

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## **Førord**

Denne oppgaven ble gjennomført ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB) ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM), avdeling mikrobiologi. Hovedveileder for oppgaven var professor Åsa Frostegård og medveileder var PhD student Daniel Mania.

Jeg vil først og fremst takke veilederne mine for en fremragende opplæring og oppfølging under hele prosessen. Dere har gitt meg motivasjon og innspill i både laboratoriearbeid og under skriveprosessen. Jeg er imponert over deres engasjement og at dere alltid stiller opp for spørsmål og diskusjoner. Jeg vil også rette en takk til avdelingsingeniørene Else Marie Aasen og Rannei Tjåland som alltid har vært behjelpelige med utstyr og instruksjoner.

Til slutt vil jeg takke samtlige av studenter og ansatte på mikrobiologigruppa og nitrogengruppa for å ha inkludert meg og gitt meg en fin opplevelse som masterstudent på UMB.

Ås, mai 2012

---

Guro Heen

## Sammendrag

Denitrifikasjon er en respiratorisk prosess som utføres av mange prokaryoter under anoksiske forhold. Under denitrifikasjonsprosessen reduseres nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) og videre til gassene nitrogenmonooksid (NO), lystgass ( $\text{N}_2\text{O}$ ) og molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ). For å utføre en fullstendig denitrifikasjon kreves de fire reduksjonsenzymene: nitrat reduktase (Nar/Nap), nitritt reduktase (Nir), nitrogenmonooksid reduktase (Nor) og dinitrogenokside reduktase (Nos). Til dags dato er denitrifikasjon kun studert på noen få modellorganismer, og det er ingen god kjennskap mellom fylogeni og funksjon. Hovedforskjellen mellom de denitrifiserende bakterier viser seg å være hvor mye gass som blir emittert av NO,  $\text{N}_2\text{O}$  og  $\text{N}_2$ . Denitrifikasjons prosessen kan bli trunkert dersom en organisme mangler et eller flere denitrifikasjonsgener, men den kan også påvirkes av faktorer som lav pH. En trunkert denitrifikasjon resulterer i utslipp av NO eller  $\text{N}_2\text{O}$ .  $\text{N}_2\text{O}$  er en klimagass som bryter ned ozonlaget og er 310 ganger større globalt oppvarmingspotensial enn  $\text{CO}_2$ .

Denne oppgaven karakteriserer regulatoriske fenotyper av denitrifiserende organismer (DRP) for ulike stammer av *Bradyrhizobium* ved å studere gasskinetikk, samt ekspresjon av *nirK* og *nosZ* i overgangen fra oksiske til anoksiske forhold. DRP er en fellesbetegnelse for en rekke fenotypiske og regulatoriske karakteristikk som blir bestemt gjennom standardiserte eksperimenter. Det ble utført en sluttpunktanalyse for å få en generell oversikt over de 39 *Bradyrhizobium* stammenes siste reduksjonssteg i denitrifikasjonen. Ut i fra disse resultatene ble det valgt ut tre stammer (79b1, 87j1 og 104a) som hadde  $\text{N}_2$  som sluttprodukt, og som viste en viss fylogenetisk avstand mellom hverandre. Denitrifikasjonsmønsteret til de tre stammene ble registrert i et semiautomatisk inkuberingsystem hvor gassene  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , NO,  $\text{N}_2\text{O}$  og  $\text{N}_2$  ble målt. Transkripsjonen av *nirK* og *nosZ* ble kvantifisert for 79b1 og 104a gjennom Real Time PCR. Transkripsjonen ble linket til gasskinetikken og sammenliknet mellom de to stammene. Transkripsjonsanalysene viste at ekspresjon for *nirK* og *nosZ* økte når oksygenkonsentrasjonen ble lav. For samtlige av stammene var ekspresjonen for *nosZ* generelt lavere enn *nirK*. Under transkripsjonsanalysene hadde kulturene et høyere celletall en hva som var blitt benyttet i tidligere forsøk. Dette resulterte i en raskere overgang fra et oksisk til et anoksiske miljø. Under en slik rast transisjon viste stamme 104a en høy akkumulering NO, mens stamme 79b1 viste en stringent kontroll over NO produksjon. Stamme 104a viste også en liten produksjon av  $\text{N}_2$  under samtlige av gasskinetikk-forsøkene, noe som kan bety at den reduserer mesteparten av nitraten til ammonium gjennom DNRA.

Denne oppgaven viser fenotypisk data fra ulike *Bradyrhizobium* stammer. Dette vil være med på å støtte vår forståelse for denitrifikasjon og gi grunnlag for formulering og kalibrering av en biokjemisk modell med hensikt for å kunne forutsi responsen i et denitrifiserende mikrobielt samfunn. Med en slik modell kunne vi motvirke utslipp av drivhusgass fra jordbruksområder.

## Abstract

Denitrification is a respiratory process that is carried out by many prokaryotes under anoxic conditions. During the process of denitrification, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is reduced to nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and further on to the gases nitric oxide (NO), nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) and molecular nitrogen ( $\text{N}_2$ ). Four reductases are necessary to carry out complete denitrification: nitrate reductase (Nar or Nap), nitrite reductase (Nir), nitric oxide reductase (Nor) and nitrous oxide reductase (Nos). To date, denitrification is only studied in a few model organisms, and the relationship between phylogeny and phenotype is not well understood. The main difference between denitrifiers is the amount of gas that is emitted in form of NO,  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$ . Denitrification can be truncated if organisms lack one or more of the denitrification genes, but the process can also be affected by environmental factors like low pH. A truncated denitrification results in the emission of NO or  $\text{N}_2\text{O}$ . The latter is a greenhouse gas that destroys the ozone layer and has a global warming potential 310 times that of  $\text{CO}_2$ .

This paper characterizes the denitrification regulatory phenotype (DRP) of different strains of *Bradyrhizobium* by studying gas kinetics, and the expression of *nirK* and *nosZ* during the transition from oxic to anoxic conditions. DRP is a collection of traits for a variety of phenotypic and regulatory characteristics that are determined through standardized experiments. An end-point analysis was performed to obtain a general overview of the last reduction step in denitrification for 39 strains of *Bradyrhizobium*. Based on the results, three strains (79b1, 87j1 and 104a) were selected that had  $\text{N}_2$  as end product, and showed a certain phylogenetic distance to each other. The denitrification patterns of these three strains were determined in a semi-automatic incubation system where the gases  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , NO,  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  were measured. The transcription of *nirK* and *nosZ* was quantified for strains 79b1 and 104a by Real Time PCR. The transcription was linked to gas kinetics and compared between the two strains. Expression of *nirK* and *nosZ* increased after oxygen depletion. For both strains, expression of *nosZ* was generally lower than that of *nirK*. Cultures were grown to higher cell numbers for transcription analysis than for previous experiments, which resulted in a quicker transition from oxic to anoxic conditions. This caused high NO production and accumulation in strain 104a, while strain 79b1 had stringent control over NO production. Strain 104a also showed a low production of  $\text{N}_2$  in all gas-kinetic experiments, which indicates that the fate of nitrate was another than denitrification, for example reduction to ammonium in DNRA.

This thesis provides phenotypic data from different strains of *Bradyrhizobium* and thereby supports our understanding of denitrification and aids the formulation and calibration of a

biochemical model with the goal to predict the response of a denitrifying microbial community to external factors. Such a model would enable us to counteract greenhouse gas emissions from agricultural sites.



## Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	IV
<b>1. Innledning .....</b>	<b>1</b>
1.1 Nitrogensyklusen.....	2
1.1.1 Nitrogenfiksering.....	3
1.1.2 Ammoniumoksidasjon.....	4
1.1.3 Asimilatorisk nitrat reduksjon .....	5
1.1.4 Ammonifikasjon .....	5
1.2 Disimilatorisk nitratreduksjon .....	5
1.2.1 DNRA.....	5
1.2.2 Denitrifikasjon .....	7
1.2.3 Nitrat reduktase .....	8
1.2.4 Nitritt reduktase .....	9
1.2.5 Nitric oxide reduktase.....	9
1.2.6 Nitrous oxide reduktase .....	10
1.3 Regulering av denitrifikasjon .....	10
1.4 Klima.....	11
1.5 <i>Bradyrhizobium</i> .....	13
1.5.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme .....	13
1.5.2 Denitrifikasjons genene hos <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	14
<b>2. Materieell.....</b>	<b>17</b>
2.1 Bakteriekulturer.....	17
2.2 Laboratorieutstyr og maskiner .....	18
2.3 Programvarer .....	19
2.4 Kit.....	19
2.5 Proteiner og enzymer.....	20
2.6 Primere .....	20
2.7 Dyrkningsmedier, buffere og løsninger .....	20
2.7.1 Dyrkningsmedier .....	20
2.7.2 Buffere og løsninger .....	21
2.8 Kjemikalieliste.....	23



<b>3. Metoder</b> .....	<b>24</b>
3.1 Isolering og rendyrking av <i>Bradyrhizobium</i> stammer .....	24
3.2 Oppbevaring av <i>Bradyrhizobium</i> stammer .....	25
3.3 Dyrkning av <i>Bradyrhizobium</i> .....	25
3.4 Semiautomatisk inkuberingsystem for gasskinetikk-analyser .....	26
3.5 Sluttpunktanalyse .....	29
3.6 Celletall vs OD .....	29
3.7 Generasjonstid .....	31
3.8 Ekstraksjon av genomisk DNA .....	31
3.8.1 Måling av DNA konsentrasjon .....	32
3.9 PCR .....	33
3.10 ERIC-PCR .....	34
3.11 Agarosegel-elektroforese .....	35
3.12 DNA ekstraksjon fra agarosegel .....	36
3.13 Sekvensering .....	37
2.3.5 Sekvenseringsinstrumentet ABI 3100 ved IKBM .....	37
2.3.7 GATC Biotech .....	38
3.14 TOPO kloning .....	39
3.14.1 Ligeringsreaksjon .....	40
3.15 Traskripsjonsanalysene .....	40
3.16 Nitrittmåling .....	41
3.17 Ekstraksjon av mRNA .....	41
3.17.4 Fjerning av genomisk DNA .....	43
3.17.5 Revers transkripsjon .....	44
3.17.6 Real Time PCR .....	44
<b>4. Resultater</b> .....	<b>48</b>
4.1 Sluttpunktanalyse .....	48
4.2 Analyser av gasskinetikk .....	52
4.3 Bestemmelse av celletall vs. OD .....	55
4.4 Primere .....	57
4.5 Plasmid .....	58
4.6 Gasskinetikk og transkripsjonsanalyser .....	59
<b>5. Diskusjon</b> .....	<b>64</b>
5.4 Transkripsjonsanalyse .....	68
5.5 Konklusjon og videre arbeid .....	70
<b>6. Referanseliste</b> .....	<b>72</b>





## 1. INNLEDNING

Slekten *Bradyrhizobium*, tilhører klassen  $\alpha$ -proteobacteria, og inneholder mange ulike arter som fikserer molekylært nitrogen i symbiose med belgvekster. Det finnes en stor diversitet blant nitrogenfikserende bakterier og det oppdages og beskrives stadig nye arter. *Bradyrhizobium* er mest kjent som en mikrosymbiont til den økonomisk viktige planten *Glycine max* soya, men danner også nitrogenfikserende symbiose med flere andre belgvekster som for eksempel *Acacia*, *Albizia gummifera*, *Erythrina brucei*, *Faidherbia albida*, *Millettia ferruginea* og *Sesbania sesban* (Kosslak et al. 1987; Mesa et al. 2001). På bakgrunn av dette er *Bradyrhizobium* mest undersøkt som en nitrogenfikserende bakterie, men i tillegg til dette kan *Bradyrhizobium* også utføre andre nitrogentransformasjoner som respirerende denitrifikasjon og DNRA, og det er der hovedfokuset vil ligge i denne oppgaven.

Til dags dato er denitrifikasjon kun undersøkt for noen få modellorganismer innen  $\alpha$ - og  $\gamma$ -proteobacteria (Zumft 1997). Hovedforskjellene mellom disse modellorganismene viser seg å være hvordan denitrifikasjonen blir regulert, og derved hvor mye mellomprodukter som blir emittert. Et eksempel på en bakterie som utfører en trunkert denitrifikasjon er *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* tilhører  $\alpha$ -proteobacteria og er en denitrifiserende organisme som mangler genet som koder for dinitrogenokside reduktase (Baek et al. 2008). For å få mer kunnskap om hvordan de regulatoriske systemene i denitrifikasjon kontrollerer utslipp av gassene  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  og  $\text{N}_2\text{O}$ ) er det nødvendig med mer data fra flere ulike fenotyper. For å kunne sammenlikne denitrifiserende bakterier må det utføres fenotypiske forsøk samt studier av funksjonelle egenskaper. Fenotypiske særpreg kan beskrives ved å analysere gasskinetikk til ulike organismer i overgang fra oksiske til anoksiske forhold med tilstedeværelse av nitrat eller nitritt i mediet. For å kunne sammenlikne ulike bakterier må de dyrkes under så like forhold som mulig og det må bli en enighet om hvilke parametere som skal måles. Bergaust et al. (2011) foreslo et antall slike parametere for å karakterisere denitrifikasjon regulatoriske fenotyper (DRP). To organismer som er blitt nøyere studert med hensyn på DRP er *Paracoccus denitrificans* (Bergaust et al. 2010) og *Agrobacterium tumefaciens* (Bergaust et al. 2008). Gasskinetikksforsøk viste at *P. denitrificans* har en større stringent kontroll over  $\text{NO}$  produksjon enn hva som ble sett hos *A. tumefaciens*. En forklaring til dette kan være at *A. tumefaciens* er en plantepatogen bakterie. Det er derfor sannsynlig at den blir eksponert for  $\text{NO}$  fra planten, noe som har gjort den mer tolerant for  $\text{NO}$  (Bergaust et al. 2008).

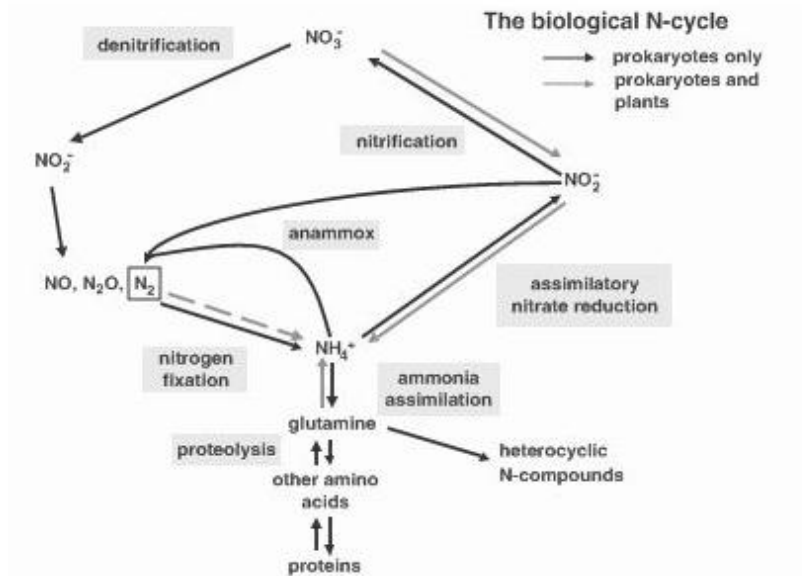
I denne oppgaven ble det sett nærmere på forholdet mellom fylogeni og funksjon av flere stammer innen *Bradyrhizobium*. For noen utvalgte stammer ble det også utført gasskinetikk og transkripsjonsanalyser for genene *nirK* og *nosZ* for å se nærmere på genotypiske og fenotypiske denitrifikasjonsmønstre. En detaljert karakterisering av denitrifikasjonen hos ulike stammer av *Bradyrhizobium* er ønskelig for å kunne få en bedre forståelse av NO og N<sub>2</sub>O utslipp fra komplekse systemer.

## 1.1 Nitrogensyklusen

Av den totale mengden nitrogen som finnes på jorden er omtrent 90 % bundet som gassform i atmosfæren, hvor de i all hovedsak forekommer som nitrogenmonoksid (NO), lystgass (N<sub>2</sub>O) og molekylært nitrogen (N<sub>2</sub>). Av disse utgjør N<sub>2</sub> rundt 78 % av atmosfærens innhold, en gass som for fleste organismer er biologisk utilgjengelig. For at det inaktive nitrogenet (N<sub>2</sub>) skal bli biologisk tilgjengelig for de fleste organismer må det konverteres til oksidert nitrogen (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> og NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) i biosfæren eller til nitrogenoksidene (NO<sub>x</sub>; NO, NO<sub>2</sub> og N<sub>2</sub>O) i atmosfæren. Nitrogen kan også benyttes i redusert form som ammoniakk (NH<sub>3</sub>) og ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Nitrogen er et grunnstoff som forekommer naturlig både i organisk og uorganisk form. I levende celler er organisk nitrogen en essensiell byggestein for aminosyrer, proteiner, enzymer, klorofyll og nukleinsyrer (Canfield et al. 2010). Gjennom nitrogensyklusens kontinuerlige oksidasjons- og reduksjonstrinn er uorganisk nitrogen i stadig endring med hensyn på oksidasjonstall fra +5 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) til -3 (NH<sub>3</sub>). De vanligste formene for uorganisk nitrogen er N<sub>2</sub>O, NO, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> og NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

De aller fleste prosessene i nitrogensyklusen medieres av mikroorganismer og inneholder flere katalyserte prosesser som: nitrogenfiksering, ammoniumoksidasjon, assimilatorisk nitrat reduksjon, dissimilatorisk transformasjon, ammonifikasjon og ammonium assimilering (van Spanning et al. 2007).



Figur 1.1 En forenklet figur av nitrogensyklusen (Bothe et al. 2007).

### 1.1.1 Nitrogenfiksering

Under nitrogenfiksering omdannes molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ) fra atmosfæren til ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) i biosfæren (Canfield et al. 2010). Fiksert nitrogen er et begrenset næringsstoff for planter og andre organismer, og de er derfor avhengig av denne biologiske prosessen for å få tilgang på nitrogenet (Franché et al. 2008). Den biologiske prosessen som konverterer molekylært nitrogen til ammoniakk utføres i all hovedsak av prokaryoter som: rhizobier, *Frankia* og cyanobakterier, men det er også funnet hos noen metanogene Archaea. Nitrogenfikserende bakterier står for hele 65 % av all nitrogen tilgjengelig i biosfæren (Lodwig et al. 2003). Nitrogenfiksering kan utføres av frittlevende bakterier i jord, eller bakterier som lever i symbiose med belgplanter dersom nitrogen er en begrenset ressurs i biosfæren (Newton 2007). Det er oftest bakterier innenfor rhizobia som innleder et symbioseforhold med belgplantene. Rhizobia er et felles navn for  $\alpha$ -proteobacteria og omfatter: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* (tidligere kjent som *Sinorhizobium*) og *Methylobacterium*. Men det er også registrert at belgvekster kan innlede symbioseforhold med noen  $\beta$ -proteobacteria som *Burkholderia* og *Cupriavidus* (Dresler-Nurmi et al. 2009).

For at et symbioseforhold skal innledes starter den kompatible planten med å skille ut flavonoid fra røttene ut i rhizosfæren. Dette signalet fanges opp av rhizobienes spesifikke reseptor NodD, som trigger transkripsjonen av bakteriens noduleringsgener. Dette innebærer

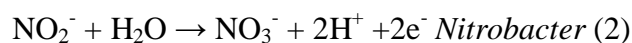
produksjon av signalmolekylet, lipo-chitooligosakkarid også kalt nod-faktoren, som sendes ut til den kompatible planten (Franche et al. 2008). Nod faktoren registreres av spesifikke reseptorer i planterøttene som trigger rothårene til å krølle seg rundt bakterien slik at det dannes en symbiosome membran rundt bakterien. Inne i rothårene vil det dannes spesielle infeksjonsrør slik at bakterien kan komme inn til selve roten der det vil dannes rotknoller. Inne i rotknollene vil bakteriene svulle opp og omgis av en bakteroidmembran. Etter denne morfologiske forandringen, som man mener er irreversibelt, kalles bakterien for en bakterioide (Franche et al. 2008). Under nitrogenfiksering skilles det ut ammonium til plantens rotceller. Videre bruker planten dette til å syntetisere aminosyrer og amider. I gjengjeld transporterer planten sukrose til nodulen hvor dikarbonsyre gir bakteroiden karbon og energi gjennom symbiosom membranen (Stougaard 2000).

Nitrogengass ( $N_2$ ) er svært stabilt og den sterke trippelbindingen ( $N\equiv N$ ) som holder molekylet sammen har en bindingsenergi på 940 kJ. Det kreves en stor mengde aktiveringsenergi for å bryte disse båndene. I alt brukes det 16 energiekvivalenter i form av ATP for å fikse et  $N_2$  molekyl (Canfield et al. 2010). Nitrogenfiksering katalyseres av det oksygensensitive enzymet nitrogenase. Det er et kompleks enzym som deles inn i to separate proteiner: dinitrogenase og dinitrogenase reduktase. Enzymet inneholder jernprotein og jernmolybdenprotein som vil oksideres og slutte å fungere dersom de kommer i kontakt med oksygen. Nitrogenfiksering forekommer under mikroaerobe og anaerobe forhold. Under mikroaerobe forhold må bakterien beskytte nitrogenase enzymet mot eksponering av oksygen. De frittlevende cellene kan produsere et slimlag rundt cellen eller holde respirasjonen på et nivå slik at oksygenkonsentrasjonen holdes nede. Under dannelse av noder, som beskrevet ovenfor, får bakteroiden tilført oksygen fra planten under kontrollerte forhold av det oksygenbindende planteproteinet leghemoglobin (Stacey 2007).

### 1.1.2 Ammoniumoksidasjon

Som vist i figur 1.1 dannes ammonium fra nitrogenfiksering og fra nedbryting av organisk materialet gjennom ammonifikasjon. Ammoniumoksidasjon eller nitrifikasjon er en oksidativ prosess som konverterer ammoniakk ( $NH_3$ ), ammonium ( $NH_4^+$ ) og enkle nitrogenforbindelser til nitritt ( $NO_2^-$ ) eller videre til nitrat ( $NO_3^-$ ) i biosfæren. Denne prosessen er energigivende og utføres av forskjellige autotrofe  $\beta$ -proteobakterier (*Nitrosomonas* og *Nitrosospira*),  $\gamma$ -proteobakterier (*Nitrococcus*), planctomycetes og *Thaumarchaeota*, er et fylum innen Archaea (Huang 2010).

Eksempel på bakterier som utfører ammoniumoksidasjon er *Nitrosomonas* og *Nitrococcus* (1) som reduserer ammoniakk til nitritt, før *Nitrobacter* (2) tar steget videre og reduserer nitritt til nitrat.



Ammoniumoksidasjon kan også forekomme under anoksiske forhold og kalles da for anammox. Under anammox oksideres ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) til molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ) hvor nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) brukes som en elektronakseptor.

### 1.1.3 Assimilatorisk nitrat reduksjon

Planter har et stort behov for nitrogen for å kunne vokse. På grunn av at det som oftest er et lavt nitrogeninnhold i jorden har planten et sensitivt opptakssystem slik at plantene kan benytte seg av de nitrogenkildene som er tilgjengelig. De mest brukte er  $\text{NH}_4^+$  og  $\text{NO}_3^-$ . Assimilatorisk nitrat reduksjon er det eneste trinnet som kan utføres av en høyere livsform som fotosyntetiserende planter. Nitrat som tas opp i røttene blir enten redusert til nitritt i cytosolen av assimilatorisk nitrat reductase eller lagret i vakuoler. Nitritten transporteres deretter til plastider hvor det reduseres til ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) av assimilatorisk nitritt reductase. Ammonium benyttes videre til syntese av glutamin eller glutamat, som fungerer som nitrogenkilde for syntese av andre aminosyrer (Tischner & Kaiser 2007).

### 1.1.4 Ammonifikasjon

Ammonifikasjon er nedbrytning av nitrogenholdige komponenter hvor aminosyrer og nukleotider reduseres til ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Maier et al. 2009).

## 1.2 Disimilatorisk nitratreduksjon

Disimilatorisk nitratreduksjon er en fellesbenevnelse for to ulike reaksjoner hvor begge starter med reduksjon av nitrat. Disse to reaksjonene er: dissimilatorisk nitrat reduksjon til ammonium (DNRA) og denitrifikasjon.

