the Qubit® 1.0 Fluorometer.

Before You Begin

Materials Required but Not Provided

- Plastic container (disposable) for mixing the Qubit™ working solution
- Qubit™ assay tubes (500 tubes, Cat. no. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830)

Storing the Qubit™ dsDNA BR Assay Kits

The Qubit™ dsDNA BR reagent and buffer are designed for room temperature storage. The Qubit™ dsDNA BR reagent is supplied in DMSO, which freezes at temperatures lower than room temperature. Store the DNA standards at 4°C.

Critical Assay Parameters

Assay Temperature

The Qubit™ dsDNA BR assay for the Qubit® 2.0 Fluorometer delivers optimal performance when all solutions are at room temperature (22–28°C). The Qubit™ assays were designed to be performed at room temperature, as temperature fluctuations can influence the accuracy of the assay (*Appendix*, Figure 2). To minimize temperature fluctuations, store the Qubit™ dsDNA BR reagent and the Qubit™ dsDNA BR buffer at room temperature and insert all assay tubes into the Qubit® 2.0 Fluorometer only for as much time as it takes for the instrument to measure the fluorescence, because the Qubit® 2.0 Fluorometer can raise the temperature of the assay solution significantly, even over a period of a few minutes. Do not hold the assay tubes in your hand before reading, as this will warm the solution and result in a low reading.

Incubation Time

To allow the Qubit™ assay to reach maximum fluorescence, incubate the tubes for the DNA and RNA assays for 2 minutes after mixing the sample or standard with the working solution. After this incubation period, the fluorescence signal is stable for 3 hours at room temperature.

Photobleaching of the Qubit™ Reagent

The Qubit™ reagents exhibit high photostability in the Qubit® 2.0 Fluorometer, showing <0.3% drop in fluorescence after 9 readings and <2.5% drop in fluorescence after 40 readings. It is important to remember, however, that if the assay tube remains in the Qubit® 2.0 Fluorometer for multiple readings, a temporary reduction in fluorescence will be observed as the solution increases in temperature (see *Appendix*, Figure 2). (The temperature inside the Qubit® 2.0 Fluorometer may be as much as 3°C above room temperature after 1 hour.) For this reason, if you want to perform multiple readings of a single tube, you should remove the tube from the instrument and let it equilibrate to room temperature for 30 seconds before taking another reading.

Calibrating the Qubit® 2.0 Fluorometer

For each assay, you have the choice to run a new calibration or to use the values from the previous calibration. As you first use the instrument, you should perform a new calibration each time. As you become familiar with the assays, the instrument, your pipetting accuracy, and significant temperature fluctuations within your laboratory, you should determine the level of comfort you have using the calibration data stored in from the last time the instrument was calibrated. Remember also that the fluorescence signal in the tubes containing standards and the samples is stable for no longer than 3 hours. See Figure 3 in the *Appendix* for an example of the calibration curve used to generate the quantitation results.

Handling and Disposal

We must caution that no data are available addressing the mutagenicity or toxicity of the Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A). This reagent is known to bind nucleic acid and is provided as a solution in DMSO. Treat the Qubit™ dsDNA BR reagent with the same safety precautions as all other potential mutagens and dispose of the dye in accordance with local regulations.

Experimental Protocol

Performing the Qubit™ dsDNA BR Assay

The protocol below assumes you will be preparing standards for calibrating the Qubit™ 2.0 Fluorometer. If you plan to use the last calibration performed on the instrument, you will need fewer tubes (step 1.1) and less working solution (step 1.3). More detailed instructions on the use of the Qubit™ 2.0 Fluorometer (corresponding to steps 1.9–1.15 and 2.1–2.6) can be found in the user manual accompanying the instrument. For sample purity determinations, it is possible to use the Qubit™ 2.0 Fluorometer to calculate the amount of dsDNA and RNA in the same sample. Simply perform each assay for your sample.

- 1.1 Set up the number of 0.5 mL tubes you will need for standards and samples. The Qubit™ dsDNA BR assay requires 2 standards.