### 1.2.1 DNRA

DNRA utføres av fakulative- og obligat fermentative bakterier (Silver et al. 2001). Selv om de fleste undersøkte stammene innen *Bradyrhizobium* er kjent for sin evne til å fikse nitrogen,



kan de også utføre DNRA. I motsetning til denitrifikasjon (som beskrevet nedenfor 1.2.2), hvor nitrat blir redusert i flere steg til nitrogengass ( $N_2$ ), omdanner DNRA nitrat til ammonium ( $NH_4^+$ ) slik at nitrogenet forblir tilgjengelig i biosfæren (An & Gardner 2002). De to trinnene i DNRA katalyseres av to ulike enzymer, hvor den første reaksjonen innebærer reduksjon av nitrat til nitritt ved lav eller ingen  $O_2$  tilstedet. Neste steg innebærer reduksjon av nitritt til ammonium. Forskning har vist at DNRA er mindre sensitiv mot oksygen og variable redoks-forhold enn hva man ser i denitrifikasjon. I DNRA spiller forholdet mellom karbon og nitrogen en viktigere rolle. Under forhold med lav nitrogentilgang og sterke reduserende forhold, med mangel på elektronakseptorer, vil DNRA foretrekkes ettersom flere elektroner kan overføres per mol nitrat. Sammenlikner man den potensielle energien mellom denitrifikasjon ( $-2669kJ mol^{-1}$  glukose) og DNRA ( $-1796kJ mol^{-1}$  glukose) får man mer utbytte av å redusere all nitrogen tilgjengelig til  $N_2$  gjennom denitrifikasjon. I et forsøk viste det seg at bakterier som utfører DNRA kan syntetisere opptil dobbelt så mye cellemasse per mol nitrat i motsetning til denitrifiserende bakterier (Strohm et al. 2007).

Selv om DNRA i all hovedsak konserverer nitrat til ammonium har noen bakterier vist produksjon av lystgass ( $N_2O$ ) under DNRA. Et forsøk med isotopmerket  $^{13}NO_3^-$  og  $^{13}NO_2^-$  viste at mesteparten av nitraten ble omdannet til  $NH_4^+$ , men at samtlige av organismene i forsøket også produserte noe merket  $N_2O$  som ikke ble videre redusert (Bleakley & Tiedje 1982). Forsøket bekreftet at DNRA bakterier kan produsere ammonium og lystgass samtidig, men opptil 90 % av tilgjengelig nitrat går til ammoniumproduksjon. Dette varierte noe ved ulike dyrkningsforhold og det er vist at økt glukosekonsentrasjon i mediet reduserer produksjonen av lystgass og øker produksjonen av ammonium. For noen av bakteriene som utfører DNRA foregikk lystgassproduksjon etter at den stasjonære fasen var nådd (Bleakley & Tiedje 1982). Produksjon av  $N_2O$  mener man kan skyldes at DNRA bakterier prøver å forhindre en akkumulering av nitritt som reduseres i det første steget. En akkumulering av nitritt vil kunne skade bakterien på grunn av dens toksiske effekt ved konsentrerte mengder.

Ammonium er en nitrogenkilde som er tilgjengelig for et stort antall mikroorganismer og planter. I en fremtidig klimautvikling kan det bli en større mangel på tilgjengelig nitrogen i økosystemene på grunn av økt  $CO_2$  konsentrasjon i atmosfæren som igjen kan gi en økt forespørsel av nitrogen for plantene (Rütting et al. 2011).

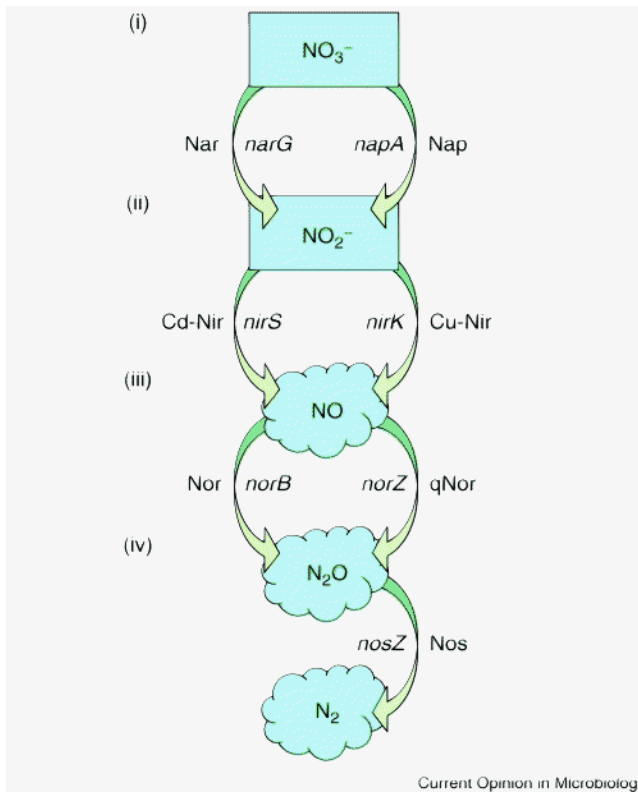
### 1.2.2 Denitrifikasjon

Denitrifikasjon er en form for anaerob respirasjon hvor nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) reduseres til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) og videre til gassene nitrogenmonooksid (NO), lystgass ( $\text{N}_2\text{O}$ ) og molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ). Denitrifikasjon utføres oftest av hetrotrofe prokaryoter innen  $\alpha$ - og  $\beta$  – proteobacteria, men det er også oppdaget denitrifikasjonsegenskaper hos spesifikke Archaea og sopp (Chen et al. 2003; Zumft 1997).

Ved å bruke nitrat eller nitritt som en terminal elektronakseptor genereres det en elektrokjemisk gradient over den cytoplasmiske membranen som kan brukes til å konservere energi i form av ATP, på samme måte som oksygen blir brukt som elektronakseptor under oksiske forhold. Reaksjonen blir katalysert av fire ulike komplekse-multisete metalloenzymer (Figur 1.2). For de tre første enzymene i denitrifikasjonsprosessen er det blitt karakterisert to ulike utgaver (Zumft 1997). Enzymene NAR eller NAP reduserer nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ), mens NIR reduserer nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) til nitrogenmonooksid (NO). Nitrogenmonooksid (NO) reduseres videre til lystgass ( $\text{N}_2\text{O}$ ) av NOR, hvor N2OR står for det siste reduksjonssteget og reduserer lystgass ( $\text{N}_2\text{O}$ ) til sluttproduktet nitrogengass ( $\text{N}_2$ ) (Philippot & Hallin 2005).

Denitrifikasjonsenzymene uttrykkes med nitrat tilstedet og ved liten eller ingen tilstedeværelse av oksygen. På denne måten kan bakterien fortsette å få energi gjennom respirasjon selv om tilgjengeligheten på oksygen er begrenset eller fullstendig borte. Øker konsentrasjonen av oksygen vil dette hemme aktiviteten til de denitrifiserende enzymene og bakterien vil igjen benytte seg av aerob respirasjon, med  $\text{O}_2$  som terminal elektronakseptor (Zumft 1997). Dette er ettersom  $\text{O}_2$  gir mest energi i form av ATP ( $\Delta G^\circ = -238 \text{ kJ}$ ) sammenliknet med denitrifikasjon ( $\Delta G^\circ = -224 \text{ kJ}$ ).

Hele prosessen fra nitrat til nitrogengass kalles for den fullstendige denitrifikasjonen, men ikke alle denitrifiserende bakterier har nødvendigvis alle genene. Noen denitrifikasjonsbakterier vil kun klare å redusere etter eller flere av de fire reduksjonsstegene som utgjør en fullstendig denitrifikasjon. Et eksempel på dette er *Rhizobium sullae* som kun inneholder et reduksjonssteg og kan bare redusere nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) til nitrogenoksid (NO) (Casella et al. 2006).



**Figur 1.2:** Beskrivelse av denitrifikasjonen og genene (vises i kursiv) som koder for de ulike reduktasene. Reduksjonen fra nitrat til nitritt katalyseres av membranbundet- (NAR) eller periplasmisk (NAP) nitrat reduktase. Nitritt reduseres videre til NO og katalyseres av cytochrom cd1- (Cd-NIR) eller kopper (Cu-NIR) nitritt reduktase. NO reduseres til  $\text{N}_2\text{O}$  av (NOR) eller (qNOR) nitric oxide reduktase. Reduksjonen av  $\text{N}_2\text{O}$  til  $\text{N}_2$  katalyseres av nitrous oxide reduktase (NOS). (Philippot & Hallin 2005).

### 1.2.3 Nitrat reduktase

Det første steget i denitrifikasjonsprosessen starter med en reduksjon av nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ). Denne to-elektron reduksjonen katalyseres av enzymet nitrat reduktase, og finnes i tre distinkte klasser: respiratorisk nitrat reduktase (NAR), og periplasmisk nitrat reduktase (NAP) og assimilatorisk nitrat reduktase (NAS). Samtlige av disse enzymene inneholder kofaktoren Mo-bis-molybdopterin guanine dinukleotid (Mo-bis-MGD) på det aktive sete og inneholder minimum en 4Fe-4S kluster (Richardson et al. 2001).

Respiratorisk nitrat reduktase (NAR) kodes av operonet NarGHI som er bygget opp av de tre subenhetene: NarG, NarH og NarI. NarG,  $\alpha$ -subenheten, består av det katalytiske sete hvor selve reduksjonen finner sted. NarH,  $\beta$ -subenheten, inneholder fire Fe-S enheter: en med 3Fe-4S og tre enheter med 4Fe-4S. Både NarG og NarH er lokalisert i cytoplasma hvor NarH er bundet til NarI. NarI er  $\gamma$ -subenheten, som er et intergrert membranprotein som består av fem transmembrane helikser, hvor den N-terminale enden vender mot periplasmaen. NarI inneholder to heme b, en lav potensial (heme  $b_l$ ) og en med høyt potensiale (heme  $b_h$ ). Under

nitratreduksjon oksideres quinol i periplasmaen slik at  $H^+$  frigis og to elektroner går fra heme  $b_l$  til heme  $b_h$ . Det dannes en elektrongradient over membranen slik at elektronene fra heme  $b_h$  i NarI doneres til 3Fe-4S i NarH og videre til NarG og det katalytiske sete hvor nitrat ( $NO_3^-$ ) reduseres til nitritt ( $NO_2^-$ ). Periplasmatiske nitrat reductase (NAP) er bygget opp av to subenheter lokalisert i periplasma. Den katalytiske subenheten (NapA) binder bis-MGD kofaktoren og en 4Fe4S kluster, samt en elektron overførende subenhet (NapB) som binder to c-type heme. Som NAR, er NAP også forbundet til quinol oksidasjon i elektrontransportkjeden hvor den er koblet sammen via en membranankret tetraheme cytocrom. Reduksjon av nitrat gjennom NAP kan kun bli koblet til fri energi transduksjon dersom quinone reductase genererer en  $H^+$  elektrokjemisk gradient (Richardson et al. 2007).

Assimilatorisk nitrat reductase (NAS) er lokalisert i cytoplasmaen, reduserer også nitrat, men deltar i nitrogenassimilering, og er ikke en del av noen respiratorisk nitrat reductase system. Selv om dette enzymet ikke er fullstendig forstått er det kjent vi at enzymet ikke er delaktig i denitrifikasjonen.

#### 1.2.4 Nitritt reductase

Dissimilatorisk nitritt reductase (NIR) tar del i trinn to i denitrifikasjonen og reduserer nitritt ( $NO_2^-$ ) til gassen nitrogenmonoksid (NO).

NIR kan inndeles i to ulike klasser, Cu inneholdende respiratorisk nitritt reductase CuNIR med en kofaktor som inneholder kobber, og  $cd_1$  nitritt reductase  $cd_1$ NIR som inneholder heme. Genene som koder for disse apoproteinene er *nirK* (CuNIR) og *nirS* ( $cd_1$ NIR). CuNIR finnes i både gram negative og gram positive bakterier hvor primærstrukturen er relativt godt konserverert. Den er bygget opp av en homotrimer hvor hver av de tre identiske subenhetene består av to distinkte domener.  $cd_1$ NIR er en homodimer og hver av subenhetene inneholder en heme c og en unik heme  $d_1$ .  $cd_1$  enzymet er et periplasmatiske løselig protein. Nitritt reduksjonen bør ha en streng regulering ettersom store mengder NO er toksisk (Zumft 1997).

#### 1.2.5 Nitric oxide reductase

NOR er et kompleks intergrert metalloenzym og medlem av heme-kobber oksidase superfamilien. NOR finnes som to utgaver: bc-heme inneholdende nitric oxide oxidoreductase cNOR og b-heme inneholdende nitric oxide oxidoreductase qNOR.

cNOR består av to subenheter, den heme c inneholdende subenhet NorC som består av en enkel transmembran  $\alpha$ -heliks og en store heme b inneholdende subenhet NorB. Denne subenheten er svært hydrofob med 12 transmembrane  $\alpha$ -helikser. qNOR består av en enkel enhet og er inaktiv ved tilstedeværelse av cytochrome c som elektron donor, men kan benytte seg av  $\text{QH}_2$  eller  $\text{MQH}_2$  (Hendriks et al. 2000).

### 1.2.6 Nitrous oxide reduktase

I det siste trinnet av denitrifikasjonen blir  $\text{N}_2\text{O}$  redusert til  $\text{N}_2$ . Reaksjonen katalyseres av et reduksjonsenzym, dinitrogenoksid reduktase N2OR, som kodes av genet *nosZ*. N2OR er det eneste reduktaseenzymet som kan redusere lystgass til molekylært nitrogen og utgjør en utrolig viktig prosess i nitrogensyklusen. N2OR er et multikopperprotein som består av en homodimer hvor hver monomer består av to domener. Hvert domene består av en C-terminal domene som bærer Cu(A) sete, samt en N-terminal domene hvor Cu(Z) sitter. Cu(A) er et elektronoverføringscenter som overfører elektroner fra Cu(A) til Cu(Z) (Haltia et al. 2003). Genet eksisterer kun hos prokaryote og er svært viktig for å forhindre et økt utslipp av lystgass ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Zumft 2005).

### 1.3 Regulering av denitrifikasjon

Denitrifikasjonsprosessen påvirkes av miljøfaktorer som: vanninnhold, temperatur og tilgjengelig karbonkilde. I tillegg til dette er denitrifikasjonsbakterier avhengig av tilgang på N-oksider for å kunne initiere denitrifikasjonen når oksygenkonsentrasjonen er redusert (Wallenstein et al. 2006). Under selve denitrifikasjonen er det to nøkkelfaktorer som anses som avgjørende for at prosessen skal kunne fullføre reduksjonen til sluttproduktet  $\text{N}_2$ . Disse to faktorene er at oksygen forblir fraværende under hele denitrifikasjonsprosessen og at pH'en ikke reduseres. Dersom disse forhold ikke opprettholdes kan det føre til at gassene NO og  $\text{N}_2\text{O}$  ikke reduseres videre til  $\text{N}_2$ , men slippes ut i atmosfæren. N2OR er sensitiv mot oksygen og en undertrykkelse av denne reduktase vil føre til en akkumulering av  $\text{N}_2\text{O}$  som diffunderer ut i atmosfæren. Dette er svært uønsket ettersom  $\text{N}_2\text{O}$  er en potensiell drivhusgass som vil skadeliggjøre ozonlaget.

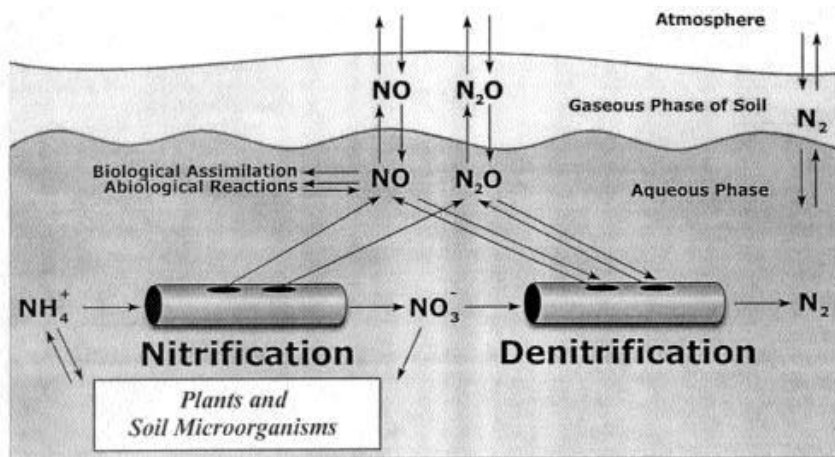
En annen faktor som øker utslippet av NO og  $\text{N}_2\text{O}$  er jord med lav pH. Dette fenomenet er uavhengig av bakteriens pH optimum slik at lav pH legger en universell begrensning på reduksjonen av  $\text{N}_2\text{O}$  til  $\text{N}_2$ . Forklaringen på pH effekten er at  $\text{N}_2\text{O}$ -reduktase enzymet, som er lokalisert i periplasmaet hos gram negative bakterier, er følsom for lav pH. En analyse av

gasskinetikken og genuttrykkelse fra *Paracoccus denitrificans* i ulike pH (Bergaust et al. 2010) viste at det i større grad var fullstendig denitrifikasjon hos pH 7 – 7.5, men en trunkert denitrifikasjon hos kulturene som ble dyrket i pH 6. Resultatene for kvantifisering av transkribert gen for reduksjonsenzymene samstemte derimot ikke med observasjonen fra gassmålingene. Transkripsjonen av *nosZ* viste riktignok stor nedgang ved lav pH og det samme ble vist for *nirS*. Ratioen mellom *nosZ* og *nirS* ved pH 6 var lik med hva som ble vist ved pH 7, noe som forklarte den lave gassproduksjonen, men ikke N<sub>2</sub>O utslippet. Dette forsøket viste at organismen ikke hadde mulighet til å syntetisere et funksjonelt N<sub>2</sub>O reduktase enzym under en lav pH. På bakgrunn av dette ble det utført et forsøk hvor den samme bakterien ble dyrket opp i flasker med pH 6 og pH 7 tilsatt N<sub>2</sub>O. Kulturene fra medie med pH 7 viste en rask reduksjon av N<sub>2</sub>O til N<sub>2</sub>, mens kulturene ved pH 6 viste ingen reduksjon. Bakteriene fra medie med pH 7 ble overført til nytt medie med nitrat og ved ulike pH: 6, 6.5, 7 og 7.5. Etter at bakteriene hadde redusert nitraten ble det injisert N<sub>2</sub>O til flaskene. Etter injiseringen ble det jevnlig tatt prøver for å studere N<sub>2</sub>O-reduktase aktiviteten. Resultatene viste at de cellene som ble tatt fra pH 7 og inokulert i medie med lavere pH (pH 6) kunne fortsatt redusere en viss del av N<sub>2</sub>O som var i tomrommet, men over en lengre tidsperiode. Ettersom *nosZ* ble transkribert ved lav pH ble det foreslått at hemmingen av N<sub>2</sub>O reduktase enzymet skyldes et posttranskripsjonelt steg hvor proteinet ikke får fullført foldingen i periplasma slik at det ikke blir et funksjonelt enzym, eller at integreringen av kopper inn i det aktive setet ikke fungerer som det skal (Bergaust et al. 2010).

#### 1.4 Klima

Sammenliknet med den pre-industrielle tiden har nåtidens menneskelige og biologiske aktivitet økt det reaktive nitrogenet i biosfæren fra 270 ppm til 319 ppm i 2005 (Wofsy et al. 2007). En viktig årsak til denne økningen skyldes en hyppigere bruk av nitrogenholdig gjødsel for å fremme planteveksten og derved øke produksjon av mat (Vitousek et al. 1997).

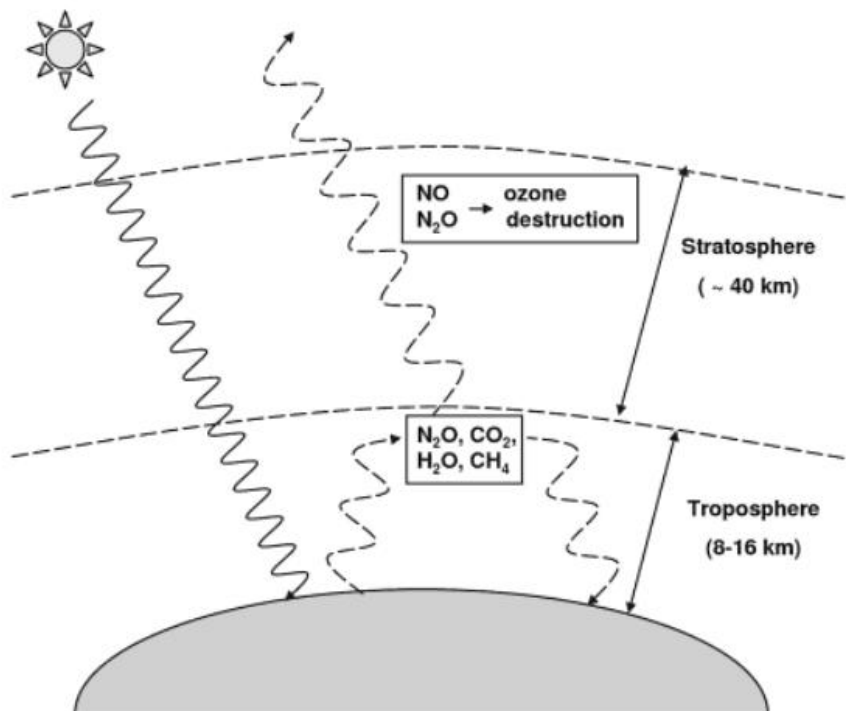
En grunn til utslipp av nitrogenholdige gasser i atmosfæren skyldes prosesser fra nitrogensyklusen. Sluttproduktene fra nitrifikasjon og denitrifikasjon er henholdsvis NO<sub>3</sub><sup>-</sup> og N<sub>2</sub>, men allikevel er det en viss prosent av nitrogenet som passerer disse biokjemiske reaksjonene som blir frigitt ut i atmosfæren som nitrogenmonoksid (NO) og lystgass (N<sub>2</sub>O). På bakgrunn av disse opplysningene ble det utviklet en modell som ble kalt for ”Hole in the pipe” modellen (Figur 1.3) (Firestone et al. 1989).



**Figur 1.3:** Demonstrerer "Hole in the pipe" modellen, hvor det er et utslipp av NO og N<sub>2</sub>O i både nitrifikasjon- og denitrifikasjonsprosessen (Davidson & Verchot 2000).

Av den totale mengden lystgass (N<sub>2</sub>O) i atmosfæren, blir 70 % produsert fra bakterier i jord hvor største delen kommer fra denitrifiserende bakterier (Mosier 1998; Sutton et al. 2011). N<sub>2</sub>O er betydningsfull drivhusgass i den forstand at den har et 310 ganger større GWP (global oppvarmings potensial) enn CO<sub>2</sub>. Når N<sub>2</sub>O slippes ut i troposfæren er den en stabil gass, men i stratosfæren ødelegger N<sub>2</sub>O stratosfærisk ozon (Ravishankara et al. 2009). Det vises en stadig økning av N<sub>2</sub>O i atmosfæren, og det er blitt registrert en kontinuerlig økning på 0.3 % hvert år. Lystgass har en lang halveringstid slik at konsentrasjonen i stratosfæren vil forbli høy over en lengre periode selv om mengde utslipp reduseres (Hansen et al. 2005). Utslipp av klimagasser er med på å påvirke energibalansen i klimasystemet og bidrar til endringer i atmosfærens sammensetning med hensyn på mengden aerosoler, arealdekke og solstråling.

En økt produksjon av drivhusgasser vil forsterke den globale oppvarmingen. Som vist i figur 1.4 vil noen av solens strålinger som treffer jorden alltid reflekteres tilbake ut til atmosfæren. Disse refleksjonsstrålene er mer langbølget enn de kortbølgede elektromagnetiske strålene som solen avgir. Disse langbølgede strålene vil bli absorbert av gassmolekylene (N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> og H<sub>2</sub>O). Denne absorpsjonen fører til økt temperatur i atmosfæren og varmeenergien fra atmosfæren vil sendes tilbake til jorden. På denne måten får jorden en dobbel varmestråling: direkte fra solen og igjen indirekte fra atmosfæren. I den øvre stratosfæren vil UV-strålinger oksidere N<sub>2</sub>O til NO. NO er et høyt reaktivt fritt radikalt som ved konserverte mengde kan være giftig. I stratosfæren vil NO fører til ødeleggelse av ozonlaget og beskyttelsen mot UV-strålinger vil reduseres (Bothe et al. 2007).



**Figur 1.4:** Illustrerer hvilke påvirkning NO og  $N_2O$  samt andre gasser påvirker drivhuseffekten (Bothe et al. 2007).

## 1.5 *Bradyrhizobium*

### 1.5.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme

*Bradyrhizobium* er en fakultativ anaerob, gram negativ,  $\alpha$ -proteobacteria som kan leve fritt i jorden, eller danne et nitrogenfikserende symbioseforhold med belgvekster (Willey et al. 2008). Cellene er formet som korte staver og er bevegelige ved en polar eller subpolar flagelle (Jordan 1982). *Bradyrhizobium* tilhører orden *Rhizobiales*, sammen med slektene: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (tidligere kjent som *Sinorhizobium*), *Allorhizobium* og *Azorhizobium* (Sawada et al. 2003).

Disse bakteriene viser en stor diversitet, både geografisk og taksonomisk (Saeki et al. 2010). Basert på DNA-DNA hybridiseringsforsøk ble det vist at bakterier som danner noder i belgvekster kan deles inn i to grupper. De bakteriene som vokser raskt og er syreproduserende: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* og *Mesorhizobium* og de andre bakteriene som er saktevoksende og ikke-syre produserende er *Bradyrhizobium* (Jordan 1982). Denne inndelingen er fortsatt gjeldene. Til dags dato er det identifisert ni



*Bradyrhizobium* arter, og disse er: *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium denitrificans* (tidligere kjent som *Blastobacter denitrificans*), *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium iriomotense*, *Braadyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium jicamae*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Bradyrhizobium pachyrhizi* og *Bradyrhizobium yuanmingense*.

Som frittlevende celler i et oksygenrikt miljø vil *Bradyrhizobium* få energi gjennom aerob respirasjon. Dersom mengde oksygen i omgivelsene reduseres kan bakterien gå over til anaerob respirasjon, med denitrifikasjon (Bedmar et al. 2005). Denne egenskapen er ikke stort utbredt blant rizobia og til nå er det kun *B. japonicum* og *A. caulinodans* som har blitt klassifisert som ekte denitrifiserende bakterier.

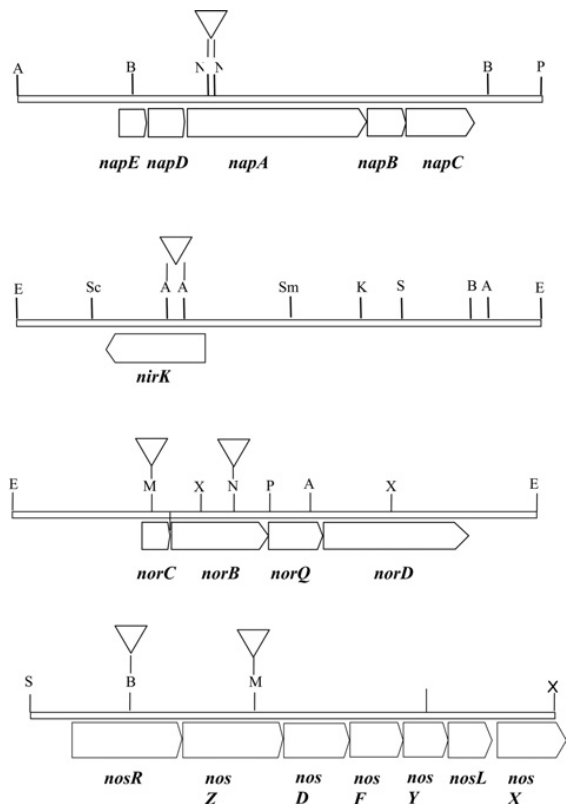
### 1.5.2 Denitrifikasjons genene hos *Bradyrhizobium japonicum*

Hos samtlige av *Bradyrhizobium* stammene som er blitt undersøkt er genene som koder for denitrifikasjonsreduktasene lokalisert i kromosomet (Kaneko et al. 2002). Genene som er knyttet til denitrifikasjon hos *Bradyrhizobium japonicum* er identifisert som: *napEDABC* (involvert i nitrat reduktase), *nirK* (Involvert i nitritt reduktase), *norCBQD* (involvert i nitrogenmonooksid reduktase) og *nosRZDFYLX* (involvert i dinitrogenokside reduktase) (figur 1.6) og koder for de respektive for enzymene: nitrat-, nitritt-, nitric oxide- og nitrous oxide reduktase (Bedmar et al. 2005).

Under denitrifikasjon overføres elektroner fra NADH dehydrogenase og sukksinat dehydrogenase til ubiquinon som genererer ubiquinol. Elektronene fraktes fra ubiquinol til respiratorisk nitrat reduktase eller reduktasen for nitritt, nitrogenmonokside og dinitrogenokside gjennom cytokrom *bcI*. *B. japonicum* har tre løslige c-type cytokromer  $c_{550}$ ,  $c_{552}$  og  $c_{555}$  kodet av genene *cycA*, *cycB* og *cycC*. Cytokrom  $c_{550}$  kodes av genet *cycA* og er involvert i elektronoverføringen til *nirK* fra blant annet cytokrom *bcI* (Bueno et al. 2008).

Transkripsjon av de genene som koder for nitrogenoksid reduktasene reguleres av proteiner som tilhører cyclic AMP reseptor protein (CRP) og fumarat og nitrat reduktase regulatoren (FNR). Transkripsjon av genene *nir*, *nor* og *nos* promotor region avhenger av FixLJ og FixK<sub>2</sub> genene som danner den regulatoriske kaskaden FixLJ-FixK<sub>2</sub>. FixLJ er et to-komponent reguleringsystem som består av en heme basert sensor kinase FixL og regulatoren FixJ som kontrollerer FixK<sub>2</sub>. Proteinet FixK<sub>2</sub> fungerer som en aktivator for transkripsjon til flere gener involvert i anaerob og aerob metabolisme. FixK<sub>2</sub> tilhører den oksygensensitive

proteinfamilien FNR (fumarat og nitrat reduktase regulator) og CRP (syklisk AMP reseptor transkripsjonsregulator) (Mesa et al. 2004). Når oksygenkonsentrasjonen i miljøet rundt cellen avtar aktiveres uttrykkelsen av FixLJ og FixK<sub>2</sub>. FixK<sub>2</sub> aktiverer *nnrR* som koder for FNR/CRP regulatoren NnrR. Studier tyder på at nitrogenoksid mediert induksjon av genene *nap*, *nir* og *nor* avhenger av NnrR. Induksjon av *norCBQD* promotoren er fullstendig avskaffet ved fravær av *nnrR* genet (Bedmar et al. 2005).



**Figur 1.5** Organisering av denitrifikasjonsgenene hos *Bradyrhizobium japonicum*.

Operonet *napEDABC* koder for enzymet periplasmatisk nitrat reduktase (NAP) som reduserer nitrat til nitritt. NAP enzymet oksiderer quinol som vil tillate cellen å vokse under oksygenbegrensede forhold (Delgado et al. 2003). Operonet som koder for NAP (Figur 1.5) er satt sammen av fem ulike gener: *napA* koder for MGD (molybdopterin guanine-dinucleotide cofactor). *napB* koder for en elektron-transfer subenhet, dihaem cytochrome c, *napC* koder for en memebanbunden c-type tetrahem cytochrome. *napE* koder for et transmembran protein, med ukjent funksjon. *napD* genet koder for et løselig protein som spiller en rolle i modningen av *napA* (Delgado et al. 2003).

*nirK* genet koder for syntetiseringen av kobber - inneholdende nitritt reduktase NIR. Det er ansvarlig for en en-elektron reduksjonen av nitritt (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), til den første gass intermediaten i

denitrifikasjonen, nitrogenmonoksid (NO). NIR enzymet kodes av kun ett enkelt gen (Bedmar et al. 2005). I *B. japonicum* er det funnet to ulike NIR enzymer med ulike redoks aktive sentere, enzym som inneholder c- og d<sub>1</sub>-type haem, og et annet som har Cu som det redoks-aktive transisjons metall. Til nå er det ikke funnet en organisme som har hatt begge disse enzymene. NIR er et løselig protein som i foldet tilstand blir fraktet til pereioplasma gjennom et tvilling-argenin translokeringsystem (TAT).

*norCBQD* operonet koder for c-type nitric oksid reduktase og står for en to-elektron reduksjon av nitrogenmonoksid (NO) til lystgass (N<sub>2</sub>O). I reaksjonen dannes det ett N-N bånd. Nor-operonet inneholder et kluster av fire ulike gener (Bedmar et al. 2005), med *norC* og *norB* som koder for cytochrome c-inneholdende subenhet II og cytochrom b-inneholdende subenhet I av cNor. *norQ* koder for et protein med et ATP/GTP bindende motiv, mens *norD* er av ukjent funksjon (Mesa et al. 2002).

Operonet *nosRZDFYLX* koder blant annet for den siste reduktasen i denitrifikasjonstrinnet, dinitrogenoksid reduktase som kodes av syv gener. *nosR* koder for et integrert membranprotein som består av seks transmembrane helixer. Genet koder også for en C-terminal cytoplasmisk domene som inneholder to cystein klustere (Bedmar et al. 2005).

## 2. MATERIELL

### 2.1 Bakteriekulturer

**Tabell 2.1:** Oversikt over Bradyrhizobium stammene som ble benyttet i denne oppgaven. Stammene ble isolert ved to ulike metoder og utført av (Wolde-meskel et al. 2004b). Plantefrø ble sådd i jord som var blitt samlet inn fra 14 ulike lokasjoner. Etter vekst i drivhus ble noder fra plantene samlet inn og stammene ble isolert. Denne metoden ble utført på Awassa College of Agriculture og geografisk opphav er derav merket med Awassa ACA. I den andre metoden ble stammer isolert fra noder som var blitt gravd opp fra planter ute i naturen i den sørlige delen av Etiopia. Det geografiske opphavet beskriver plantens lokasjon. For en nærmere geografisk beskrivelse se figur 3.1.

Strain nr.	Vertsplante	16S rDNA sekvens	Geografisk opphav
29c	<i>F. albida</i>	<i>B. liaoningense</i>	RFC
62a	<i>V. unguiculata</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Dilla
64a	<i>V. unguiculata</i>	<i>B. yuanmingense</i>	Nazret
64b	<i>V. unguiculata</i>	<i>B. yuanmingense</i>	Nazret
64c	<i>V. unguiculata</i>	<i>B. yuanmingense</i>	Nazret
65c	<i>V. unguiculata</i>	<i>B. yuanmingense</i>	Nazret
70c	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. liaoningense</i>	Akaki
79a	<i>E. brucei</i>	<i>B. liaoningense</i>	Awassa ACA
79b1	<i>E. brucei</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
79b3	<i>E. brucei</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
79c2	<i>E. brucei</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
86b2	<i>C. cajan</i>	<i>B. liaoningense</i>	Awassa ACA
86d2	<i>C. cajan</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87b1	<i>M. ferruginea</i>	<i>B. elkani</i>	Awassa ACA
87b3	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87h	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87j1	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87j2	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87L	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87m	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
87n	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
92b	<i>A. gummifera</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
92c	<i>A. gummifera</i>	<i>B. japonicum</i>	Awassa ACA
92d	<i>A. gummifera</i>	<i>B. japonicum</i>	Awassa ACA
92e	<i>A. gummifera</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Awassa ACA
94a	<i>F. albida</i>	<i>B. elkani</i>	RFC
96c	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Wondogene
96d	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Wondogene
97a	<i>A. saligna</i>	<i>B. japonicum</i>	Wondogene
101b	<i>A. saligna</i>	<i>B. liaoningense</i>	Leku
101c	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Leku

<b>101e</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Leku
<b>104a</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Bule
<b>104b</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Bule
<b>104c1</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Bule
<b>104c2</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Bule
<b>104d</b>	<i>A. saligna</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Bule
<b>107a</b>	<i>M. ferruginea</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Dilla
<b>107e</b>	<i>M. ferruginea</i>	<i>B. elkani</i>	Dilla

Tabell 2.2: Andre organismer som ble benyttet

<b>Stamme</b>	<b>Kilde</b>
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen

## 2.2 Laboratorieutstyr og maskiner

Tabell 2.3: Oversikt over utstyr og maskiner som ble benyttet

<b>Utstyr</b>	<b>Modell</b>	<b>Produsent</b>
Autoklav	SX - 500E	TOMY
Bordsentrifuge	Minispin	Eppendorf
Celleknuser	FastPrep® - 24	M. P. Biomedicals
Elektroforesekar	Mini Sub® Cell GT	BioRad
Filter	Glass mikrofiber filter 25mm	Whatman
Fluorescensmikroskop	Leica DMRE	Leica
Geldokumentasjon	GelDoc	BioRad
Kjøleskap sentrifuge	3500	Kubota
Magneter	Triangulars 25 x 8mm	VWR
Magnetrorer	Komet	Variomag
Membranfilter	Cyclopore track etced membrane 25mm	Whatman
Mikrobølgeovn		Whirlpool
PCR maskin	GeneAmp* PCR system 2700	A&B
pH - meter		
Pipetter	Finnpipetter (0,5-10 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul, 1-5 ml)	Thermo Scientific
Robotarm	GC injector 80	Agilent Technologies

RT-PCR	Step One™ Plus	A&B
Robot - sampler	7890A GC systems	Agilent Technologies
Spektrofotometer 1	ND-1000	Nanodrop
Spektrofotometer 2	UV-1800	Shimadzu
Spektrofotometer 3	WPA Spectrowave	Biochrom
Strømforskyning-gelelektroforese	Power Pac 300	BioRad
Vakuumbad	Vacuum filtration manifold	Millipore®
Vannbad	F34	Julabo
Varmeblokk	esco	ProvoCell®
Vekt		Sartorius
Vortex		Labnet Int. Corp.
Qubit	Qubit® Fluorometric Quantitation	Invitrogen

### 2.3 Programvarer

Tabell 2.4: Oversikt over programvarene som ble benyttet

Dataprogram	Produsent	Bruksområdet
BioEdit	Tom Hall	Sekvenseringssøk
EZ Chrom Elite	Agilent Technologies	Aktivere GC
Nanodrop ND-1000 3.3.1.	Thermo Fisher Scientific	Kvantifisere nukleinsyrer
Python	Python Software Foundation	Kommandere robot
Serial Cloner	Serial Basics	Sekvenssammenstilling
UVProbe photometric	Shimadzu	Måle nitritt

### 2.4 Kit

Tabell 2.5: Oversikt over kittene som ble benyttet

Kit	Bruksområdet	Produktnummer
Power SYBR® Green PCR Master Mix	RT-PCR	4367659
The Original TA Cloning® Kit pCR®2.1 vector	Kloning	45-0046
BigDye® Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit	Sekvensering	4337455
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Kvantifisering	Q32851
Qubit® RNA Assay Kit	DNA/RNA	Q32852

## 2.5 Proteiner og enzymer

T4 DNA ligase

Taq DNA polymerase med 10x reaksjonsbuffer

## 2.6 Primere

**Tabell2. 6:** Oversikt over de ulike primersekvensene som ble benyttet i denne studien.

Gen	Primer sekvens	PCR produkt	Tm
nirK <sup>1</sup> _1	Fremover	GGATGCTTCAGATGTTCAACCCGCA	1117 bp
nirK_2	Revers	CCTTGTCGCGTCTAGTTGGTGTTG	
norCB_1 <sup>2</sup>	Fremover	GCCGGACCCAGTAGAACATAGCGAGC	1683 bp
norCB_2	Revers	CTACGGCGGCTCGGCTTTTTTCTTCG	58
nosZ_GH-F <sup>3</sup>	Fremover	GGGTCAGACCAAGGAGGCGGA	261 bp
nosZ_GH-R	Revers	TGGCCTGCTTGACCGCATCG	54
nosZ_ZF <sup>4</sup>	Fremover	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	700 bp
nosZ_ZR	Revers	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	55
16S 27_F <sup>5</sup>	Fremover	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465 bp
16S 1492_R	Revers	GGTTACCTTGTTACGACTT	57

<sup>1</sup> og <sup>2</sup> (Sameshima-Saito et al. 2006)

<sup>3</sup> Heen. G. 2012

<sup>4</sup> (Kloos et al. 2001)

<sup>5</sup> (Lane 1991)

## 2.7 Dyrkningsmedier, buffere og løsninger

### 2.7.1 Dyrkningsmedier

#### YMB - Yeast-extract Mannitol Broth (Somasegaran & Hoben 1994)

Mannitol 10 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g

NaCl 0.1g

Gjær ekstrakt 0.5 g

dH<sub>2</sub>O opp til 1 liter

**LB medium**

Tryptone 10 g

Gjær ekstrakt 5 g

NaCl 10 g

dH<sub>2</sub>O opp til 1 liter.

**LB agar**

Tilsett 12 g agar til flytende medium.

**3.7.2 Buffere og løsninger****Kloroform–isoamyl alkohol (24:1)**

Bland 96 ml kloroform med 4ml isoamylalkohol.

**50 % glyserol**

29 mL 87 % glyserol

21 mL MQ-vann

Løsningen ble autoklavert ved 121 °C i 15 min og oppbevart ved romtemperatur.

**1 x TE buffer**

10mM Tris pH 8

1mM EDTA

**50 x TAE**

242 g 2 M Trizma®-base

57.1 ml 2 M Iseddik

100 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0)

dH<sub>2</sub>O opp til 1 liter.

**Celite**

10 % Celite

0.1 % TE buffer

**EDTA 125 mM**

2.474 g EDTA (1M = 372.24 g/mol) ble løst i til sammen 100 ml MQ-vann. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved romtemperatur.



### **Fargereagens – nitritmåling**

#### **Løsning A**

20 g Aminobenzen sulfonamide

50 ml Ortofosforisk syre (85 %)

Tilsett Ortofosforisk syre (85 %) til 150 ml H<sub>2</sub>O og tilsett Aminobenzene sulfonamiden. Juster volumet til 250 ml med H<sub>2</sub>O.

#### **Løsning B**

2 g N-(1-naphtyl)-1,2-diaminoethane dihydrochloride

250 ml H<sub>2</sub>O

Bland løsning A og B 1:1 før bruk. Beskytt løsningen mot sollys og oppbevar den ved 4 °C.

### **Monteringsløsning**

5 ml 1xPBS

5 ml Glycerol

10 µl 10% parafenylendiamin (PPD)

### **3M Natrium Acetat**

24.609 g Natrium Acetat (1M = 82,03 g/mol) ble løst i til sammen 100 mL MQ-vann og pH ble justert til 5,2. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved romtemperatur.

**New wash buffer** 20 ml 100mM Tris HCl pH 7.5

100 µl 1M EDTA pH 8

20 ml 2M NaCl

59.9 ml 100% ethanol

dH<sub>2</sub>O opp til 100 ml

### **Solution K**

50 ml 100 mM Tris HCl pH 8

2 ml 1M EDTA

5 ml 1M NaCl

1 g Sarkosyl

dH<sub>2</sub>O opp til 100 ml

## 2.8 Kjemikalieliste

**Tabell 2.7:** Alfabetisk oversikt med kjemisk formel og leverandør for de kjemikalier som ble benyttet i dette arbeidet.

Navn	Kjemisk formel	Leverandør
Agarose		Invitrogen
Aminobenzenesulfonamide		Merc
Ampicillin		Sigma
Celite		
di-Kaliumhydrogenfosfat	$K_2HPO_4$	Merck
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma
Etanol	$C_2H_5OH$	A RCUS
Etidium Bromide	EtBr	Sigma
Glycerol	$C_3H_8O_2$	Merck
Gjær ekstrakt		Merck
Iseddik	$CH_3COOH$	Merck
Isoamylalkohol	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	Merck
Kaliumklorid	KCl	Merck
Kloroform	$CHCl_3$	Sigma
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Sigma
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	Merck
Natriumacetat	$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$	Merck
Natriumklorid	NaCl	Merck
Ortofosforisk syre	$H_3PO_4$	Merck
Parafenyldiamin (PPD)	$C_6H_4(NH_2)_2$	Sigma
Sarkosyl	$C_{15}H_{28}NNaO_3$	Sigma
Tris base	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma
Tris-HCl	$C_4H_{11}NO_3 \times HCl$	Sigma
Trizma® base	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma
Tryptone		Sigma

### 3. METODER

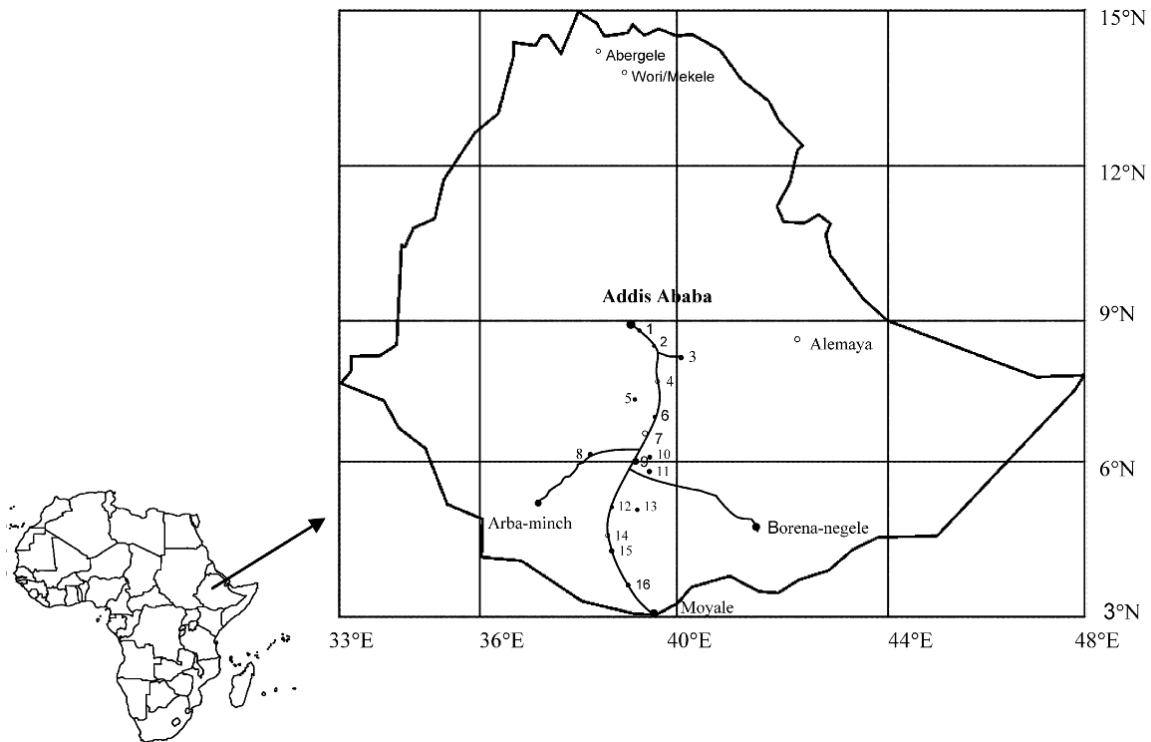
#### 3.1 Isolering og rendyrking av *Bradyrhizobium* stammer

Stammene som ble benyttet i denne oppgaven ble isolert fra rotnoduler av belgevekster i Etiopia (Wolde-meskel et al. 2004a).

Isolering av *Bradyrhizobium* ble utført på to ulike måter. Den ene metoden kalles ”trapping” (=”fangst”). Den innebærer at frø fra plantene *F. albida*, *A. tortilis* og *A. seyal* ble samlet inn i den sørlige delen av Etiopia og dyrket in vitro i innsamlede jordprøver fra 14 ulike lokasjoner (Figur 3.1). Dyrkningen ble utført på Awassa College of Agriculture (ACA). Plantespirene ble plassert i et drivhus og høstet etter 12 uker. Hos de plantene som viste nodulering ble nodulene fjernet og oppbevart i en silica gel som senere ble isolert for rhizobia. Silica gel vil absorbere fukt og forhindre en eventuell forråtnelse av nodulene under oppbevaringsprosessen. Silica gelen vil også hindre en invasjon av mikroorganismer fra eventuelle jordrester som kan forstyrre den senere isoleringsprosessen. I den andre metoden ble det gravd frem noduler fra utvalgte planter i naturen hvor det ble isolert bakterier direkte fra disse nodulene. En oversikt over de ulike lokasjonene der de ulike nodulene og jordprøvene ble innsamlet vises i figur 3.1.