Note: Use only thin-wall, clear 0.5 mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit™ assay tubes (500 tubes, Cat. no. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830).

- 1.2 Label the tube lids.

- 1.3 Make the Qubit™ working solution by diluting the Qubit™ dsDNA BR reagent 1:200 in Qubit™ dsDNA BR buffer. Use a clean plastic tube each time you make Qubit™ working solution. Do not mix the working solution in a glass container.

Note: The final volume in each assay tube must be 200 μ L. Each standard tube will require 190 μ L of Qubit™ working solution, and each sample tube will require anywhere from 180 μ L to 199 μ L. Prepare sufficient Qubit™ working solution to accommodate all standards and samples. For example, for 8 samples, prepare enough working solution for the samples and 2 standards: ~200 μ L per tube in 10 tubes yields 2 mL of working solution (10 μ L of Qubit™ reagent plus 1,990 μ L of Qubit™ buffer).

- 1.4 Load 190 μ L of Qubit™ working solution into each of the tubes used for standards.

- 1.5 Add 10 μ L of each Qubit™ standard to the appropriate tube and mix by vortexing 2–3 seconds, being careful not to create bubbles.

Note: Careful pipetting is critical to ensure that exactly 10 μ L of each Qubit™ dsDNA BR standard is added to 190 μ L of Qubit™ working solution. It is also important to label the lid of each standard tube correctly as calibration of the Qubit™ 2.0 Fluorometer requires that the standards be introduced to the instrument in the right order.

- 1.6 Load Qubit™ working solution into individual assay tubes so that the final volume in each tube after adding sample is 200 μ L.

Note: Your sample can be anywhere between 1 μ L and 20 μ L, therefore, load each assay tube with a volume of Qubit™ working solution anywhere between 180 μ L and 199 μ L.

- 1.7 Add each of your samples to assay tubes containing the correct volume of Qubit™ working solution (prepared in step 1.6) and mix by vortexing 2–3 seconds. The final volume in each tube should be 200 μ L.

- 1.8 Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes.
- 1.9 On the Home Screen of the Qubit® 2.0 Fluorometer, press **DNA**, and then select **dsDNA Broad Range** as the assay type. The Standards Screen is automatically displayed.

Note: If you have already performed a calibration for the selected assay, Qubit® 2.0 Fluorometer will prompt you to choose between reading new standards and using the previous calibration. See *Calibrating the Qubit® 2.0 Fluorometer* above for calibration guidelines.

- 1.10 On the Standards Screen, press **Yes** to run a new calibration or press **No** to use the last calibration.
- 1.11 If you pressed **No** on the Standards Screen, proceed to step 1.12. If you selected **Yes** to a run new calibration, follow instructions below.

Running a New Calibration

Insert the tube containing Standard #1 in the Qubit® 2.0 Fluorometer, close the lid, and press **Read**. The reading will take approximately 3 seconds.

Remove Standard #1.

Insert the tube containing Standard #2 in the Qubit® 2.0 Fluorometer, close the lid, and press **Read**.

Remove Standard #2.

- 1.12 If you pressed **No** on the Standards Screen, the Sample Screen will be automatically displayed. Insert a sample tube into the Qubit® 2.0 Fluorometer, close the lid, and press **Read**.

- 1.13 Upon the completion of the measurement, the result will be displayed on the screen.

Note: The value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer at this stage corresponds to the concentration after your sample was diluted into the assay tube. You can record this value and perform the calculation yourself to find out the concentration of your original sample (see *Calculating the Concentration of Your Sample*, below) or the Qubit® 2.0 Fluorometer performs this calculation for you (see *Dilution Calculator*, next page).

- 1.14 To read the next sample, remove the sample from the Qubit® 2.0 Fluorometer, insert the next sample, and press **Read Next Sample**.

- 1.15 Repeat sample readings until all samples have been read.