Før isolering av bakteriene ble nodulene overflatesterilisert i 3 % NaOCl i 4 minutter og deretter rensert med sterilisert vann. Nodulene ble knust og stryket ut på en petriskål med YMA. Petriskålene ble inkubert ved 28 °C i opptil 14 dager. De petriskålene som viste kolonier ble stryket over på nye skåler med ulike mediakomposisjoner. Det ble benyttet YMA med Bromothymol blue (BTB), YMA med Congo red (CR) og pepton glucose agar med bromocrysol purple (BCP) som vil gi en fargereaksjon hos noen organismer. Resultatene fra disse skålene ble brukt for å identifisere og isolere rhizobia. For å kategorisere isolatene ble kulturene studert med hensyn på ekstracellulært polysakkarid, endring av pH i mediet samt kolonistørrelse og farge (Wolde-meskel et al. 2004a).

De bakteriestammene som ble arbeidet med i denne oppgaven er oppgitt i tabell 2.1.



**Figur 3.1** Oversikt over lokasjoner i Etiopia hvor noduler og jordprøver ble isolert. Ufylte sirkler representerer jordprøvene, mens de fylte sirklene er der frøene ble innsamlet. Numrene representerer lokasjonene: 1 Akaki, 2 Debrezeit, 3 Nazret, 4 Meki, 5 Enseno, 6 Abernosa, 7 Arsinegele, 8 Chofa, 9 Awassa, 10 Wondogenet, 11 Leku, 12 Dilla, 13 Bule, 14 Surupa, 15 Yavelo, 16 Mega (Wolde-meskel et al. 2004a).

### 3.2 Oppbevaring av *Bradyrhizobium* stammer

For hver av de 39 bakteriekulturene (tabell 1) ble det laget frysestock fra den eksponentielle vekstfasen. Frysestocken ble laget ved å tilsette 50 % glycerol med en sluttkonsentrasjon på 15 % i hver av bakteriekulturene. Kulturene ble oppbevart i -80 °C fryser.

### 3.3 Dyrkning av *Bradyrhizobium*

*Bradyrhizobium* ble dyrket opp i Yeast Mannitol Broth (YMB) (mediekomposisjon se 2.7.1) i et oppvarmet vannbad ved 28 °C. YMB mediet ble justert ned til pH 6.8 (+/- 0.2) ved å tilsette HCl. For å opprettholde et aerobt miljø i oppdyrkingen av stammene og unngå aggregering foregikk inkubasjonen under røring ved 700 rpm. Autoklaverte medisinflasker med YMB og magnetstaver ble inokulert med *Bradyrhizobium* stammer og flaskeåpningen dekket med aluminiumsfolie. Flaskene ble plassert i et vannbad hvor en magnetplate med 15 rørepunkter var nedsenket (ca 6 cm under vann). For senere transkripsjonsanalyser er det viktig at inokulumet ikke blir utsatt for et anoksisk miljø slik at cellene ikke begynner å transkribere

gener for denitrifikasjon. Denne oppdyrkningsmetoden ble benyttet for samtlige av forsøkene i denne oppgaven hvor alle flasker ble tilsatt 1 ml av inokulemet med 0.2 OD<sub>420</sub>.

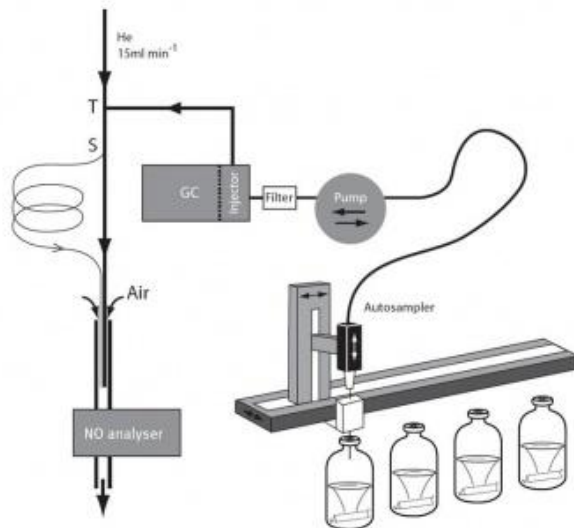
### 3.4 Semiautomatisk inkuberingsystem for gasskinetikk-analyser

For å kartlegge de metabolske mønstrene i denitrifikasjonen benyttes et semiautomatisk inkuberingsystem for å kontinuerlig overvåke produksjon av gassene O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>. Et slikt automatisk inkuberingsystem er blitt utviklet ved UMB (Molstad et al. 2007) og det er en stor forbedring fra de tidligere metodene der man tok ut gassprøver manuelt og injiserte gassen inn i en gass kromatograf som analyserte gasskonsentrasjonene. Det semiautomatiske inkuberingsystemet som benyttes i denne oppgaven tillater å ta prøver kontinuerlig til ønsket tidspunkt over lengre perioder. Noe som letter på den manuelle arbeidsmengden. Det er svært presist i sine gassmålinger, også for N<sub>2</sub> som har vært problematisk å måle direkte tidligere grunnet lekkasje av N<sub>2</sub> fra atmosfæren. Tidligere inkuberingsystem har benyttet acetylen for å inhibere N<sub>2</sub>O reduktase for å kun analysere N<sub>2</sub>O fremfor N<sub>2</sub>. N<sub>2</sub>O er lettere å kvantifisere enn N<sub>2</sub>, på grunn av at det er en utfordring å unngå kontaminering fra atmosfæren under disse typer målinger (Mahne & Tiedje 1995). En slik metode kan påvirke bakteriens vekst ettersom en reduksjon av det siste steget vil gi organismen mindre energi i form av ATP. En annen metode som har blitt benyttet er bruk av nitrat merket med isotopet N<sup>15</sup> for å kunne spore nitraten gjennom denitrifikasjonsprosessen. Denne metoden er ikke like presist som det semiautomatisk inkuberingsystem samtidig som den krever dyrt utstyr og mye laboratoriearbeid.

I gasskinetikk-forsøkene for denne oppgaven ble det benyttet 120 ml medisinflasker med 50 ml YMB medium og 2 mM KNO<sub>3</sub> (unntak ved slutt punkt analysen hvor det ble brukt 4 mM KNO<sub>3</sub>). Flaskene ble tilsatt en magnet og forseglet med steriliserte membranlokk og en aluminiumskappe slik at flasken ble lufttette. Deretter evakueres luften ut i flaskene og vakuemet ble erstattet med helium, dette kalles heliumvasking. Dette ble utført i et semiautomatisk system bestående av en vakuumpumpe og en heliumtilkobling. Heliumvaskingen bestod av seks sykluser med seks minutters evakuering og 0.5 minutter fylling av helium samt ett sluttrinn hvor flaskene ble etterfylt med helium. Helium benyttes på bakgrunn av dens stabile egenskap slik at den ikke vil reagere med de andre gassene som dannes og reagerer ikke med bakteriene. Årsaken til heliumvaskingen er at man ønsker fjerne den naturlige atmosfæren, som blant annet inneholder 78 % N<sub>2</sub>, for å oppnå korrekte gassmålinger i de avlukkede flaskene. Dette er avgjørende for å kunne måle mengde produsert

N<sub>2</sub> samt de andre gassene som produseres under denitrifikasjon. Overtrykket i de heliumvaskede flaskene ble frigitt ved å injisere en sprøyte uten stempel, fylt med vann, for å forhindre at luft kommer inn. Før inokuleringen av bakteriene ble flaskene tilsatt 1 % rent oksygen. Ved å gi inokulumet tilgang på oksygen i starten av gasskinetikk-forsøkene får man en bedre kontroll på overgangen mellom den oksiske og den anoksiske fasen. Det er viktig at bakteriene ikke ble direkte overført fra et oksygenrikt miljø til et lukket, anoksiske miljø. En slik rask transisjon kan føre til at bakteriene får sjokk ettersom de nødvendigvis ikke har en tilstrekkelig energikilde for å kunne syntetisere denitrifikasjonsproteom for å initiere en anaerob respirasjon. Dette kan føre til at bakteriene stopper opp og ikke fortsetter å vokse. Denne transisjonsfasen er interessant informasjon som er med på å bestemme DRP. Etter at bakteriene ble inokulert i flaskene plasseres de i en termostatisk vanninkubator med magnetrører i bunnen. Den konstante røringen på 700 rpm av mediet forhindrer en eventuell dannelse av aggregering og gir en effektiv gassutveksling mellom det flytende medie og gassfase.

Autosampleren og pumpen til å ta prøver fra en spesifikk flaske posisjon ved en gitt tid er dirigert av programvaren Python. Autosampler injiserer en nål i membranen på medisinflaskene og den peristaliske pumpen transporterer prøvene fra headspacet i flasken til gass kromatografen og NO måleren. En oppsummering av GC dataene er lagret i programvaren Galaxie. Gass kromatografen som benyttes i denne autosampleren er Varian CP4900 microGC med to kolonner: PLOT U og Molsieve. Begge kolonene har en injiseringstid på 50 sek. PLOT U har et heliumstrykk på 200 kPa og 36 °C, mens Molsieve har et heliumstrykk på 250 kPa og 50 °C (Molstad et al. 2007).



**Figur 3.2:** Figur av robotens prøvetaking og gassanalysesystem (Molstad et al. 2007).

Selv om det har blitt enklere å måle gasskinetikk i et semiautomatisk inkubatorsystem er det flere punkter som må tas hensyn til før og under et forsøk. Inokulumet som benyttes må ha blitt dyrket opp under aerobe forhold som beskrevet i punkt 3.3. Luften må være fullstendig evakuert ut av flaskene slik at det ikke finnes gjenværende spor av atmosfære i luftrommet eller i det flytende mediet. Under gassmålingene er det viktig at autosampleren og nålen som injiserer septum er rent slik at det ikke vil oppstå en kontaminering. Utstyret brukes også for å inkubere intakte jordprøver og man må ta forhåndsregler for en eventuell kontaminering under forsøkene. Under en gassmåling ble gass tatt ut av flaskene og erstattet med helium. Under tilføring av helium ble det overført bakterier fra et tidligere forsøk slik at kulturene i YMB mediet ble kontaminert. Gasskinetikk resultatene ble derfor annet enn forventet og forsøket måtte utføres på nytt. Etter denne hendelsen ble forsøkene nøyere kontrollert for en eventuell kontaminering og det ble utført ERIC-PCR før og etter forsøkene (se punkt 3.10).

Under behandling av resultatene ble det beregnet produsert gassmengde og korrigert for lekkasje inn og ut av autosamplersystemet ved å kalibrere med tre kjente standarder. Høy standard inneholder 151 ppm  $N_2O$ , 10 000 ppm  $CO_2$ , samt lave konsentrasjoner av  $N_2$  og  $O_2$ . Lav standard inneholder 210 000 ppm  $O_2$  og 790 000 ppm  $N_2$ , samt lav  $N_2O$  og  $CO_2$ . NO standarden inneholder 24.9 ppm NO. Standard med høy konsentrasjon av  $O_2$  og  $N_2$  ble brukt for å kalkulere fortynningsfaktor for å kompensere for det som fjernes av gass i flasken ved hver gassmåling. Standard med lav konsentrasjon benyttes for å kalkulere for eventuell lekkasje som kan oppstå når nålen injiseres i septum på flaskene.

De første målingene som ble utført i denne oppgaven var en sluttpunktsanalyse for samtlige av stammene som ble oppgitt i tabell 1. For en nærmere beskrivelse se punkt 3.5. Senere ble det semiautomatiske inkubatorsystemet benyttet til en rekke andre gasskinetikkmålinger av et utvalg av stammene fra tabell 2.1. Disse forsøkene ble benyttet for å få en bedre forståelse av stammenes denitrifikasjonsmønster og resultatene ble brukt som grunnlag for transkripsjonsanalyser for å kunne forutse de riktige tidspunktene for å ta ut prøver.

### 3.5 Sluttpunktsanalyse

For å kartlegge og få en bedre oversikt over denitrifikasjonsmønsteret til de 39 stammene (Tabell 2.1) ble det kjørt en sluttpunktsanalyse i det semiautomatiske inkuberingssystemet som beskrevet ovenfor (punkt 3.4). Under sluttpunktsanalysen ble det målt gasskinettikk sent i denitrifikasjonen for å få en oversikt over det siste reduksjonstrinnet for de ulike stammene. Dette gir en generell oversikt over hvilke av stamme som har en fullstendig denitrifikasjon og hvilke som har en trunkert denitrifikasjon. Stammene ble dyrket opp som nevnt i punkt 3.3 og inokulert i hver sin medisinflaske med YMB tilsatt 4 mM  $\text{KNO}_3$ . Flaskene ble evakuert og injisert med 1 % oksygen. Flaskene ble satt på risting og gassen ble målt i det semiautomatiske inkuberingssystemet etter en og to uker.

Resultatene for denne analysen ble plassert inn i et fylogenetisk tre der stammene ble fylogenetisk plassert med hensyn på glutamin syntetase II. Det fylogenetiske treet er konstruert av Degefu, 2012 (manuskript under arbeid). På bakgrunn av disse resultatene ble det valgt ut noen få stammer som viste en produksjon av  $\text{N}_2$  og som hadde en distanse mellom hverandre i det fylogenetiske treet. På bakgrunn av disse utvelgelsene er det kun noen få stammer som ble tatt med til videre analyse nedenfor.

### 3.6 Celletall vs OD

Det ble beregnet antall celler per ml ved å vise korrelasjon mellom celletall og optisk densitet (OD). Metoden baseres på bruk fluorescensmikroskopi (Bakken 1985) for å telle antall celler i en kultur med kjent OD.

Bakteriecellene ble spredt ut på et svart membranfilter gjennom å vakuere en løsning bestående av steril filtrert Akridine oransje, destillert vann og celler. Akridine oransje farger cellens DNA og RNA slik at nukleinsyrene vil avgi et fluoriserende lys. Akridine oransje inneholder blant annet glutaraldehyd som fikser cellene og forhindrer de i å dele seg. Ved å overføre et bestemt volum av kulturen til et filter med kjent areal blir det mulig å kalkulere



celletallet. For å telle cellene ble det brukt et okular med rutenett. I dette rutenettet er det kun de bakterier som befant seg innenfor BCZ ruten som ble telt.

Fordelen ved bruk av Akridin oransje fremfor andre metoder, som for eksempel SYBR green, er at det er en tidsbesparende metode som vil avgi et sterkere fluorescerende lys enn hva SYBR green ville gitt. Ulempen med denne metoden er at Akridin oransje anses å være mer toksisk enn SYBR green.

For hver av stammene ble det forberedt fire ulike fortyntninger med følgende OD: 0.8, 0.5, 0.2 og 0.05. For hver av fortyntningene ble det tatt ut triplikat slik at det totalt ble 12 filtre som ble telt 30 ganger per stamme. Cellekulturene og sterilfiltrert Akridin oransje ble blandet 1:1, hvor Akridin oransje i sin opprinnelige løsning hadde en konsentrasjon på 2.5 %. Hver av prøvene ble vasket etter farging med 10 ml dH<sub>2</sub>O.

### **2.3.1 Protokoll for oppsett av membranfiltrering**

1. Glassmikrofiberfiltre ble plassert på vakuumpulveriseringsoppsettet. For at filterene skal holdes på plass ble de fuktet noen dråper dH<sub>2</sub>O.
2. Membranfilterene ble plassert på det fuktete filteret ved bruk av en pinsett.
3. Filterene ble vasket ved å tilsette 2 ml dH<sub>2</sub>O og starte vakuumpulveriseringsoppsettet.
4. Cellesuspensjonen med Akridin oransje ble så tilsatt på filterene og vakuumpulveriseringsoppsettet ble startet. Vakuumpulveriseringsoppsettet ble slått av når membranfilteret så tørt ut og all suspensjonen har passert filteret.
5. Deretter ble filteret vasket to ganger ved å tilsette 5 ml dH<sub>2</sub>O og med vakuumpulveriseringsoppsettet startet.
6. Membranfilterene ble plassert på objektglass med en dråpe monteringsløsning. Filteret ble plassert på objektglasset med bakteriesiden opp.
7. Det ble også satt en dråpe monteringsløsning på membranfilterets bakterieside. Over monteringsløsningen ble det plassert et dekkglass. Under behandling av prøver farget med Akridin oransje er det viktig å jobbe raskt ettersom Akridins fluoresansen avtar under eksponering av for mye lys.
8. Prøvene ble plassert i et fluorescensmikroskop og studert ved 10 x okular og 100 x objektiv med bruk av immersjon olje. For hver av prøvene ble det telt 30 BCZ ruter ved å forflytte seg tilfeldig rundt på membranfilteret med mikroskopet.

Antall bakterier på filteret =  $N \times (2 \times 10^6)$  hvor N er gjennomsnittet bakterier per BCZ rute.

Med hensyn på fortyntning og konsentrasjon ble det regnet ut antall celler per ml.

### 3.7 Generasjonstid

Det ble utregnet generasjonstid for å få en oversikt over hvor lang tid stammene brukte for å doble celleantallet. For hver av stammene ble det inokulert 1ml med 0.8 OD<sub>420</sub> i tre medisinflasker med 50 ml YMB medium. I den eksponentielle vekstfasen ble det jevnlig tatt ut prøver av kulturen og OD<sub>420</sub> ble målt i et spektrofotometer. For hver av stammene ble beregnet gjennomsnitt av de målte triplikatene. I den eksponentielle veksten har stammene en periode med konstant doblingstid slik at det blir mulig å kalkulere generasjonstiden (Abdel-Salam et al. 2010).

### 3.8 Ekstraksjon av genomisk DNA

Isolering av genomisk DNA ble utført ved å bruke kjemisk lysering av isolerte bakterieceller (Boom et al. 1990), med modifikasjon (Terefework et al. 2001). Det isolerte DNAet fra stammene ble benyttet i arbeidet for å designe spesifikke primere for denitrifikasjonsgenene. Hensikten med dette forsøket var å identifisere denitrifikasjonsprimere som var spesifikke. Disse primere ble senere benyttet i Real Time PCR under transkripsjonsanalysene.

Isoleringen starter med en sentrifugert bakteriepellet som ble resuspendert i en lyseringsbuffer Solution K (inneholder Sarkosyl), slik at bakteriecellen sprekker og frigjør DNA. Etter lysering behandles ekstraktet med RNase som degraderer bakterielt RNA. Dette er ønskelig å fjerne ettersom det kan forstyrre en senere PCR reaksjon. Celite binder genomisk DNA slik at eventuelle forurensninger kan renses ut ved bruk av "New wash buffer" og 70 % etanol og pelleten tørkes. DNA separeres fra Celiten ved å tilsette dH<sub>2</sub>O og sentrifugere løsningen slik at DNA elueres i supernatanten.

#### 2.3.2 Protokoll for DNA ekstraksjon

1. Flytende kultur ble overført til 1.5 ml eppendorfrør. Eppendorfrørene sentrifugeres ved 12 000 rpm i 5 minutter og supernatanten fjernes.
2. Pelleten ble resuspendert med 460 µl Solution K og lyseringen ble fullført ved å vende rørene opp og opp ned i ett minutt.
3. 3 µl RNase (10 mg/mL) ble tilsatt i løsningen, vortexes og inkuberes i 30 minutter ved 37 °C på en varmeblokk.
4. Løsningen ble tilsatt 40 µl Celite og inkubert ved rom temperatur i 15 minutter.
5. Løsningen ble sentrifugert ved 12 000 rpm i 1 minutt. Supernatanten ble fjernet og pellet resuspendert i 200 µl Solution K. Løsningen ble inkubert i 15 minutter ved

romtemperatur, for deretter å bli sentrifugert ved 12 000 rpm i 1 minutt. Supernatanten ble fjernet.

6. Det ble tilsatt 500 µl New wash buffer, sentrifugert ved 12 000 rpm i 1 minutt og supernatanten ble fjernet. Dette steget ble utført to ganger.
7. Pelleten ble vasket ved å forsiktig tilsette 500 µl 70 % etanol. Sentrifugert ved 13 000 rpm i 5 minutter. Etanolen ble fjernet og tørket ved 55 °C i 30 minutter på varmeblokk.
8. Den tørkede pelleten ble løst opp i 30 µl dH<sub>2</sub>O og inkubert ved 55 °C i 20 minutter på varmeblokk. Senere sentrifuger ved 12 000 rpm i 2 minutter. Supernatanten ble pipettert (vann + DNA) over i nye eppendorfrør og oppbevares i -20 °C.

### 3.8.1 Måling av DNA konsentrasjon

For å måle konsentrasjonen av ekstrahert DNA og RNA ble det brukt Qubit eller Nanodrop. Qubit kvantifiserer ved bruk av ulike fluoriserende fargestoff som binder spesifikt til DNA, RNA eller protein. På denne måten kan man for eksempel måle både RNA og DNA i samme prøve ved å sette opp to ulike reaksjoner. For å kvantifisere DNA konsentrasjonen gjennom Qubit benyttes kittet Qubit™ dsDNA HS Assay.

Nanodrop ble utført på Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Det er en spektrofotometrisk metode som måler DNA og RNA ved 260 nm/280 nm. For å måle konsentrasjonen ble det påsatt 1µl DNA/RNA løsning på spektrofotometeret. Absorbansmålingen vil ikke kunne skille mellom nukleinsyrer og andre molekyler i prøven som absorberer ved samme bølglengde. For å vurdere prøvens renhet vil forholdet mellom nukleinsyrens absorbansmaksimum (260 nm) og proteiners absorbansmaksimum (280 nm) undersøkes. En ratio på 1.8 er regnet for å være et rent DNA produkt og 2.0 for rent RNA, mens en lavere verdi vil indikere at prøven har en forurensning av protein. Prøvens renhetsgrad vil også bli analysert ved hensyn på forholdet mellom 260 og 230 nm, hvor absorbans ved 230 nm er en indikator på kontaminering for eksempel med thiocyanater. En ratio mellom 1,8 – 2,2 betegnet som et rent DNA produkt. Verdier over eller under dette vil kunne indikere at det er en tilstedeværelse av salter, fenol, karbohydrater eller proteiner i prøven (NanoDrop 2010).

Måling av DNA konsentrasjon med Qubit er å foretrekke på grunn av at den spesifikt farger DNA eller RNA og derfor mer nøyaktiv, men noe mer tidkrevende i forhold til NanoDrop som er raskt å utføre. Ulempen med Qubit er at man ikke får oppgitt prøvens grad av renhet.

### 3.9 PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode for å kunne oppamplifisere et isolert DNA fragment *in vitro*. Prosessen bak PCR består av tre trinn. Syklusen starter med en denaturering av dobbeltrådet DNA ved å øke temperaturen til 94 - 95 °C. I det andre trinnet vil primerene (enkeltrådede oliginukleotider) hybridisere til templatet når temperaturen senkes rundt 50 - 60 °C. Primerene består av kjente regioner som er komplementære til sekvensen på hver av de enkeltrådede DNA bitene. Når primeren er festet komplementært til templatet vil enzymet DNA polymerase fortsette elongeringen der primeren slutter ved å tilføre spesifikke nukleotider (dNTP) som er komplementære til templatsekvensen. Resultatet fra den første syklusen er to dobbeltrådede DNA. Denne syklusen repeteres vanligvis 25 - 30 ganger. For hver av syklusene vil mengden av nysyntetisert DNA dobler seg, slik at det øker eksponentielt (Mullis & Faloona 1987).

Det ble utført PCR på det genmaterialet som ble ekstrahert ovenfor i punkt 3.8. Det ble benyttet primerene som var spesifikke for ulike gener som kodet for reduktaseenzym i denitrifikasjonen. En primer for 16S ble også benyttet for stamme 104a for å bekrefte at det var en *Bradyrhizobium* ved å sekvensere genfragmentet man fikk av PCR (se også 3.11, 3.12 og 3.13). De primerne som ble benyttet i PCR er oppgitt i punkt 2.6.

**Tabell 3.1:** Kitten som ble benyttet var GoTaq® Flexi DNA polymerase fra Promega. Følgende PCR reaksjon ble blandet på is.

Reagens	Sluttkonsentrasjon/volum
5 µl 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer	1x
2 µl MgCl <sup>2+</sup> Solution 2.5mM	0.2 mM
2 µl dNTP 2 mM	0.16 mM
1 µl Primer (fremover og revers) (10 pmol/µl)	0.4 µM
0.2 µl Go Taq® DNA polymerase (5 U/µl)	0.04 U/µl
X µl Templat DNA	20-40 ng per 25 µl reaksjon
X µl dH <sub>2</sub> O	Til sluttkonsentrasjon 25 µl

**Tabell 3.2:** PCR-reaksjonen ble utført i en PCR maskin med følgende sykluser.

Trinn	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Initiell denaturering	95	2 min	1
Denaturering	95	0,5-1 min	} 25
Primerhybridisering	42-65*	0,5-1 min	
Elongering	72	1 kb/min	
Final extension	72	5 min	1
Midlertidig oppbevaring	4	∞	

\* Annealing temperaturen varierer avhengig av hvilket primerpar som brukes, ettersom smeltetemperaturen ( $T_m$ ) på primerene varierer.

### 3.10 ERIC-PCR

Enterobacterial repetitive intergenic consensus eller ERIC-PCR er en metode som ble benyttet for å kvalitetssikre gasskinetikksforsøkene for en eventuell kontaminering (Wilson & Sharp 2006). ERIC-PCR vil etter gelelektroforese gi hver stamme et unikt fingeravtrykk bestående av flere fragmentbånd i ulike størrelser. Ved å sammenlikne fingeravtrykkene ved starten og slutten av et forsøk kan man kontrollere at en kontaminering ikke har funnet sted. Om en kontaminering oppstår vil de kontaminerte cellenes genom også bli fremstilt i en ERIC-PCR, og det vil gi et annet fingeravtrykk enn fra tidligere resultater.

**Tabell 3.3:** Følgende reagenser ble blandet i et PCR rør.

Reagens	Konsentrasjon
5 µl 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer	1x
2 µl MgCl <sup>2+</sup>	25 mM
2 µl dNTP	2.5 mM
1 µl ERIC primer R1 og R2	50 µM
0.2 µl GoTaq® DNA polymerase (5U/µl)	0.04 U/µl
x µl ddH <sub>2</sub> O	Til sluttvolum 25 µl
x µl DNA	20-40 ng

**Tabell 3.4:** Parametere for ERIC-PCR.

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (min)	Antall sykluser
Initiell denaturering	95	7	1
Denaturering	94	1	} 35
Primerhybridisering	52	1	
Elongering	65	8	
Final extension	65	8	1
Midlertidig oppbevaring	4	∞	

### 3.11 Agarosegel-elektroforese

Elektroforese er en bevegelse av ioner og ladede makromolekyler gjennom et mediet når en elektrisk strøm er tilstede. Brønnene er plassert ved den negative polen på elektroforesekarer slik at DNA, som er negativt ladet, vil trekkes mot den positive polen. De store fragmentene vil få mer motstand i agarosegelen og bruker lengre tid på å gå gjennom gelen enn de korte fragmentene. DNA fragmentene separeres basert på størrelse, ladning og struktur.

Samtlige av PCR produktene som ble analysert i denne oppgaven ble separert i en elektroforese for å se om amplifikasjonen av genfragmentet var spesifikt. Resultatene fra agarosegel-elektroforesen vil vise om primerne som er benyttet er spesifikke for hver enkelt stamme. Dersom spesifiteten ikke er optimal vil det vises som flere uspesifikke bånd, fremfor ett sterkt og rent bånd som representerer genfragmentet for den aktuelle primeren. I de fall hvor gelen hviste flere bånd ble det båndet med riktig størrelse kuttet ut av gelen og rensset, se nærmere beskrivelse i punkt 2.13.

#### 2.3.3 Protokoll for 1 % agarosegel-elektroforese

1. Agarosegelen ble laget ved å tilsette 0.5 g Agarose UltraPure i 50 ml 1x TAE buffer. Løsningen ble varmet opp i en mikrobølgeovn inntil agarosen er løst opp.
2. Løsningen ble avkjølt rundt 60 °C og tilsatt ethidium bromide med en sluttkonsentrasjon på 0.5 µg/ml.
3. Løsningen ble overført til et støpekar hvor en kam er plassert. Når gelen størknet fjernes kammen og gelen ble plassert i et elektroforesekar dekket med 1xTAE buffer.
4. Brønnene ble tilsatt ladder og PCR produktene blandet med loading buffer.

5. PCR produktet ble separert i en elektroforese ved 70V i 40 minutter. Etter elektroforese ble gelen tatt ut av elektroforesekaret og plassert i en BIO-RAD Gel Doc XR system med UV-lys som synliggjør DNA fragmentene i gelen.

### **3.12 DNA ekstraksjon fra agarosegel**

For å ekstrahere et PCR produkt fra agarosegelen etter en gel-elektroforese ble Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System benyttet. Hensikten med denne metoden er å ekstrahere ønsket genfragment fra et uspesifikt PCR produkt med uønskede fragmenter tilstedet. I tillegg til å rense ut ett spesifikt genfragment vil denne metoden også fjerne eventuelle overflødige nukleotider og primere slik at produktet blir bedre egnet for sekvensering.

Gelen løses i en bindingsbuffer som inneholder guanin thiocyanat. Dette er et chaotrofe salt som vil få det negativt ladede DNAet til å binde seg til kolonnens positivt ladede silika-materialet. Deretter følger to vasketrinn med alkohol som fjerner kontaminering som salter og primere før DNAet elueres fra membranen med nukleasefritt vann.

#### **2.3.4 Protokoll for DNA-ekstraksjon fra agarosegel**

1. Gelbitene for det spesifikke genet ble kuttet ut med en skalpell og overført til et eppendorfrør. For hver 10 mg gel ble det tilsatt 10 µl Membrane Binding Solution.
2. Løsningen ble inkubert på varmeblokk med risting ved 55 °C i 10 minutter eller til gelbiten ble smeltet.
3. Løsningen vortexet og overført til SV Minicolumn plassert i ett oppsamlingsrør. Dette inkuberes i ett minutt før røret sentrifugeres ved 16 000 rpm i ett minutt.
4. Etter sentrifugeringen ble SV Minicolumn plassert i et nytt oppsamlingsrør og kolonnen ble vasket med 700 µl Membrane Wash Solution som på forhånd ble fortynnet med 95 % etanol. Sentrifuger i ett minutt ved 16 000 rpm.
5. Kolonnen ble plassert i et nytt oppsamlingsrør og tilsett 500 µl Membrane Wash Solution. Sentrifugert i 5 minutter ved 16 000 rpm.
6. Kolonnen ble tørket ved å sentrifugeres på maks styrke i ett minutt for å bli kvitt eventuelle rester av etanol.
7. Kolonnen ble overført til et eppendorfrør og tilsatt 50 µl nukleose fritt vann i kolben uten å komme i kontakt med filteret i kolonnen med pipettespissen. Dette ble inkubert i romtemperatur i ett minutt før det ble sentrifugert ved 16 000 rpm i ett minutt.

8. DNAet ble eluert ut i vannet og kolonnen kastet. Eppendorfrøret med det rensede DNA produktet ble oppbevart i fryseren ved -20 °C.

### 3.13 Sekvensering

Sekvensering er en metode for å bestemme nukleotidsekvensen i et DNA fragment. I denne oppgaven ble sekvenseringen utført på IKBM ved UMB og hos GATC-Biotech, Konstanz, Tyskland. Begge stedene baserer seg på den tradisjonelle Sanger-metoden som ble oppfunnet på slutten av 70-tallet av (Sanger et al. 1977). Prinsippet baserer seg på bruk av 2',3'-dideoksynukleotid trifosfat (ddNTP) som mangler en -OH gruppe på 3'-posisjon på 2'deoksyribosen. Under sekvensering blir templat og primer inkubert sammen med DNA polymerase, ddNTP og dNTP. Spesifikke primere hybridiserer til templatet slik at DNA polymerasen kan tilfeldig tilføre dNTP eller en ddNTP som er komplementære med templatsekvensen. Ved påsetting av en ddNTP kan det ikke dannes nye fosfordiesterbånd slik at oligonukleotidkjeden termineres. Når ddNTP blir tilført er tilfeldig slik at det vil dannes oligonukleotidkjeder i mange ulike lengder. Hver av de fire ulike ddNTP'ene (ddATP, ddTTP, ddCTP og ddGTP) har hver sin spesifikke fluoriserende farge. I sekvenseringsmaskinen vil fragmentene separeres gjennom kapillærrør og registres av en laser med tilhørende detektor. Analyse av sekvenseringsresultatene ble utført i BioEdit, som er et sekvenssammenstillingsprogram.

Sekvensering ble benyttet for å optimalisere og designe primere som senere ble benyttet i transkripsjonsanalysene. For å utføre en sekvensering ble først det ønskede genfragmentet oppamplifisert i en PCR med de primerene som ikke var spesifikke. PCR produktet ble så separert i en gelelektroforese slik at kun det spesifikke båndet, med den riktige størrelsen på genfragmentet, ble kuttet ut. DNAet ble så rensset ut av agarosegelen og sendt til sekvensering. Ut i fra den kjente sekvensen ble det designet egne primere som var identiske med endende på sekvensene. Sekvenseringen ble også benyttet for å ekskludere kontaminering fra en av stamme ved å benytte primere for genkoden 16S rRNA.

#### 2.3.5 Sekvenseringsinstrumentet ABI 3100 ved IKBM

I dette arbeidet ble BigDye® Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit benyttet. Terminatoren inneholder AmpliTaq® DNA Polymerase (merkebeskyttet Taq polymerase) og en blanding av dNTP og ddNTP. Sekvenseringsmaskinen, ABIprism® modell 3100, ble håndtert av kvalifisert laboratoriepersonell.



**Tabell 3.5:** Følgende reagens ble blandet i et PCR rør

Reagens	Konsentrasjon
2 µl BigDye Sequencing Terminator	
4 µl 5x BigDye Sequencing Buffer	1 x
x µl Primer	3.2 pmol/µl
x µl Templat	20 ng per reaksjon
x µl dH <sub>2</sub> O	Til sluttvolum 20µl

**Tabell 3.6:** PCR program

Trinn	Temperatur (°C)	Tid
Denaturering	96	30 sek
Primer hybridisering	50	15 sek
Elongering	60	4 min
Oppbevares	4	∞

### 2.3.6 Protokoll for felling av DNA

1. Sekvensreaksjonen (20 µl) ble overført til eppendorfrør og tilsatt 5 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3M Natrium acetat og 60 µl 96 % etanol. Løsningen ble inkubert i romtemperatur i 15 min.
2. Løsningen ble sentrifugert i 30 min ved 2000 x g og supernatanten ble fjernet.
3. Røret ble tilsatt 70 µl 70 % etanol og sentrifugert i 4 °C ved 1650 x g i 15 minutter.
4. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble tørket i romtemperatur.

### 2.3.7 GATC Biotech

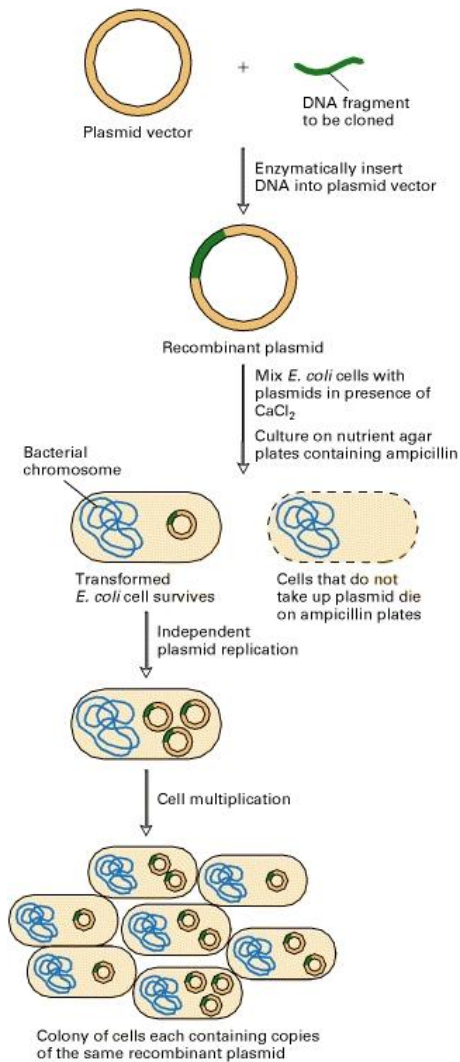
Det ble forberedt en løsning med PCR produkt, primer og dH<sub>2</sub>O til sluttvolum 10µl i et eppendorfrør. Løsningen ble sendt til GATC Biotech, Tyskland.

**Tabell 3.7:** Tilsatt mengde og konsentrasjon for de ulike komponentene som ble forhåndsblandet i et eppendorfrør før prøvene ble sendt til sekvensering ved GATC-biotec.

Reagens	Sluttkonsentrasjon/volum
Templat (PCR produkt)	10 – 20 ng/µl
Primer (fremover eller revers)	2.5 µM
dH <sub>2</sub> O	Til sluttvolum 10 µl

### 3.14 TOPO kloning

The Original TA Cloning® Kit pCR®2.1 vector fra Invitrogen ble benyttet for å multiplisere et spesifikt DNA fragment ved å ligere det inn i et plasmid og transformere det resulterende plasmidet inn i kompetente *Escherichia coli* celler. DNA fragmentene som ble benyttet var



**Figur3.3:** Forklarende figur av ligeringen og transformasjonen av plasmidet inn i kompetente *E. coli* celler (Lodish et al. 2000).

Gal og IPTG. Samtlige av de kompetente cellene som ble benyttet har en lac repressor ( $\text{lacI}^q$ ) som vil undertrykke transkripsjonen fra lac promotoren. IPTG er et molekyl som vil binde lac repressoren slik at transkripsjonen av lac operonet kan utføres for de transformerte cellene. For de cellene der limering i plasmidet var vellykket ble genet ligert inn i  $\text{lacZ}\alpha$  som hindrer transkripsjonen av  $\beta$ -galaktosidase slik at X-Gal ikke hydrolyserer og cellene vises som hvite kolonier på agar tilsatt X-Gal. For de cellene der limeringen ikke forekom har cellene et

oppamplifisert av denitrifikasjonsprimere. Plasmidet ble senere benyttet til å konstruere standardkurver i Real Time PCR under transkripsjonsanalysene. Plasmidet som ble benyttet består av tre elementer: et kloningssete i lacZ operonet hvor det ønskede DNA fragmentet kan settes inn, et gen som koder for antibiotikaresistens og et replikasjonssete. For å kunne ligere et PCR fragmentet inn i et plasmid må man bruke Taq polymerase som fester en enkel dATP til de to 3' endene på PCR fragmentet. Et restriksjonsenzym kløyver plasmidet ved kloningssetet slik at den komplementære dTTP 3' enden i kloningssete på plasmidet åpnes. De komplementære A-T nukleotidene tillater PCR fragmentet å hybridisere med plasmidet mens enzymet ligase vil ligere A-T endene. Etter limeringen ble plasmidene transformert inn i kompetente celler som kan ta opp ekstracellulært DNA. Etter transformasjonen ble cellene spredt på petriskåler med LB agar tilsatt antibiotika. Ved bruk av antibiotika selekterer man for de bakteriene som har et plasmid med et gen som koder for antibiotikaresistens. Overflaten til petriskålene ble tilsatt X-

funksjonelt  $\beta$ -galaktosidase som spalter X-Gal og danner 5-Bromo-4-klor-indoxyl som vil gi kolonien en blå farge. De hvite koloniene blir valgt ut og overført til flytende LB medium.

For nærmere beskrivelse se 3.9, 3.11, 3.12 og 3.13.

### 3.14.1 Ligeringsreaksjon

**Tabell 3.8:** Følgende ligeringsreaksjon ble blandet i et PCR rør.

Reagens	Sluttkonsentrasjon/volum
0.5 $\mu$ l og 2 $\mu$ l Nyrenset PCR product	0.85-3.4 $\mu$ g/ml
1 $\mu$ l 10x ligeringsbuffer	1x
2 $\mu$ l pCR@2.1 vector 25 ng/ $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
1 $\mu$ l T4 DNA ligase 4 Weiss Units	0.4 Weiss Units
Sterilt vann	Til sluttvolum 10 $\mu$ l

Ligeringsreaksjonen ble inkubert ved 14 °C i PCR maskin over natten.

### 3.14.2 Protokoll for transformasjon av kompetente celler

1. 2  $\mu$ l av ligeringsreaksjonen ble overført til kompetente celler og blandet ved å røre med pipettespissen. Løsningen ble inkubert på is i 30 min.
2. Cellene ble varmebehandlet i 30 sek ved 42 °C og rørene ble direkte overført på is.
3. Løsningen ble tilsatt 250  $\mu$ l romtemperert SOC medium og plassert i en risteinkubator ved 37 °C i en time.
4. Løsningene ble spredt utover en petriskål med LB agar. Før platespredningen ble agaren tilsatt X-Gal, IPTG og 100  $\mu$ g/ml Ampicillin.
5. Petriskålene ble inkubert overnatt ved 37 °C.
6. Etter inkuberingen ble 10 hvite kolonier overført til glassrør med LB-medium tilsatt 100  $\mu$ l Ampicillin.

### 3.15 Transkripsjonsanalysene

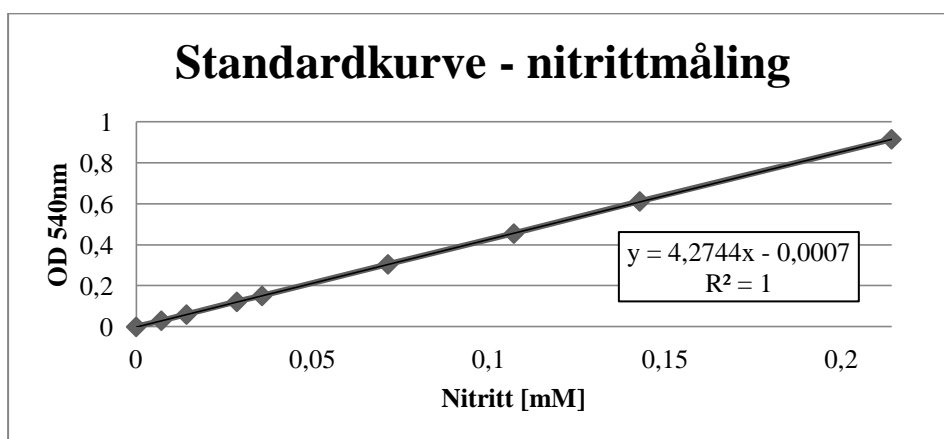
Transkripsjonsanalyse er en metode for å kvantifisere genuttrykk med hensyn på mRNA. I dette forsøket ble utført transkripsjonsanalyser for å kvantifisere genene som koder for denitrifikasjonsreduktaser. Ettersom transkripsjonen av genene vil starte før gassproduksjon av NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub> vises må man starte ekstrahering av celler før dette. Resultat fra tidligere

gasskinetikk målinger gir en indikasjon på når man forventer at de ulike gassene knyttet til denitrifikasjon starter.

Inokulumet ble dyrket opp som beskrevet i punkt 3.3. Det ble overført 1 ml av celler med 0.2 OD<sub>420</sub> inokulum i autoklaverte medisinflasker med 50 ml YMB medium med tilsatt 2mM KNO<sub>3</sub> og 2 % oksygen. Under gasskinetikkmåling i det semiautomatiske inkuberingsystemet ble det tatt ut flakser i triplikat ved ulike tidspunkt. I disse flaskene ble det i tillegg tatt ut 1 ml som gikk til måling av OD og nitritt. Det resterende flaskeinnholdet ble sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter. Supernatanten ble kastet og pelleten resuspendert i 500 µl RNAprotect Bacteria Reagent fra Qiagen og overføres til et RNase free 1,5ml rør. Løsningen ble oppbevart i -20 °C inntil videre behandling. Det er viktig å fryse ned cellene så fort som mulig for å unngå en degradering av mRNA.

### 3.16 Nitrittmåling

For å måle eventuell tilstedeværelse av nitritt ble det tatt ut prøver fra hver av de tre replikatene. 100 µl av hver kultur ble overført til et 15 ml blåkorkrør sammen med 400 µl fargereagens og 9.5 ml H<sub>2</sub>O. Løsningen ble inkubert mørkt i 15 minutter. Ved tilstedeværelse av nitritt ble det utløst en fargereaksjon slik at løsningen ble rosa. Konsentrasjonen av rosafargen ble analysert i et spektrofotometer med OD<sub>540</sub>. Før prøvene ble målt ble det laget en standardkurve for å kunne bestemme konsentrasjonen av prøvene (se figur 4).



Figur 3.4: Standardkurve som ble benyttet for måling av nitritt

### 3.17 Ekstraksjon av mRNA

Det ble benyttet både mekanisk lysering og enzymatisk lysering for å isolere mRNA. Fordelen med den sistnevnte metoden er at prosedyren ikke inneholder like mange steg, i

motsetning til den mekaniske lyseringen. Utover selve lyseringssteget ble prøvene behandlet likt. Under arbeid med ekstraksjon av mRNA er det viktig å arbeide svært sterilt og unngå at genmaterielet blir eksponert for RNase. For å deaktivere RNase som finnes rundt om i omgivelsene og forhindre en degradering av mRNA ble det tatt visse forhåndsregler. Sterilbenk samt utstyr og hansker som ble benyttet i denne ekstraksjonen ble vakset med RNase Zap før arbeidet begynte.

Etter at celler og RNAProtect Bacteria Reagent er tint sentrifugeres eppendorfrørene i 5 minutter ved 13 000 rpm. Supernatanten helles av slik at kun bakteriepelleten gjenstår. Pelleten behandles som beskrevet i punkt 3.17.1 og 3.17.2.

### **3.17.1 Protokoll for ekstraksjon av nukleinsyrer – mekanisk lysering**

1. For hver av prøvene ble det tilsatt 500 µl fenol-kloroform-isoamyl alkohol (25:24:1) og 500 µl CTAB ekstraksjonsbuffer, løsningen blandes godt.
2. Hele innholdet ble overført til mikrosentrifugerør som inneholdt 0.65 g sterile glassperler (0.1 mm).
3. Lysere cellene ble utført i en FastPrep 3 x 30 sekunder. Mellom kjøringene ble mikrosentrifugerørene avkjølt på is.
4. Mikrosentrifugerørene ble sentrifugert 16 000 x g i 5 minutter ved 4 °C.
5. Den øverste fasen (ca 350 µl) ble overført til et RNase free 1.5ml eppendorfrør som ble oppbevart is. Tilsvarende mengde kloroform-isoamyl alkohol (24:1) ble tilsatt og blandet ved å vende rørene opp ned.
6. Rørene ble sentrifugert 16 000 x g i 5 minutter ved 4 °C.  
Den øverste fasen (uten å få med interfasen) ble overført til et nytt RNase free 1.5ml rør. Løsningen ble tatt med videre til punkt 3.17.3.

### **3.17.2 Protokoll for ekstraksjon av nukleinsyrer – enzymatisk lysering**

1. Pelleten ble tilsatt 200 µl TE buffer som inneholder 1mg/ml lysozyme og vortexet i 10 s. Løsningen ble inkubert i en risteinkubator, romtemperert, i 5 minutter.
2. Etter inkubering ble løsningen tilsatt 700 µl RTL buffer, som på forhånd var tilsatt 10 µl β-mercaptoetanol per 1 ml buffer RTL. Løsningen ble vortexet og ved en tilstedeværelse av partikler ble løsningen sentrifuger for å danne en pellet. Gå videre med supernatanten.
3. Supernatanten ble tilsatt 500 µl 96 % etanol og blandet ved å pipettere opp og ned. Løsningen ble tatt med videre til punkt 3.17.3.

### 3.17.3 Protokoll for rensing av totalt RNA fra lyserte bakterieceller

For å renses RNA'et for eventuell genomisk DNA ble det benyttet RNeasy MinElute spin column fra Qiagen.