Calculating the Concentration of Your Sample

The Qubit® 2.0 Fluorometer gives values for the Qubit™ dsDNA BR assay in µg/mL. This value corresponds to the concentration after your sample was diluted into the assay tube. To calculate the concentration of your sample, use the following equation:

$$\text{Concentration of your sample} = \text{QF value} \times \left(\frac{200}{x}\right)$$

where:

QF value = the value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer

x = the number of microliters of sample you added to the assay tube

This equation generates a result with the same units as the value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer (i.e., if the Qubit® 2.0 Fluorometer gave a concentration in µg/mL, the result of the equation will be in µg/mL).

Dilution Calculator The "Dilution Calculator" feature of the Qubit® 2.0 Fluorometer calculates the concentration of your original sample based on the volume of sample you have added to the assay tube. To have the Qubit® 2.0 Fluorometer perform this calculation for you, follow the instruction below.

- 2.1 Upon completion of the sample measurement, press **Calculate Stock Conc.** The Dilution Calculator Screen containing the volume roller wheel is displayed.
- 2.2 Using the volume roller wheel, select the volume of your original sample that you have added to the assay tube. When you stop scrolling, the Qubit® 2.0 Fluorometer calculates the original sample concentration based on the measured assay concentration.
- 2.3 To change the units in which the original sample concentration is displayed, press **µg/mL**. A pop-up window showing the current unit selection (as indicated by an adjacent red dash) opens.
- 2.4 Select the unit for your original sample concentration by touching the desired unit in the unit selection pop-up window. To close the unit selection pop-up window, touch anywhere on the screen outside the pop-up.

The Qubit® 2.0 Fluorometer automatically converts the units to your selection once the unit selection pop-up window is closed.

Note: The unit button next to your sample concentration reflects the change in the units (e.g., if you change the unit to pg/µL, the button will display pg/µL).

- 2.5 To save the data from your calculation to the Qubit® 2.0 Fluorometer, press **Save** on the Dilution Calculator screen. The last calculated value of your measurement will be saved as a .CSV file and tagged with a time and date stamp.
- 2.6 To exit the Dilution Calculator screen, press any navigator button on the bottom of the screen or **Read Next Sample**.

Note: When you navigate away from the Dilution Calculator screen, the Qubit® 2.0 Fluorometer saves the last values for the sample volume and the units in the Dilution Calculator screen only. Returning to the Dilution Calculator screen displays these last selected values.

GE Healthcare



illustra
GFX PCR DNA and Gel
Band Purification Kit

For the purification and concentration of DNA from PCR mixtures, restriction enzyme digestions, solutions and agarose gel bands

Product booklet

Codes: 28-9034-70 (100 purifications)
28-9034-71 (250 purifications)



5.1. Preparation of working solutions

See section 3.2 and 3.3 for Materials & Equipment to be supplied by user.

Capture buffer type 3

Capture buffer type 3 contains a pH indicator that changes color at various pH levels to visually indicate whether the Capture buffer plus sample mix is at the optimal pH for DNA to bind to the silica membrane. Refer to section 4.1 for more information.


Wash buffer type 1

Prior to first use, add absolute ethanol to the bottle containing Wash buffer type 1. Add 100 ml of absolute ethanol to the Wash buffer type 1 in kit 28-9034-70 or add 250 ml ethanol to the Wash buffer type 1 in kit 28-9034-71. For the sample pack size, add 10 ml absolute ethanol to the Wash buffer type 1. Mix by inversion. Indicate on the label that this step has been completed. Store upright in an airtight container.

Elution buffers type 4 and 6

Two elution buffers are provided with this kit to enable optimal performance of the purified sample in as wide a range of downstream applications as possible.

Elution buffer type 4  (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) -the sample should be eluted into this buffer for use in a range of downstream applications and for long term storage of the sample.

Elution buffer type 6  (sterile nuclease free water) -the sample should be eluted into this buffer for the best results with sequencing applications, especially when using a salt-sensitive capillary loading analyzer.

5.2. Sample verification

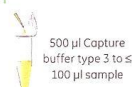
When purifying DNA from either PCR mixtures or restriction enzyme digestions, we recommend running an analytical gel prior to

purification to check for a single band representing the DNA species of interest. If multiple bands are present, we recommend performing a preparative gel and excising the band of interest and following 5.4 Protocol for purification of DNA from TAE and TBE agarose gels.

5.3. Protocol for purification of DNA from solution or an enzymatic reaction

1. Sample Capture

- a. Add 500 μ l **Capture buffer type 3** to up to 100 μ l sample.



Note: If sample volume is greater than 100 μ l, divide the sample and purify using more than one GFX MicroSpin column.

- b. Mix thoroughly.

Note: If sample contains DNA greater than 5 kbp, do not vortex, as this may cause shearing of the DNA.

- c. Check that the **Capture buffer type 3**-sample mix is yellow or pale orange in color.



Note: If the color of the binding mixture is dark pink or red, add a small volume (~ 10 μ l) of 3 M sodium acetate pH 5.0 and mix. Ensure that the binding mixture turns a yellow or pale orange color before loading onto the GFX MicroSpin column. Refer to section 4.1 for more information.



- d. For each purification that is to be performed, place one GFX MicroSpin column into one Collection tube.



2. Sample Binding

a. Centrifuge **Capture buffer type 3-sample mix** briefly to collect the liquid at the bottom of the tube.



b. Load the **Capture buffer type 3-sample mix** onto the assembled GFX MicroSpin column and Collection tube.



 **Note:** the cap of the Collection tube can be used to cap the GFX MicroSpin column. If the cap is not required cut it off.


c. Spin the assembled column and Collection tube at 16 000 × g for 30 seconds.



d. Discard the flow through by emptying the Collection tube. Place the GFX MicroSpin column back inside the Collection tube.




3. Wash & Dry

a. Add 500 µl **Wash buffer type 1**  to the GFX MicroSpin column.



b. Spin the assembled column and Collection tube at 16 000 × g for 30 seconds.





 **Note:** If purity is paramount (e.g., if the sample is to be used in a blunt-ended ligation), repeat Wash & Dry step a and perform step b twice. After the first spin, discard flow through, place the GFX MicroSpin column back inside the Collection tube and centrifuge at 16 000 × g for an additional 30 seconds. This extra wash step may reduce yield by 4%.



c. Discard the Collection tube and transfer the GFX MicroSpin column to a fresh DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube (supplied by user).

4. Elution

a. Add 10–50 μ l Elution buffer type 4  OR type 6  to the center of the membrane in the assembled GFX MicroSpin column and sample Collection tube.



b. Incubate the assembled GFX MicroSpin column and sample Collection tube at room temperature for 1 minute.

1 minute
RT

c. Spin the assembled column and sample Collection tube at 16 000 \times g for 1 minute to recover the purified DNA.



d. Proceed to downstream application. Store the purified DNA at -20°C .

5.4. Protocol for purification of DNA from TAE and TBE agarose gels

1. Sample Capture

- Weigh a DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube and record the weight.
- Using a clean scalpel, long wavelength (365 nm) ultraviolet light and minimal exposure time, cut out an agarose band containing the sample of interest. Place agarose gel band into a DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube (user supplied).
- Weigh the microcentrifuge tube plus agarose band and calculate the weight of the agarose slice.

Second Edition

December 2005

RNAprotect[®] Bacteria Reagent Handbook

RNAprotect Bacteria Reagent
For in vivo stabilization of total RNA
in bacteria

RNeasy[®] Protect Bacteria Mini Kit
RNeasy Protect Bacteria Midi Kit
For in vivo stabilization of total RNA
in bacteria and subsequent RNA
purification



WWW.QIAGEN.COM

Protocol 7: Purification of Total RNA from Bacterial Lysate Using the RNeasy Mini Kit

Important points before starting

- Carry out one of Protocols 1–6 before starting Protocol 7.

Things to do before starting

- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution.