1. Løsningen fra punkt 3.17.1 og 3.17.2 ble tilsatt 350 µl bufferen RTL og vortexet.
2. 250 µl 96 % etanol ble tilsatt og blandet ved å pipettere sakte opp og ned.
3. Hele innholdet (ca 700µl) ble overført til en MinElute spin kolonne som er satt i et 2 ml oppsamlingsrør. Kolonnen ble sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm. Restene i oppsmalingsrøret helles ut.
4. 500 µl buffer RPE ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm. Restene i oppsmalingsrøret helles ut.
5. 500 µl buffer RPE ble tilsatt kolonnen og sentrifuger i 2 minutter ved 10 000 rpm. Restene i oppsmalingsrøret helles ut.
6. For å fjerne eventuelle rester ble kolonnen sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 rpm.
7. Kolonnen ble overført til et 1.5 ml oppsamlingsrør og tilsatt 30 µl RNase fritt vann i midten av kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 rpm for å eluere ut RNA'et.

### 3.17.4 Fjerning av genomisk DNA

For å fjerne en eventuell tilstedeværelse av DNA i mRNA ekstraksjonen ble det benyttet et Deoxyribonuclease I (Amplification grade kit fra Sigma) for å degradere DNA. Dette er for at ikke DNA skal gi en falsk positiv ved kvantifisering av cDNA under bruk av RT-PCR i senere analyser.

#### 3.17.4.1 Protokoll for fjerning av genomisk DNA

1. 16 µl av de ekstraherte nukleinsyrene fra punkt 3.17.3 ble overført til et RNase free 0.2 ml PCR rør.
2. PCR røret ble tilsatt 2 µl DNase I (1 U/µl) og 2 µl 10x reaksjons buffer blandet og inkubert ved romtemperatur i 2 timer. Sigma anbefaler en inkuberingsperioden på 15 minutter, noe som ikke er optimalt for en fullstendig fordøyelse av DNA'et. Inkuberingsperioden er derfor blitt forlenget til to timer for at mer DNA skal bli degradert.

- Etter inkuberings tiden ble løsningen tilsatt 2  $\mu$ l Stop Solution og inkubert i 10 minutter ved 70 °C i PCR maskin. Temperaturøkningen vil føre til at DNasen deaktiveres.

### 3.17.5 Revers transkripsjon

For at det ekstraherte RNA produktet skal kunne brukes til videre analyse i Real Time-PCR ble det transkribert til cDNA gjennom revers transkriptase. Mastermiksen som ble brukt var High Capacity RNA-to-cDNA Master mix fra Applied Biosystems som består av revers transkriptase, rekombinant RNase inhibitor protein, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, stabilisator og tilfeldige primere.

**Tabell 3.9:** Prosedyre for revers transkripsjon

Reagens	Konsentrasjon/sluttvolum
Master miks	1 X
RNA	10 pg – 1 $\mu$ g
RNase fritt vann	Til sluttvolum 20 $\mu$ l

**Tabell 3.10:** PCR program for revers transkripsjon

Trinn	Temperatur	Tid
	25 °C	5 min
Annealing	42 °C	30 min
Elongering	85 °C	5 min
Midlertidig oppbevaring	4 °C	$\infty$

Kvantifisering av RNA og cDNA ble foretatt ved å bruke Qubit, se punkt 3.8.1.

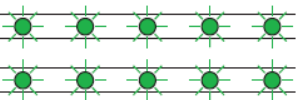
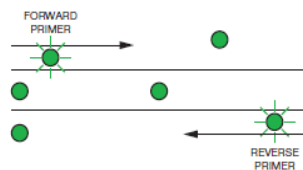
### 3.17.6 Real Time PCR

Til dette forsøket ble det benyttet Power SYBR® Green PCR Master Mix (5 ml) fra Applied Biosystems. RT-PCR utføres av Applied Biosystems OneStep Plus™ Real Time PCR maskin med programmet OneStep Plus.

Real Time PCR har samme prinsippet som en vanlig PCR reaksjon, men ved bruk av Real Time PCR kan man følge dataene under selve amplifikasjonen. Måten å kunne følge den

eksponentielle amplifikasjonsfasen er å benytte seg av fluoriserende farge som markerer PCR fragmenter. Man kan så beregne konsentrasjonen av cDNAet ved å sammenlikne antall amplifikasjonssykluser med et spesifikt fluoresens nivå terskel. Antall sykluser som kreves for å nå denne spesifikke terskelen kalles for en CT-verdi. For å kalkulere denne terskelen benyttes ulike dataprogram. Til hver kjøring benyttes en standardkurve med kjent DNA konsentrasjon som estimerer kopitall og PCRens effektivitet (Kubista et al. 2006). For å utføre en Real Time PCR ble det laget en standardkurve ut i fra kjent konsentrasjon av plasmidene som ble konstruert i punkt 3.14. Plasmidet som ble benyttet hadde en kjent konsentrasjon og standarden ble fortynnet i åtte prøver fra 1.0E08 til 1.0E01 med kjent konsentrasjon brukes for å kalibrere en standardkurve på en semi-logaritmisk skala.

Real time PCR ble i denne oppgaven utført ved å bruke SYBR Green. SYBR Green er en fluoriserende fargestoff som binder dobbeltrådet DNA. Ved bestråling av lys med en spesifikk bølgelengde vil dette føre til at fargen fluoriserer (Mackay et al. 2002). Jo større mengde DNA som blir amplifisert, jo sterkere blir det fluoriserende signalet.



**Steg 1:** SYBR Green fargen gir et fluoriserende signal når den binder seg til dobbeltrådet DNA.

**Steg 2:** Når temperaturen stiger denaturerer DNA til enkeltrådet DNA. Dette fører til at fargen frigjøres i løsningen og signalet reduseres.

**Steg 3:** Når temperaturen reduseres binder primerne seg til hver sin enkeltrådet DNA tråd og de elongeres.

**Steg 4:** SYBR Green bindes igjen til det dobbeltrådede DNA produktet. En PCR syklus har nå økt mengden DNA og styrken på det fluoriserende signalet har økt.

**Figur 3.5:** Real time PCR ved bruk av SYBR Green reagensens funksjon. Bilde er tatt fra brukermanualen til AB Real Time PCR maskin

Ulempen med SYBR Green er at fargen ikke er spesifikt for PCR produktet og vil binde all dobbeltrådet DNA og kan derfor risikere å gi et falskt positivt resultat ved å binde uspesifikt PCR produkt eller genomisk DNA som skulle vært degradert. Dette er en svært sensitiv metode som ikke binder spesifikt som en probe ville gjort. For å detektere amplifikasjon med SYBR green er det viktig å kjøre en smeltekurve etter Real Time PCR. Etersom SYBR green



vil binde all uspesifikt dsDNA å kjøre en smeltekurve etter reaksjonssyklusene ved å øke temperatur og måler signalet. Når temperaturen øker vil dsDNA denaturere til ssDNA og det fluorescerende signalet fra SYBR green avtar, om reaksjonen er spesifikk vil reduksjonen av signalene vil skje gradvis. Signalet avtar over et større temperatur-området enn hvor den egentlige smeltetemperaturen skal detekteres. For å detektere smeltetemperaturen benyttes et dataprogram som kalkulerer derivasjonen og vise vendepunktet i smeltekurven. Vendepunktet er det tidspunktet hvor 50 % av det dsDNAet er blitt degradert til ssDNA og den vil vises som en topp. En enkel topp representerer ett produkt, men dersom det detekteres flere topper vil det indikere at det er flere produkter tilstede i reaksjonen, som forurensning av genomisk DNA eller primer dimer. SYBR green er en av de minst kostbare metodene man kan bruke for å detektere i Real Time PCR, i motsetning til bruk av TaqMan hvor det er en tredje primer som er merket med et fargestoff og en quencher. I stedet for å benytte seg av en standardkurve til kvantifisering av genekspressjon kan det også benyttes interne standarder, som 16S rRNA, for å gi en relativ kvantifisering under Real Time PCR. Man antar at 16S rRNA uttrykkes ved samme nivå i alle bakterieceller slik at genuttrykkelsen i prøvene kan relateres til denne målingen. Tidligere Real Time PCR forsøk ved bruk av interne standarder viste å ha et ujevnt ekspressionsnivå av 16S rRNA og det ble med at det var bedre å beregne en absolutt kvantifisering ved bruk av standardkurver (Bergaust et al. 2008).

**Tabell 3.11:** Følgende reaksjon for Real Time PCR ble blandet på is i PCR rør.

<b>Reagens</b>	<b>Konsentrasjon/sluttvolum</b>
Power SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix	1x
Primer 1	50-300 nM
Primer 2	50.300 nM
Templat	1-100 ng
dH <sub>2</sub> O	Til sluttvolum 20µl

PCR rørene ble plassert i en One Step Plus Real Time PCR maskin fra Applied Biosystems med følgende sykluser:

**Tabell 3.12:** Program for kjøring av Real Time PCR

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Tid</b>	<b>Antall sykluser</b>
Initiell denaturering	95	10 min	1
Denaturering	95	30 sek	} 40
Primerhybridisering	53	30 sek	
Elongering	72	1 min	
Final extension	82	20 sek	
	95	15 sek	
Smeltekurve	60	1 min	
	95	15 min	

Resultatene fra Real time PCR ble analysert av programvaren Step One Plus. Kopinumrene ble deretter beregnet til kopier per ng RNA ved å forvente at all RNA ble konvertert til cDNA under revers transkripsjon. Det er tidligere blitt estimert at en celle inneholder 1 pg RNA, noe som tilsvarer 10 000 celler per ng RNA. For å konvertere kopinummer fra ng RNA til RNA kopier per celle ble kopier per ng RNA delt på 10 000 (Bergaust et al. 2010).

## 4. RESULTATER

### 4.1 Sluttpunktanalyse

Det ble utført en sluttpunktanalyse for å få en generell oversikt over de ulike *Bradyrhizobium* stammenes siste reduksjonstrinn, med hensyn på denitrifikasjon. Resultatene fra sluttpunktanalysen (Tabell 4.1) viser hvor mange prosent av det tilsatte nitrattet som ble redusert til NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>.

Under inkuberingen av sluttpunktanalysene ble det kun målt gass to ganger, og på bakgrunn av dette kan ikke resultatene justeres for en eventuell kontaminering fra inokuleringen av stammene eller en eventuell lekkasje fra luften (som inneholder 79 % N<sub>2</sub>) under inkuberingsperioden. På grunn av dette kan gassproduksjonen for, spesielt N<sub>2</sub>, være noe overrepresentert i de flaskene der en lekkasje fant sted. Dette kan være forklaringen til målingene som overskrider 100 % konvertert nitrat til N<sub>2</sub>. De stammene med NO som sluttprodukt viser en lav prosentverdi av produsert N<sub>2</sub> (mellom 5 – 7 %), dette kan man ikke utelukke skyldes en lekkasje fra luften.

Sluttpunktanalysen viser at ti av de totalt 39 stammene utførte en fullstendig denitrifikasjon, hvor all nitrattet i mediet (4 mM) ble redusert til N<sub>2</sub>. I tillegg var det syv stammer som reduserte mellom 60-90 % av nitrattet til N<sub>2</sub>. De resterende stammene hadde lite eller ingen produksjon av N<sub>2</sub>, men viste andre sluttprodukt som NO og N<sub>2</sub>O. Det var til sammen fire stammer som viste N<sub>2</sub>O som sluttprodukt. Det er totalt syv stammer som viser NO produksjon med en prosentverdi mellom 0.25 - 0.61 %, som tilsvarer mellom 0.5 – 1 µmol NO per flaske. For disse stammene vises en minimal økning av CO<sub>2</sub> produksjon mellom uke en og uke to. Dette kan tyde på at NO konsentrasjonen har inhibert en videre vekst av cellene, eller at stammene ikke har det aktive reduktaseenzymer som kreves for å fortsette reduksjonen av NO. Ved disse tilfellene vil NO bli oppført som et sluttprodukt.

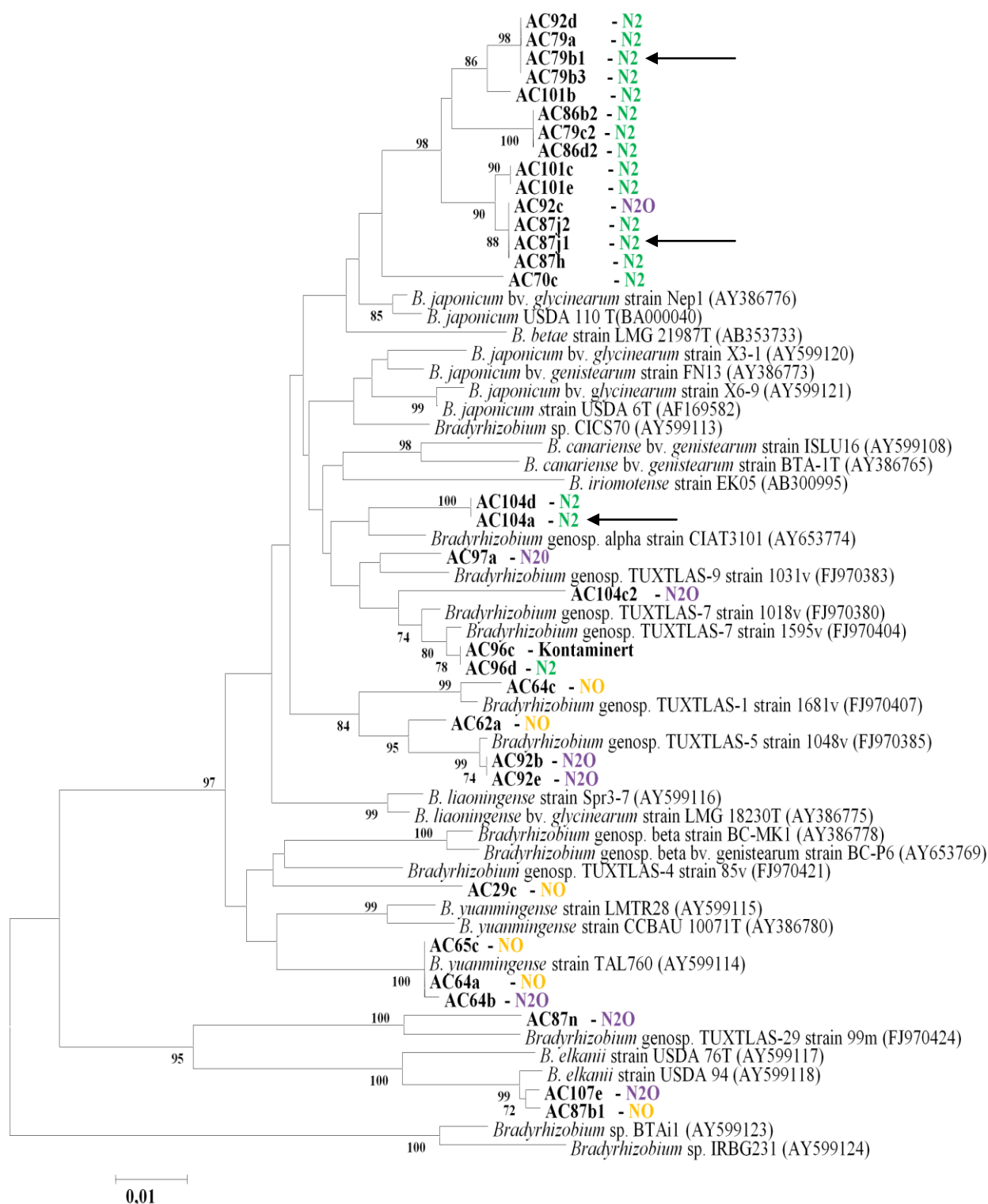
**Tabell 4.1:** Resultater fra sluttpunktanalyse for de 39 *Bradyrhizobium* stammene dyrket i YMB tilsatt 4 mM KNO<sub>3</sub>. De stammene med fullstendig reduksjon til enten N<sub>2</sub>O eller N<sub>2</sub> er merket med lilla. De med en N<sub>2</sub> og N<sub>2</sub>O reduksjon mellom 60-90 % er merket i en lyse lilla, mens de stammene med 0.5-1 µmol NO per flaske fremheves i blått.

Nr.	Stamme	NO %	N <sub>2</sub> O %	N <sub>2</sub> %
1	29c	0.45	22.88	6.80
2	62a	0.50	4.59	6.12
3	64a	0.61	3.62	9.05
4	64b	0.00	96.51	32.90
5	64c	0.25	0.40	4.64
6	65c	0.60	5.57	6.22
7	70c	0.00	0.00	101.51
8	79a	0.00	0.00	76.31
9	79b1	0.00	0.00	67.58
10	79b3	0.00	0.00	62.17
11	79c2	0.00	0.00	85.73
12	86b2	0.00	0.00	90.20
13	86d2	0.00	0.00	80.56
14	87b1	0.16	0.15	6.18
15	87b3	0.15	0.16	6.32
16	87h	0.00	0.00	103.68
17	87j1	0.00	0.00	113.65
18	87j2	0.00	0.00	96.65
19	87L	0.01	0.00	8.27
20	87m	0.00	65.69	5.46
21	87n	0.00	63.51	5.96
22	92b	0.00	140.91	5.55
23	92c	0.00	0.50	7.05
24	92d	0.00	0.51	56.77
25	92e	0.00	0.52	5.47
28	96d	0.00	0.06	106.16
29	97a	0.00	0.54	6.42
30	101b	0.00	0.08	101.70
31	101c	0.00	0.02	102.37
32	101e	0.00	0.00	104.14
33	104a	0.00	0.00	102.74
34	104b	0.00	0.55	101.48
35	104c1	0.01	0.56	4.77
36	104c2	0.00	0.57	12.98
37	104d	0.00	0.58	89.05
38	107a	0.00	0.59	5.74
39	107e	0.00	0.60	6.82

Resultatene fra gassmålingene i tabell 4.1 ble ført inn i et fylogenetisk tre (Figur 4.1) konstruert av T. Degefu (artikkel under arbeid) hvor stammene tidligere var blitt fylogenetisk inndelt på bakgrunn av glutamin syntetase II.

Sluttpunktene i det fylogenetiske treet viste regioner med fullstendig denitrifikasjon og steder hvor det er en trunkert denitrifikasjon. Spesielt det øverste klusteret, i nærheten av *B. japonicum*, utmerker seg ved å redusere all nitrat til N<sub>2</sub> (med unntak av 92c). Utenom dette viser resultatene varierende regioner med NO, N<sub>2</sub>O eller N<sub>2</sub> produksjon.

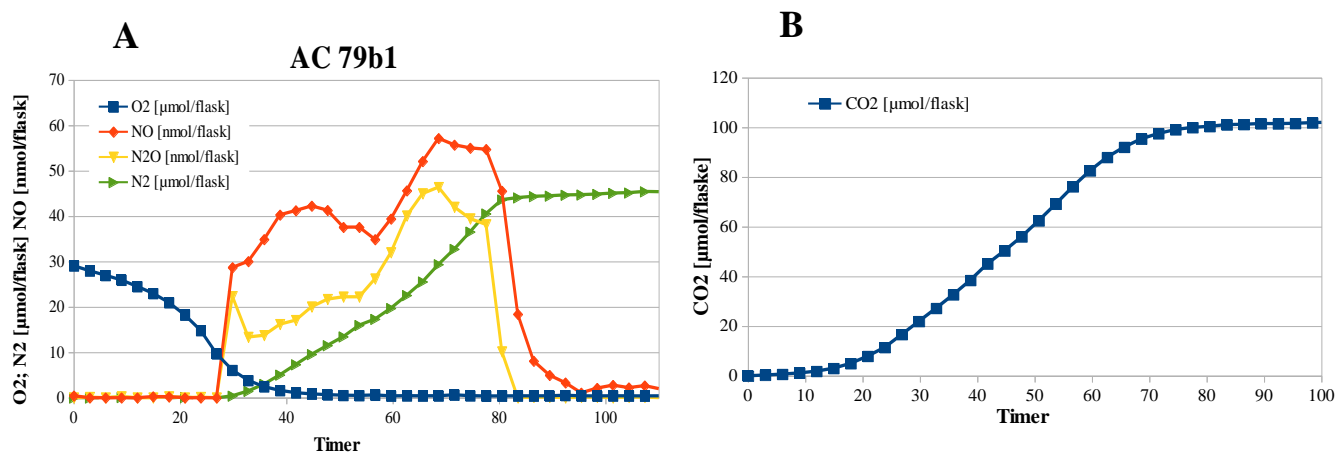
På bakgrunn av disse resultatene ble det plukket ut tre stammer som viste en fullstendig reduksjon til N<sub>2</sub> samtidig som de viste en viss avstand mellom hverandre i det fylogenetiske treet.



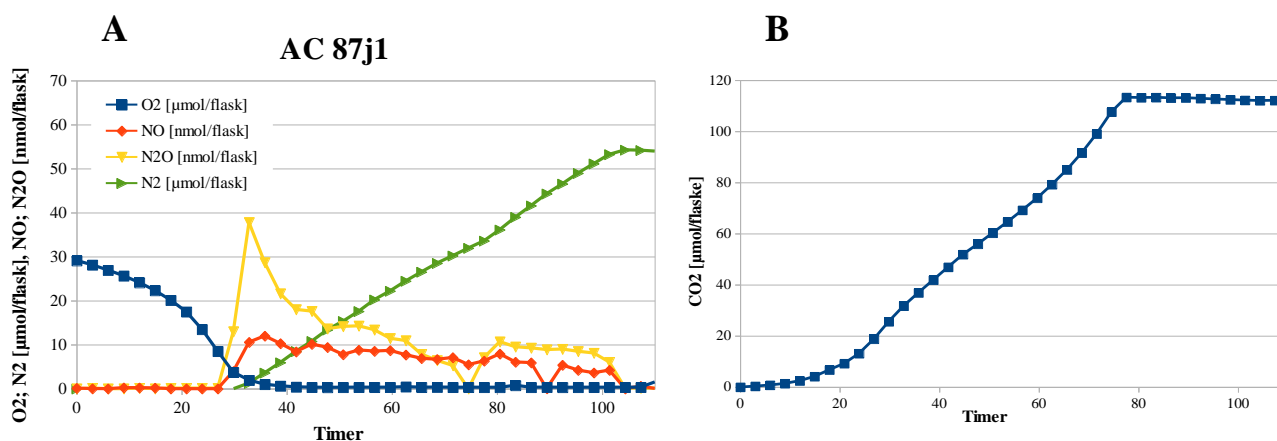
**Figur 4.1:** Oversikt over *Bradyrhizobium* stammer i et fylogenetiske tre basert på Glutamin syntetase II. Resultatene for sluttpunktanalysen ble tilført hos den aktuelle stammen. NO er gul, N<sub>2</sub>O vises i lilla, mens N<sub>2</sub> vises i grønt. De stammene som ble undersøkt videre er utpekt med en pil.

## 4.2 Analyser av gasskinetikk

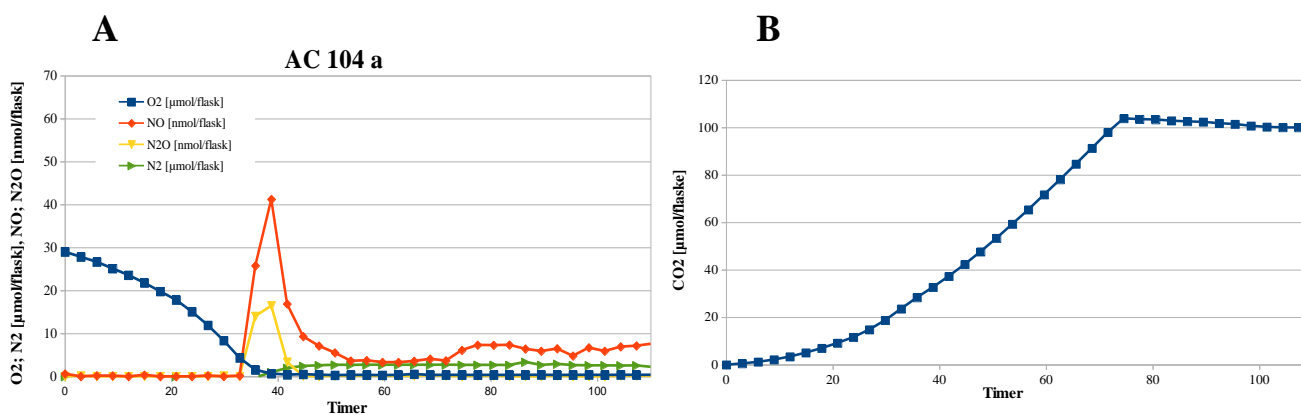
Som et første ledd i å beskrive DRP ble de tre utvalgte stammene studert med hensyn på gasskinetikk for å kartlegge denitrifikasjonsmønstrene av produsert NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>. Stammene ble inokulert i medisinflasker tilsatt YMB medie med 2mM KNO<sub>3</sub> og 1 % oksygen. Gasskinetikken ble målt kontinuerlig fra starten av inokuleringen i et semiautomatisk inkuberingsystem, inntil nitraten ble brukt opp og N<sub>2</sub> produksjonen stoppet opp. Figurene nedenfor viser et representativt eksempel fra hver av stamme. Figurene som vises baserer seg på gasskinetikkmålinger som ble utført i to forsøk med tre replikater for hver av stammene.