Procedure

1. **Transfer up to 700 µl lysate, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the flow-through.* Reuse the collection tube in step 2.**

If the lysate exceeds 700 µl, centrifuge successive aliquots through the spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.*

Optional: The QIAGEN RNase-Free DNase Set provides convenient on-column DNase digestion during RNA purification. Generally, DNase digestion is not required, since RNeasy silica-membrane technology enables efficient removal of most of the DNA without DNase treatment. However, further DNA removal may be necessary for certain RNA applications that are sensitive to very small amounts of DNA (e.g., RT-PCR analysis with a low-abundant target). If using the RNase-Free DNase Set, follow the relevant protocol steps in Appendix B (page 40) after performing this step.

2. **Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy Mini spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through and collection tube.***

Skip this step if performing the optional on-column DNase digestion (Appendix B, page 40).

* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and must not be mixed with bleach. See page 7 for safety information.

3. Place the RNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy Mini spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through. Reuse the collection tube in step 4.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting", page 32).

4. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy Mini spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane.

This long centrifugation ensures that no ethanol is carried over during elution in step 5 (residual ethanol may interfere with downstream reactions).

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy Mini spin column from the collection tube, so that the spin column does not touch the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

Optional: Place the spin column in a new 2 ml collection tube (not supplied), and discard the old collection tube containing the flow-through. Centrifuge at full speed for 1 min.

5. Place the RNeasy Mini spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to elute the RNA.
6. If the expected RNA yield is $>30 \mu$ g, repeat step 5 using another 30–50 μ l of RNase-free water, or using the eluate from step 5 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 5.

If using the eluate from step 5, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

6.5 Vedlegg 5



3080 Spruce Street
 St. Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-8382 • (314) 771-6700
 Fax (314) 898-7828
 e-mail: techserv@sigma.com
 sigma-abbott.com

Product Information

DEOXYRIBONUCLEASE I Amplification Grade

Product Code AMP-D1

TECHNICAL BULLETIN

Synonym: DNase I

Product Description

Deoxyribonuclease I (DNase I) is an endonuclease isolated from bovine pancreas that digests double and single stranded DNA into oligo and mononucleotides. Amplification Grade DNase I has been purified to remove RNase activity, and is suitable for eliminating DNA from RNA preparations prior to sensitive applications, such as RT-PCR¹ (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction). No current RNA isolation procedure removes 100% of the DNA. Because PCR can detect even a single molecule of DNA, RNA samples should be digested with DNase I before RT-PCR, and parallel reactions should be run without adding reverse transcriptase to check for amplification of contaminating DNA. These precautions are especially recommended if PCR primers do not span an intron, if pseudogenes that lack the intron may be present in the target cells or tissue,¹ or if the RNA will be used in quantitative RT-PCR.²

Using the Reaction Buffer provided with the Amplification Grade DNase I, the contaminating DNA can be removed from RNA preparations in a 15 minute digestion at room temperature. The DNase I is inactivated by chelating calcium and magnesium ions with EDTA and by heating.³ Heating also denatures RNA secondary structure, so the RNA can be used directly in reverse transcription.

Reagents Provided	Product No.
Sufficient to treat 1000 µg of RNA	
Amplification Grade DNase I, 1 ml of 1 unit/µl in 50% glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl ₂ , 10 mM MgCl ₂	D 5307
10x Reaction Buffer, 1 ml of 200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM MgCl ₂	R 6273
Stop Solution, 1 ml of 50 mM EDTA	S 4809

Reagents Required but Not Provided

Water, Molecular Biology Reagent, (Product No. W 4502)

Unit Definition

One unit of Amplification Grade DNase I completely digests 1 µg of plasmid DNA to oligonucleotides in 10 minutes at 37 °C. Activity is assayed in a 50 µl reaction containing 33 mM Tris-acetate, pH 7.8, 86 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 0.5 mM dithiothreitol, 1.0 µg DNA, and 0.15 to 2.5 units of DNase I. This unit is equal to approximately 0.75 Kunitz units.

Quality Control

Ten-fold serial dilutions of total RNA are treated with Amplification Grade DNase I according to the procedure below. The DNase-treated RNA and untreated controls are assayed by RT-PCR. No loss in RT-PCR sensitivity is detected with DNase treatment, indicating that the kit components do not interfere with RT-PCR and that they are free from significant RNase activity. No PCR product is detected with 1 µg RNA when reverse transcriptase is omitted from RT reactions, indicating that amplifiable DNA is eliminated.

Storage

The product ships on wet ice and storage at –20 °C in a non-frost free freezer is recommended.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only. Not for drug, household or other uses. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

Procedure

Note that DNase I is sensitive to physical denaturing. Therefore, **do not vortex the Amplification Grade DNase** or the DNase/buffer/RNA mixture before digestion is completed (step 3). Mix by gently flicking the tube or pipetting, and spin briefly to collect the liquid.

Preparation of RNA for RT-PCR

1. Add to an RNase-free PCR tube:
 - RNA in 8 µl water
 - 1 µl of 10x Reaction Buffer
 - 1 µl of Amplification Grade DNase I, 1 unit/µl

Prepare duplicate tubes for reactions with and without reverse transcriptase. Alternatively, double all volumes and split the digested and denatured product of step 5 into equal portions before adding RT-PCR reagents in step 6.

2. Mix gently, and incubate for 15 minutes at room temperature.
3. Add 1 µl of Stop Solution to bind calcium and magnesium ions and to inactivate the DNase I.

Note: The Stop Solution (50 mM EDTA) **must** be added before heating to prevent metal (Mg/Ca) ion catalyzed hydrolysis of the RNA.

4. Heat at 70 °C for 10 minutes to denature both the DNase I and the RNA.
5. Chill on ice.
6. Add reagents for reverse transcription (RT buffer, primer, dNTPs, RNase inhibitor and reverse transcriptase) or RT-PCR directly to the DNase-treated RNA. Proceed with reverse transcriptase reaction or RT-PCR.

Note: If AMP-D1 is being used with GenElute Mammalian Total RNA kit (Product Code RTN-10, RTN-20, or RTN-350), the entire volume of purified RNA in elution solution may be treated by scaling up the above procedure. For example, RNA in 50 µl of elution solution can be treated by adding 5 µl of 10x Reaction Buffer and 5 µl of Amplification Grade DNase I, and incubating at room temperature for 15 minutes. Inactivate the DNase by adding 5 µl of the Stop Solution and heating at 70 °C for 10 minutes.

References

1. Mutimer, H., et al., Pitfalls of processed pseudogenes in RT-PCR. *BioTechniques*, **24**, 585-588, (1998).
2. Huang, Z., et al., Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *BioTechniques*, **20**, 1012-1020, (1996).
3. Sanyal, A., et al., An effective method of completely removing contaminating genomic DNA from an RNA sample to be used for PCR. *Mol. Biotechnol.*, **8**, 135-137, (1997).

Related Products	Product No.
GenElute™ Mammalian Total RNA Kits	RTN10, RTN70, or RTN350
GenElute™ Total RNA Kits for Yeast	YTR1-1kit, YTR7-1kit
GenElute™ Total RNA Kits for Bacteria	BTR1-1kit, BTR7-1kit
GenElute™ Direct mRNA Miniprep Kits	DMN10 and DMN70
GenElute™ mRNA Miniprep Kits	MRN10 and MRN70
Tri Reagent	T 9424
Water	W 4502
Enhanced Avian RT-PCR Kits	RT-PCR-20 and RT-PCR-100
qRT-PCR Kits	QR-0100 and QR-0500
Enhanced Avian Reverse Transcriptase	A 4464
Deoxynucleotide (dNTP) Mix	D 7295
Taq DNA Polymerase	D 1806 and D 4545
JumpStart™ Readymix™ REDTaq™	P 0982

†The PCR process is covered by patents owned by Hoffman-LaRoche, Inc. GenElute, JumpStart, Readymix, REDTaq are trademarks of Sigma-Aldrich Biotechnology LLC

CAKJWM 01/05

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.