**Figur 4.2:** Oversikt over gasskinetikk for stamme 79b1 inokulert i medisinflasker tilsatt YMB med 2mM KNO<sub>3</sub> og 1 % oksygen. Figur (A) viser en oversikt over produsert O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> [μmol/flaske] og NO, N<sub>2</sub>O [nmol/flaske] over 120 timer. Figur (B) viser produsert CO<sub>2</sub> [μmol/flaske] over den samme tidsperioden.



**Figur 4.3:** Oversikt over gasskinetikk for stamme 87j1 inokulert i medisinflasker tilsatt YMB med 2mM KNO<sub>3</sub> og 1 % oksygen. Figur (A) viser en oversikt over produsert O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> [μmol/flaske] og NO, N<sub>2</sub>O [nmol/flaske] over 120 timer. Figuren (B) viser produsert CO<sub>2</sub> [μmol/flaske] over den samme tidsperioden.



**Figur 4.4:** Oversikt over gasskinetikk for stamme 104a inokulert i medisinflasker tilsatt YMB med 2mM KNO<sub>3</sub> og 1 % oksygen. Figur (A) viser en oversikt over produsert O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> [μmol/flaske] og NO, N<sub>2</sub>O [nmol/flaske] over 120 timer. Figur (B) viser produsert CO<sub>2</sub> [μmol/flaske] over den samme tidsperioden.

Gasskinetikken for stammene 79b1 og 87j1 viser store likheter med hensyn på denitrifikasjonsmønsteret. De har begge en fullstendig reduksjon av 2 mM KNO<sub>3</sub> til rundt 50 μmol N<sub>2</sub> per flaske. Både stammene 79b1 og 87j1 startet produksjon av NO og N<sub>2</sub>O når det er rundt 5.5 μmol oksygen igjen i flaskene. Stammene hadde en nettoproduksjon av NO og N<sub>2</sub>O i nmol skala over en lang periode (rundt 60 timer) inntil all nitraten ble brukt opp. I motsetning til stamme 87j1 viser stamme 79b1 ofte to topper for både NO og N<sub>2</sub>O, dette er blitt påvist i tre replikat ved flere gasskinetikkforsøk.

Stamme 104a viser et annerledes denitrifikasjonsmønster enn hva som var forventet med hensyn på tidligere resultat fra sluttpunktanalysen. I motsetning til 79b1 og 87j1, som har en fullstendig reduksjon til N<sub>2</sub>, viser 104a en veldig lav produksjon hvor kun 6-8 % av nitraten ble redusert til N<sub>2</sub>. I den anoksiske fasen viser stamme 104a en NO og N<sub>2</sub>O produksjon over en kortere periode (rundt 10-14 timer) enn hva som er blitt registrert hos 79b1 og 87j1. På tross av den korte gassproduksjonsperioden hos 104a viser den en tilsvarende lang CO<sub>2</sub> kurve som hos de to andre stammene, selv etter at NO og N<sub>2</sub>O produksjonen har avtatt. CO<sub>2</sub> kurven for 104a kan derfor indikere at det skjer noe annet enn denitrifikasjon som ikke blir registrert i det semiautomatiske inkuberingsystemet.

Tabell 4.2 viser det samme gasskinetikkforsøket som ble vist ovenfor, men inkluderer verdiene fra samtlige av de tre replikatene. Tabellen viser maksimal gassproduksjon av NO og N<sub>2</sub>O, samt hvor mye oksygen som var tilstedet i flaskene da produksjonen av disse gassene



startet. For disse verdiene ble det også oppgitt en variasjonskoeffisient (CV) som viser ratioen mellom standardavviket og gjennomsnittet fra de tre replikatene.

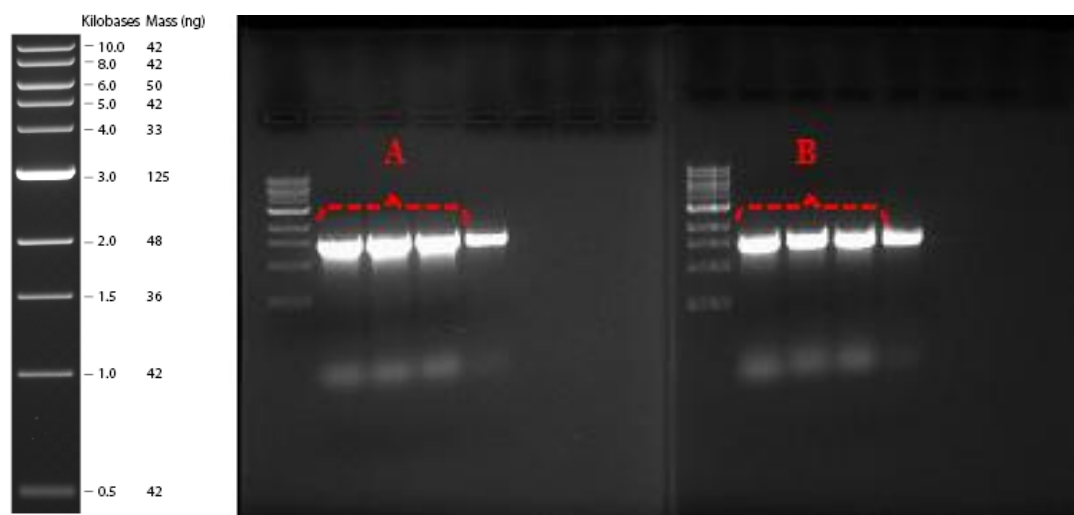
Stamme 104a replikat nr. 3 (Tabell 4.2) viser en mye høyere produksjon av NO og N<sub>2</sub>O enn hva de to andre replikatene viser. På tross av de høye konsentrasjonene i replikat nr. 3 reduseres gassene etter 17 timer, sammenliknet med replikat nr. 1 og 2 som reduserer NO og N<sub>2</sub>O etter 13 timer.

**Tabell 4.2:** Oversikt over gasskinetikk for stamme 97b1, 87j1 og 104a. Hver stamme hadde tre replikater som er merket med nr. 1, 2 og 3. Tabellen viser oversikt over maksimalverdi for produsert NO og N<sub>2</sub>O, samt oksygenkonsentrasjon ved første påvisning av NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>. Under hver av stammenes målinger er det utregnet en variasjonskoeffisient (CV).

	Maksimal verdi av mellomprodukt		O <sub>2</sub> konsentrasjon ved første påvisning av:		
	nmol/flaske		µmol/flaske		
	NO	N <sub>2</sub> O	NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>
97b1-1	35.3	39.5	9.2	9.2	2.3
97b1-2	53.8	24.0	4.5	4.5	2.2
97b1-3	57.2	46.4	6.0	6.0	2.4
CV 97b1	0.24	0.31	0.36	0.36	0.04
87j1-1	12.0	37.8	3.7	3.7	1.1
87j1-2	12.5	61.3	5.1	5.1	1.6
87j1-3	12.1	29.1	5.4	5.4	0.9
CV 87j1	0.02	0.39	0.20	0.20	0.30
104a-1	41.2	16.5	1.5	1.5	0.4
104a-2	34.6	17.1	1.1	1.1	0.4
104a-3	1595.1	1635.8	2.0	2.0	1.0
CV 104a	1.61	1.67	0.29	0.29	0.58

Ettersom gasskinetikken for stamme 104a viste noe utradisjonelle resultater for en typisk denitrifikant ble det utført en sekvensering av det bakterielle 16S rRNA genet. For å kunne avkrefte at det har oppstått noen kontaminering fra glycerolstocken ble det ekstrahert DNA fra både glycerolstocken som ble laget i punkt 3.2 og fra den opprinnelige glycerolstocken (3.1). Det ekstraherte DNA'et ble oppamplifisert i en PCR maskin ved bruk av en generell primer

for 16S rRNA genet. Produktet ble separert i en gelelektroforese og båndene ble kuttet ut (1465 bp), rensset og sekvensert (prosedyre se punkt 3.8, 3.9, 3.11, 3.12).



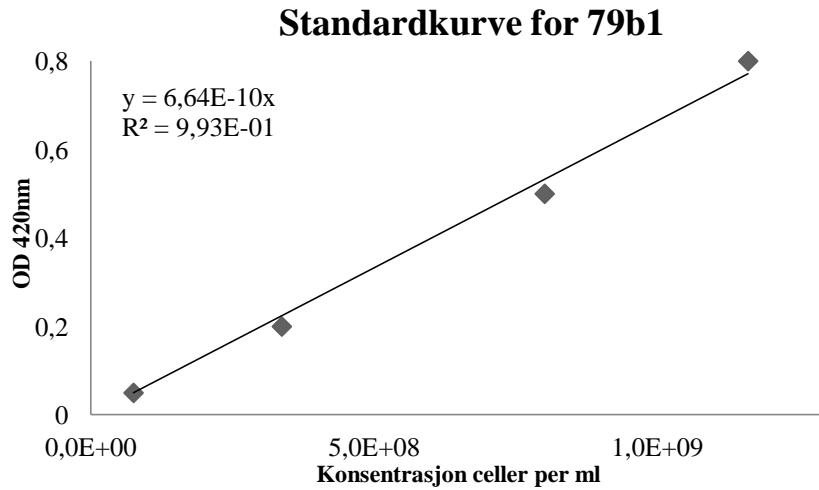
**Figur 4.5:** 1 % agarosegel for de oppamplifiserte 16S rRNA genene som ble separert i gelelektroforese. Bilde (A) viser størrelsesmarkør 1kb, etterfulgt av tre bånd med oppamplifisert 16S rRNA genet fra ny glycerolstock (3.2), siste båndet viser positiv kontroll (stamme 79b1). Bilde (B) viser størrelsesmarkør 1kb etterfulgt av tre bånd med oppamplifisert 16S rRNA genet fra den opprinnelige glycerolstocken (3.1), siste bånd viser positiv kontroll (stamme 79b1).

Sekvenseringsresultatene for ny glycerolstock (laget i punkt 3.2) og den opprinnelige glycerolstocken ble sammenlignet i Serial Cloner (SerialCloner 2012). Sekvenseringen ga en sekvenslengde på 490 bp hos begge prøvene og viste en 100 % likhet med hverandre (Vedlegg A). På bakgrunn av sekvenseringsresultatene kan det konkluderes med at det ikke har skjedd en kontaminering av glycerolstocken.

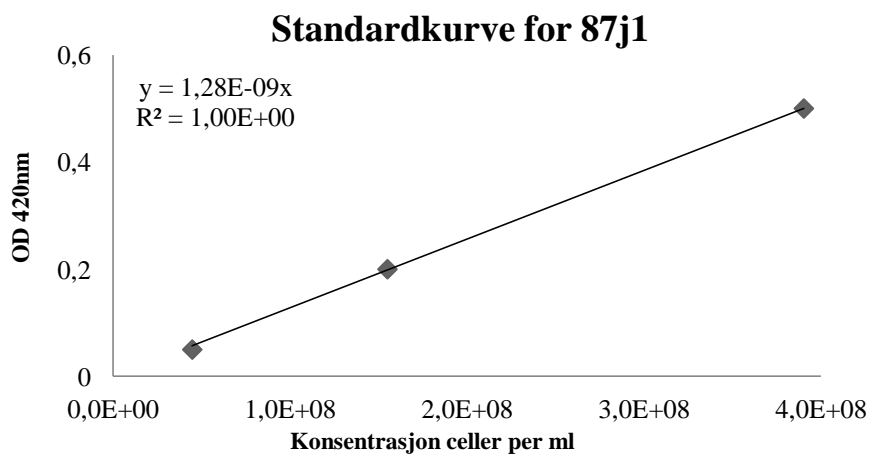
Etter dette forsøket ble det også utført ERIC-PCR av stammene før og etter et forsøk. ERIC-PCR resultatene viste ingen variasjon og vil derfor ikke bli kommentert videre i denne oppgaven.

### 4.3 Bestemmelse av celledtall vs. OD

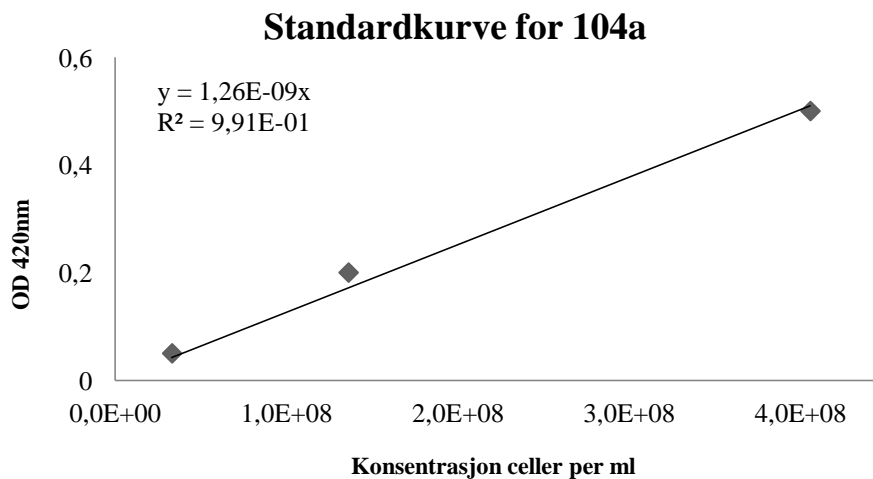
For å kunne beregne hvor mange celler som befinner seg i et inokulum ble det beregnet korrelasjon mellom celledtall og optisk densitet. Resultatene blir oppgitt i standardkurvene nedenfor (4.6, 4.5, 4.7). Relasjonen mellom OD<sub>420</sub> og celler per ml var  $y = 6.64E-10x$  for stamme 79b1,  $y = 1.28E-09x$  for stamme 87j1, mens stamme 104a  $y = 1.26E-09x$ .



**Figur 4.6:** Standardkurve for antall celler per ml for stamme 79b1



**Figur 4.7:** Standardkurve for antall celler per ml for stamme 87j1



**Figur 4.8:** Standardkurve for antall celler per ml for stamme 104a.

Det ble også beregnet generasjonstid for hver av de tre stammene ved å beregne gjennomsnittlige OD av tre replikater ved ulike tidspunkt under den eksponentielle vekstfasen.

**Tabell 4.3:** Utrechnet generasjonstid for stammene: 79b1, 87j1 og 104a

Stamme	Timer
79b1	7.6
87j1	8.5
104a	9.0

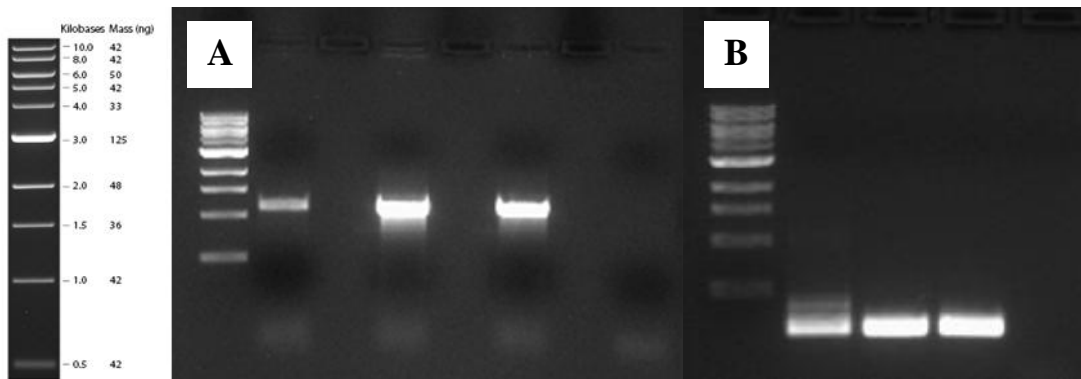
#### 4.4 Primere

Det viste seg å bli en utfordring å finne spesifikke primere som kodet for reduksjonsenzymene i denitrifikasjonen for samtlige av de tre stammene (79b1, 87j1 og 104a). Primeren for *nirK* genet som ble benyttet i denne oppgaven er en universell primer for *Bradyrhizobium* stammer (Sameshima-Saito et al. 2006). Mens en *nosZ* primer (Kloos et al. 2001) ble optimalisert ved å isolere det spesifikke fragmentet fra gelelektroforese. Det isolerte genfragmentet ble sekvensert, og ut i fra sekvensen ble det designet en spesifikk fremover og revers primer (Tabell 4.5).

**Tabell 4.4:** Primersekvens for *nosZ* som ble designet i denne oppgaven.

Primer	Primersekvens 5'->3'	Smelte temperatur
NosZ_GH-F	GGGTCAGACCAAGGAGGCGGA	54 °C
NosZ_GH-R	TGGCCTGCTTGACCGCATCG	

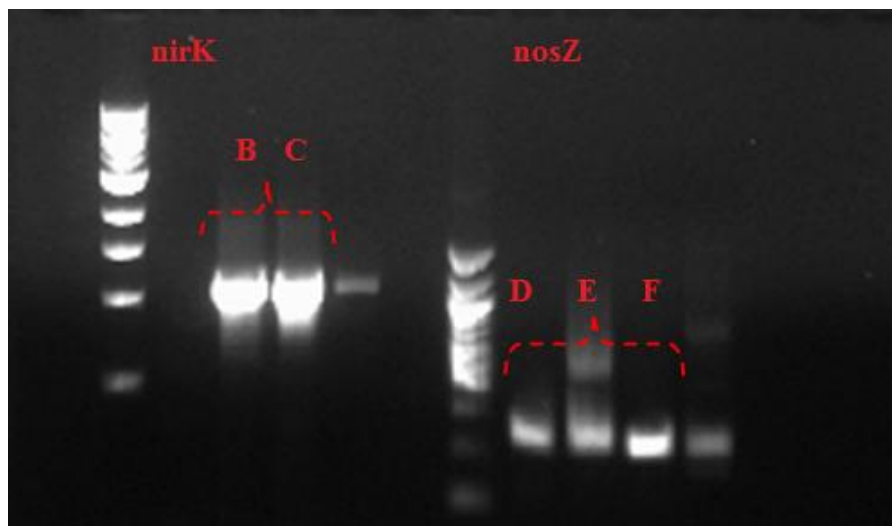
Figur 4.2 viser et bilde fra gelelektroforesen av *nirK* og *nosZ* primerene for stamme 79b1, 87j1 og 104a. PCR reaksjonen for 79b1 viser antydning til et svakt uspesifikt bånd for *nosZ* primeren, men dette viste ikke utslag i Real Time PCR som ble benyttet senere.



**Figur 4.9:** Bilde fra gelelektroforesen for primerene *nirK* og *nosZ*. Figur (A) viser primer for *nirK* (1117 bp): ladder 1kb, stamme 79b1, 87j1 og 104a. Siste brønn er negativ kontroll. Figur (B) viser egendesignet primer for *nosZ* (261 bp): ladder 1 kb, stamme 79b1, 87j1 og 104a. Siste brønn er negativ kontroll.

#### 4.5 Plasmid

Primerene for *nirK* og *nosZ* ble brukt for å amplifisere spesifikke fragment som ble klonet inn i TOPO plasmid. Plasmidet ble benyttet for å lage standardkurven i Real Time PCR. For å bekrefte at kloningen var vellykket ble det kjørt en PCR med primerne for *nirK* og *nosZ* (figur 4.10). Plasmid (B) og plasmid (F) ble benyttet for å lage standardkurve under Real Time PCR.

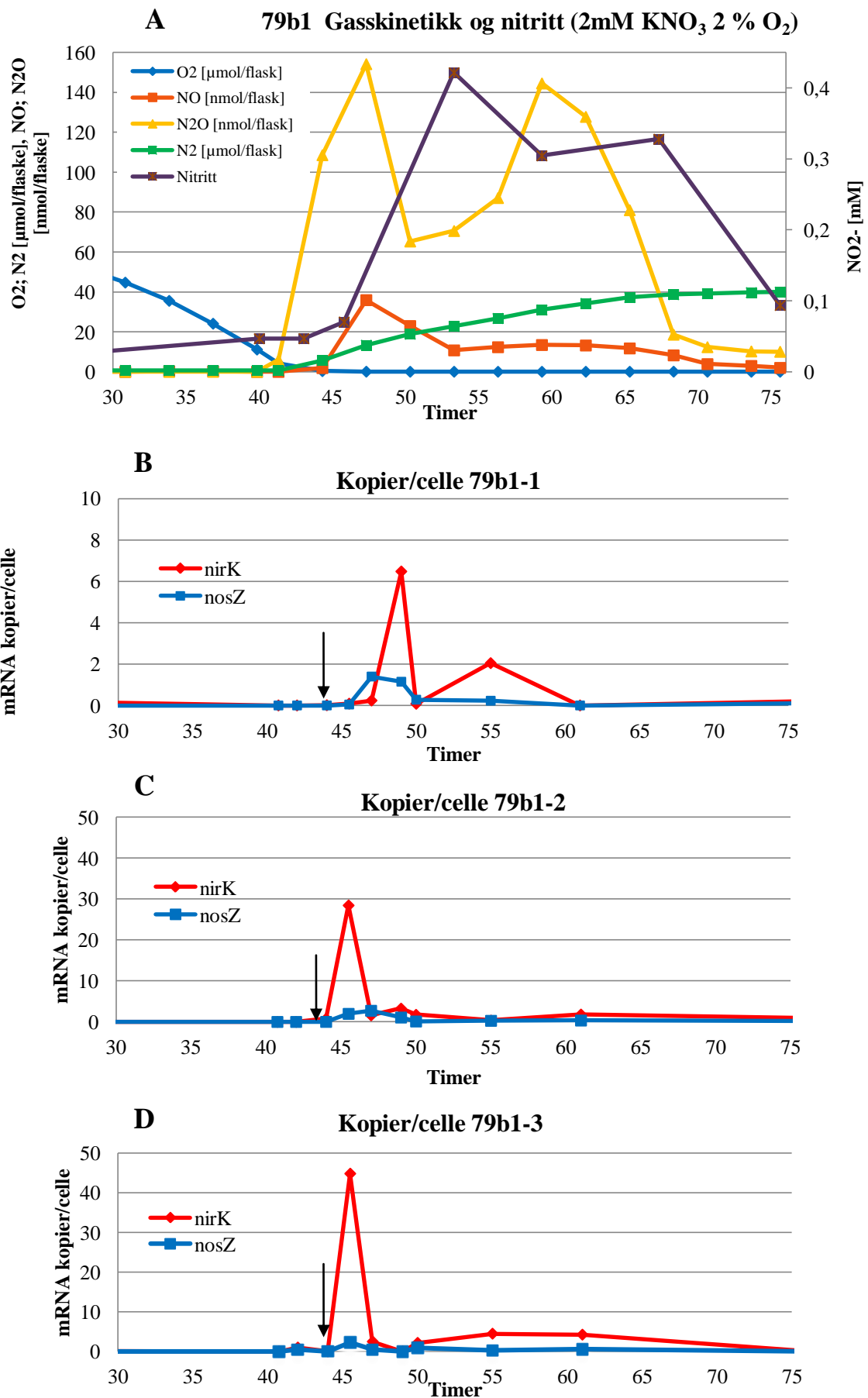


**Figur 4.10:** Plasmid *nirK* (1117 bp) 1kb ladder, plasmid (A) *nirK*, plasmid (B) *nirK*, plasmid (C) *nirK*, båndet etter viser positiv kontroll 87j1. Plasmid *NosZ* (298 bp) 100 bp ladder, plasmid (D) *nosZ*, plasmid (E) *nosZ*, plasmid (F) *nosZ*, siste bånd viser positiv kontroll 87j1.

#### 4.6 Gasskinetikk og transkripsjonsanalyser

For å samle inn genmaterialet til transkripsjonsanalysene ble det ekstrahert celler fra tre flasker ved tidspunkt null og i tiden før og under gassproduksjon av NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>. På grunn av *Bradyrhizobium* stammens generasjonstid (8.5 timer) ble det bestemt å øke oksygenkonsentrasjonen (fra 1 % til 2 % oksygen) slik at cellene kunne dele seg i et aerobt miljø over en lengre periode. Dette er nødvendig for å få en tilstrekkelig størrelse på cellepelleten ved sentrifugeringen av kulturene. Cellepelletene ble ekstrahert for mRNA, som videre ble omdannet til cDNA igjennom revers transkripsjon. Mengden cDNA ble kvantifisert gjennom Real time PCR ved å benytte spesifikke primere for *nirK* og *nosZ*. Triplikatene fra dette forsøket vises i hver sin graf i figur 4.11 for stamme 79b1 og i figur 4.12 for stamme 104a.

Gasskinetikken for stamme 79b1 (figur 4.11-A) viser det samme denitrifikasjonsmønster som i tidligere forsøk. NO og N<sub>2</sub>O ble produsert ved konsentrasjon nmol per flaske og N<sub>2</sub>O viser sine to topper som er blitt observert ved tidligere gasskinetikksforsøk (Figur 4.2). Det vises også to topper for målingen av nitritt som viste en maksverdi på rundt 0.4 mM per flaske. Tidsperioden for produsert gass for NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub> er noe redusert i forhold til tidligere gasskinetikkmålinger på grunn av det økte celletallet i inokulumet. Transkripsjonsanalysen for hver av de tre replikatene (figur 4.11-B, C og D) viser mRNA kopier per celle for genene *nirK* og *nosZ*. Det vises en større ekspresjon av *nirK* enn *nosZ*, *nirK* er også uttrykt over en lengre periode. Samtlige av figurene viser en økning av transkribert mRNA for *nirK* og *nosZ* etter at oksygenkonsentrasjonen har avtatt (pilen viser når oksygenkonsentrasjonen har avtatt til rundt 0 µmol/flaske). I replikat nr. 3 (4.11-D) vises en antydning til en liten topp av *nirK* for oksygenkonsentrasjonen er fullstendig brukt opp, mens den største toppen for *NirK* induseres etter at NO har økt. *NosZ* viser ikke like store kopinumre som *nirK* og i to av replikatene uttrykkes *nosZ* noe senere enn *nirK*.



**Figur 4.11:** Figur 4.11 viser resultater fra transkripsjonsanalysen med hensyn på gasskinetikk, nitritt og transkribert mRNA per celle for *nirK* og *nosZ*. Figur (A) viser gasskinetikk og målt nitritt for stamme 79b1. O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> vises i µmol/flaske og NO, N<sub>2</sub>O i nmol/flaske. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> er oppgitt i [mM] på den sekundære akse. (B), (C) og (D) viser kopier per celle av transkribert mRNA for *NirK* (blått) og *nosZ* (rødt). Hver av figurene er merket med en pil for å vise når oksygenkonsentrasjonen i flaskene ble oppbrukt.

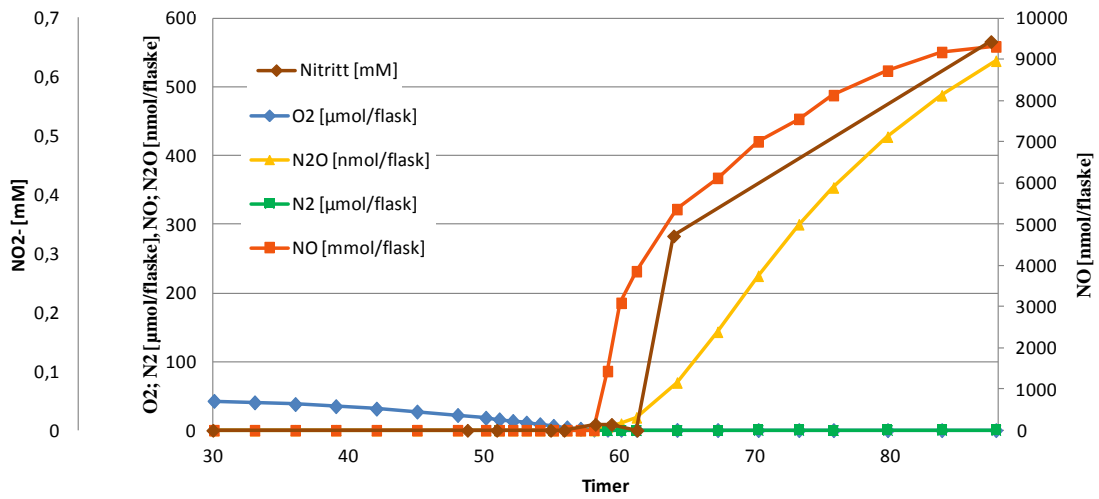
Gasskinetikken for stamme 104a (Figur 4.12-A) viste en stor produksjon av NO, opptil en 9 - 10 µmol/flaske. I dette forsøket, med 2 % oksygen som ga et høyere celletall i tidspunktet for transisjonen mellom aerobisk og anaerobiske forhold, produserte kulturene så høy NO konsentrasjon at celleveksten trolig ble inhibert. Dette vises også under OD målingene som ikke viser noen økning etter at NO produksjonen har avtatt. Gasskinetikken viser også en økning av N<sub>2</sub>O produksjon, men ikke i nærheten så store konsentrasjoner som NO. Det ble også målt nitritt med en maksimalverdi på 0.7 mM per flaske.

Transkripsjonsanalysene for stamme 104a viste transkripsjon av både *nirK* og *nosZ*. Som registrert tidligere for stamme 79b1 vises det også en liten topp av *nirK* før den store transkripsjonen starter (Figur 4.12-A). Den lille toppen ble uttrykt når det fortsatt var en relativt høy oksygenkonsentrasjon igjen i flaskene (18 µmol/flaske). Transkripsjonen av *nirK* og *nosZ* øker når produksjonen av NO og nitritt produseres. Kvantifisert mengde av *nirK* og *nosZ* viser lavere kopinumner enn hva som ble registrert for stamme 79b1. Selv om *nosZ* uttrykkes i samtlige av replikatene er det ingen antydning til N<sub>2</sub> produksjon i gasskinetikk målingene.



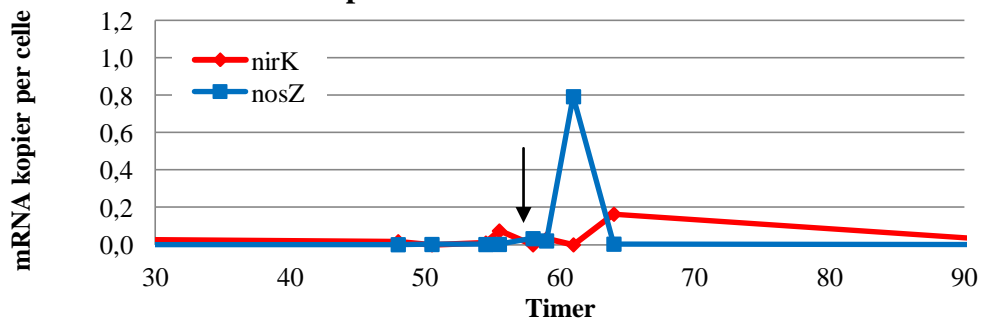
A

104a Gasskinetikk og nitritt (2mM KNO<sub>3</sub> 2 % O<sub>2</sub>)



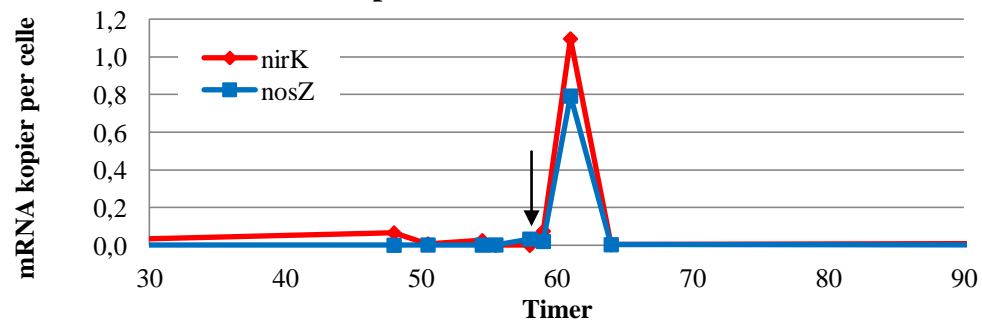
B

Kopier/celle 104a-1



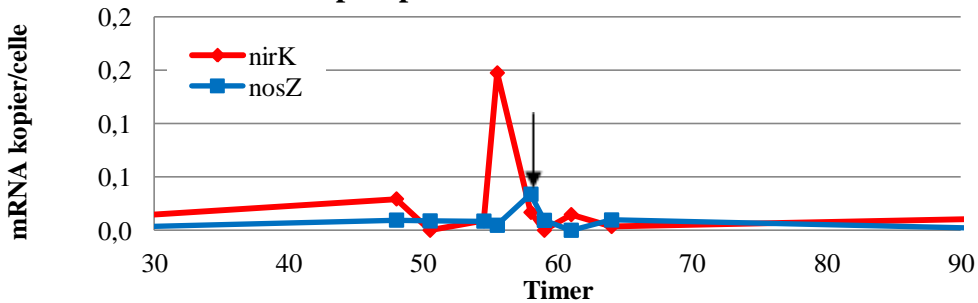
C

Kopier/celle 104a-2



D

Kopier per celle 104a-3



**Figur 4.12:** Figur 4.11 viser resultater fra transkripsjonsanalysen med hensyn på gasskinetikk, nitritt og transkribert mRNA per celle for *nirK* og *nosZ*. Figur (A) viser gasskinetikk og målt nitritt for stamme 104a. O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> vises i µmol/flaske og NO, N<sub>2</sub>O i nmol/flaske. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> er oppgitt i [mM] på den sekundære aksene. (B), (C) og (D) viser kopier per celle av transkribert mRNA for *NirK* (blått) og *nosZ* (rødt). Hver av figurene er merket med en pil for å vise når oksygenkonsentrasjonen i flaskene ble oppbrukt.

Tabellen nedenfor viser resultater fra gasskinetikken under transkripsjonsanalysene med hensyn på maksimal produsert NO og N<sub>2</sub>O, samt hvor mye oksygen som var tilgjengelig i flaskene da produksjonen startet. Stamme 79b1 viser store likheter fra tidligere målinger med hensyn på maksimalverdi av produsert NO og N<sub>2</sub>O (Tabell 4.2). Stamme 104a viser en mye større produksjon av NO og N<sub>2</sub>O enn hva som ble observert i tidligere gasskinetikkforsøk (Tabell 4.2). For begge av stammene starter produksjonen av NO og N<sub>2</sub>O ved lavere oksygenkonsentrasjon enn hva som ble registrert tidligere.

**Tabell 4.6:** Oversikt over gasskinetikk for et semiautomatisk inkuberingsforsøk som ble utført i triplikat for stamme 97b1 og 104a under transkripsjonsanalysen. Tabellen viser oversikt over maksimalverdi for produsert NO og N<sub>2</sub>O, samt oksygenkonsentrasjon ved første påvisning av NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub>.

	Maksimal verdi av mellomprodukt			O <sub>2</sub> konsentrasjon ved første påvisning av:		
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO	N <sub>2</sub> O	µmol/flaske		
	mM	nmol flaske <sup>-1</sup>		NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>
97b1-1	0.1	35.9	154.9	0.4	0.4	0.4
97b1-2	0.42	47.3	90.4	1.8	1.8	0.4
97b1-3	0.33	35.6	96.2	1.0	1.0	0.1
CV mellom triplikatene	0.58	0.17	0.31	0.66	0.66	0.57
104a-1	0.9	9930	1933	0.5	0.5	0.4
104a-2	1.9	9786	1577	0.65	0.65	0.3
104a-3	0.8	9310	537	0.7	0.7	0.35
CV mellom triplikatene	0.50	0.33	0.53	0.16	0.16	0.14

## 5. DISKUSJON

Denitrifikasjon er en anaerob respirasjon hvor nitrat reduseres til nitritt, nitrogenmonoksid (NO), lystgass (N<sub>2</sub>O) og molekylært nitrogen (N<sub>2</sub>). Denne anaerobe respirasjonen utføres oftest av prokaryote innenfor klassen  $\alpha$ - og  $\gamma$ -proteobacteria (Zumft 1997). Til tross for at denitrifikasjon er en velkjent prosess er ikke begrepet helt klarlagt og det finnes flere definisjoner. I noen publikasjoner kreves det at en denitrifiserende bakterie reduserer minst 80 % av det tilgjengelige nitrattet eller nitrittet til N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub> (Mahne & Tiedje 1995). I andre publikasjoner defineres en denitrifikant som en organisme som kan utføre noen av reduksjonsstegene, men ikke nødvendigvis alle fire. Et eksempel på dette er *Synechocystis* som regnes som en denitrifikant, men genomsekvensering har vist at den har en trunkert elektrontransportkjede som hverken inneholder gener for nitritt- eller N<sub>2</sub>O-reduktase (Kaneko et al. 1996). En annen organisme, *Agrobacterium tumefaciens* er en denitrifiserende bakterie som mangler genet som koder for N<sub>2</sub>O reduktase (Baek et al. 2008). Det er også observert bakterier som ikke er denitrifiserende, men som har minst et gen som koder for ett av de fire reduksjonsenzymene. Et eksempel på dette er *Wilonella succinogenes*, en anaerob  $\epsilon$ -proteobacterium som utfører ammonifikasjon av nitritt og som i tillegg kan redusere N<sub>2</sub>O til N<sub>2</sub> ved å uttrykke cytochrome c N<sub>2</sub>O-reduktase (Simon et al. 2004). Frem til i dag er mesteparten av de denitrifiserende bakteriene identifisert på bakgrunn av deres evne til å redusere nitrat eller nitritt til en gassform. Hvor mye gass som blir emittert varierer mellom de ulike organismene. Derfor vil begrepet denitrifikant i denne oppgaven inkludere de bakteriene som ikke reduserer all nitrogen til N<sub>2</sub>, men stopper å redusere ved mellomproduktene NO og N<sub>2</sub>O.

### 5.1 Sluttpunktanalysen

De 39 *Bradyrhizobium* stammene som ble undersøkt i sluttpunktanalysen viste variasjon i produsert gass hvor det ble detektert både NO, N<sub>2</sub>O og N<sub>2</sub> (Figur 4.1). Det er kjent at *Bradyrhizobium japonicum* er en av få rhizobier som utfører fullstendig denitrifikasjon (Bedmar et al. 2005). Sluttpunktanalysen viste til sammen ti stammer som hadde en fullstendig reduksjon fra nitrat til N<sub>2</sub>, hvorav syv av disse var fylogenetisk plassert i nærheten av *B. japonicum* (Figur 4.1). Det ble også vist en variasjon innad i klusterene i det fylogenetiske treet. Stamme 64b, som er nært beslektet til stamme 64a, viste et ulikt sluttprodukt fra det samme klusteret. Stamme 64a stoppet denitrifikasjonen etter en NO produksjon på rundt 1  $\mu$ mol/flaske, mens 64b reduserte tilnærmet 100 % av nitrattet til N<sub>2</sub>O

(Tabell 4.1). Stamme 64b viser også en økning av produsert  $N_2$  mellom uke en og uke to, noe som kan tyde på at stammen kunne ha utført fullstendig reduksjon til  $N_2$  dersom inkuberingsperioden hadde vært forlenget.

I tillegg til stamme 64a, var det til sammen syv flasker som stoppet etter produksjon av NO. Mange av disse verdiene befant seg rundt 1  $\mu\text{mol}$  per flaske, noe som kan være konsentrert nok til å hemme cellevekst. Et forsøk med to stammer innen slekten *Mesorhizobium* viste også en akkumulering av NO (Falk et al. 2010). I den studien ble stammer dyrket opp under tilsvarende betingelser som i denne sluttspunkt analysen, men gasskinetikken ble kontinuerlig overvåket gjennom hele forsøket. I eksperimentet for *Mesorhizobium* nådde NO produksjonen et platå mellom 1.5 - 4.2  $\mu\text{mol}$  per flaske. Disse konsentrasjonene av NO var høye nok til å ha en dødelig effekt på cellene. En høy konsentrasjon av NO vil ha en toksisk effekt ved å inhibere flere metalloproteiner som inngår i respirasjonskjeden til bakteriene (Alderton et al. 2001). I et lukket eksperiment som dette (*in vitro*) vil all gassproduksjon bli værende i flaskene, i motsetning til naturlige omgivelser (*in vivo*) hvor en gassproduksjon ville ha diffundert ut i biosfæren og muligens blitt redusert videre av andre denitrifiserende bakterier som har et mer avansert sett av reduksjonsenzym.

Det er tidligere blitt utført forsøk på flere stammer innen *Bradyrhizobium* for å studere den enkeltes stamme denitrifikasjonsmønster ved å detektere  $^{15}\text{N}$  merket  $N_2$  i en TCD gass kromatograf (Sameshima-Saito et al. 2004). På hensyn av disse forsøkene ble *Bradyrhizobium* kategorisert i tre ulike grupper: fullstendig denitrifiserende, trunkert denitrifikasjon med  $N_2O$  produksjon og ikke denitrifiserende bakterier. I sammenheng med dette forsøket ble påvist at *B. elkanii* ikke utførte fullstendig denitrifikasjon med NO som sluttprodukt. Denne opplysningen samstemmer også med resultatene fra sluttspunktanalysen hvor stammer som er nærliggende *B. elkanii* i det fylogenetiske treet (Figur 4.5) har en varierende produksjon av NO og  $N_2O$ .

På grunn av antall stammer i dette forsøket ble det kun målt én flaske per stamme, og ikke tre replikater som hadde vært bedre statistisk. Men resultatene vil gi en indikasjon på hvilke reduksjonsenzym som er tilstedet hos de ulike stammene. Flere av stammene med ufullstendig denitrifikasjon kan man også spekulere i om de utfører noen annen form for reduksjon, som for eksempel DNRA ved å redusere nitrat til ammonium. Dette sluttspunktsforsøket vil bli fulgt opp i et senere tidsrom for å undersøke om noen av stammene som ikke viser full reduksjon av nitrat kan redusere nitritt. Dette er for å få en indikasjon på

om de aktuelle *Bradyrhizobium* stammene har reduksjonsenzym som kreves for å redusere nitrat til nitritt, som inngår i den første delen av både denitrifikasjon og DNRA.

## 5.2 Analyser av gasskinetikk

På bakgrunn av sluttpunktanalysene ble det valgt ut tre stammer som var lokalisert på ulike steder i det fylogenetiske treet og som hadde en fullstendig reduksjon til N<sub>2</sub>. For å få en oversikt over denitrifikasjonsmønsteret til stammene ble gasskinetikken målt hver tredje time i et semiautomatisk inkuberingsystem. Gasskinetikken for stamme 79b1 hadde en 80 - 100 % reduksjon av nitratet til N<sub>2</sub> (fra tre replikater), mens stamme 87j1 hadde 100 % nitrat reduksjon til N<sub>2</sub> i samtlige av replikatene (Tabell 4.2). Produksjonen av NO startet når det enda var 4-9 µmol oksygen igjen i flaskene tett etterfulgt av N<sub>2</sub>O.

Stamme 87j1 utmerker seg ved å ha en særdeles stringent kontroll over produsert NO (rundt 12 nmol/flaske) med en korrelasjonsverdi på 0.02 mellom de tre replikatene (Tabell 4.2). Slike stringente kontroller er tidligere observert i *Paracoccus denitrificans* som er en organisme med lav toleranse for NO (Bergaust et al. 2010). Disse trendene ble også observert for stamme 79b1, men ikke like stringent for NO produksjon som 87j1. Sammenliknet med NO produksjonen viste N<sub>2</sub>O produksjonen seg å være mindre kontrollert for samtlige av de tre stammene (79b1, 87j1 og 104a). Det er vist i *Pseudomonas aeruginosa* at N<sub>2</sub>O gass kun har en svak påvirkning på uttrykkelse av *nosZ*, i motsetning til NO som viser seg å være en sterk regulator for *nirK*. Dette resulterer i en økt transkripsjon gjennom den positive tilbakemeldingen av NO (Zumft & Körner 2007). Ettersom stamme 79b1 og 87j1 viste en såpass stor likhet med hensyn på denitrifikasjonsmønster ble det derfor valgt å kun gå videre med 79b1 til transkripsjonsanalysen.

I likhet med de to andre stammene viser gasskinetikk-målingene for 104a en produksjon av NO og N<sub>2</sub>O i nmol skala når konsentrasjonen av oksygen ble redusert til rundt 1.5 – 1.0 µmol oksygen per flaske. Men På tross av dette viser gasskinetikken for 104a (Tabell 4.4) et annerledes mønster enn hva som ble forventet på bakgrunn av sluttpunktanalysen som viste en fullstendig reduksjon til N<sub>2</sub>. Kun 5-7 % av nitratet ble redusert til N<sub>2</sub>. Forskjellen mellom disse to forsøkene var at det ble tilsatt 2 mM KNO<sub>3</sub> i gasskinetikksforsøket, mens mediet i sluttpunktanalysen ble tilsatt 4 mM KNO<sub>3</sub>. Ettersom sluttpunktanalysen ble utført uten replikater er det ikke et tilstrekkelig grunnlag for å gi noen konklusjon. Allikevel kan det spekuleres i hvorfor stamme 104a viser seg som en fullstendig denitrifikant under sluttpunktsanalysen, med 4mM KNO<sub>3</sub>, fremfor de andre gasskinetikk-forsøkene hvor det ble

tilsatt 2mM KNO<sub>3</sub>. En artikkel om DNRA viser at prosessen trigges ved høy karbon- og lav nitratkonsentrasjon, mens denitrifikasjonen favoriseres ved lav karbon- og høy nitratkonsentrasjon (Bonin 1996). Under måling av gasskinetikk for stamme 104a (Tabell 4.4) fortsetter produksjon av CO<sub>2</sub> å øke en god stund (20 timer) etter at NO og N<sub>2</sub>O produksjonen har avtatt. Disse opplysningene er også med på å støtte teorien om at stamme 104a utfører en annen form for respirasjon eller fermentering, og en forklaring kan være at den utfører DNRA med lav KNO<sub>3</sub>.

### 5.3 Primere for gener som koder for reduksjonsenzymmer i denitrifikasjon

Ett av problemene med å studere og kartlegge denitrifikasjonen skyldes den store diversiteten mellom genene som koder for reduksjonsenzymene. En diversitet mellom denitrifiserende bakterier kan bli kvantifisert ved å amplifisere denitrifikasjonsgener eller det korresponderende mRNA og sekvensering av fragment. Men uten primere som kan binde alle gener knyttet til reduksjonsenzymmer i denitrifikasjonen blir det umulig å kvantifisere antall denitrifiserende bakterier i et miljø. Det finnes flere såkalte ”universelle” primere som dekker et bredt spekter av denitrifikasjonsbakterier, men langt i fra alle denitrifiserende organismer vil vise en spesifisitet for disse primerene. Allikevel ble det oppdaget et *nirK* primerpar (*nirK\_1* og *nirK\_2*) (Sameshima-Saito et al. 2006) som ga et spesifikt PCR produkt for både stamme 79b1, 87j1 og 104a. På utkikk etter primere for amplifisering av *nosZ* viste stamme 104a seg å være mer ulik fra de to andre stammene. Primere for *nosZ* (*nosZ\_ZF* og *nosZ\_ZR*) (Kloos et al. 2001) ga et uspesifikt fragment i PCR for stamme 104a. Derfor ble PCR produktet for disse *nosZ* primerene kuttet ut av gelen, rensset og sekvensert for samtlige av de tre stammene for å kunne designe en ny spesifikk primer. Sekvensresultatene ble benyttet for å lokalisere to oligonukleotider i begge ender på sekvensen som var identiske for samtlige av fragmentene til stammene og med en stor nok anstand for å gi et synlig PCR fragment. Det egendesignede primerparet (*nosZ\_GH-F* og *nosZ\_GH-R*) oppamplifiserte et spesifikt genfragment for både stamme 87j1 og 104a. For 79b1 ble det registrert et svakt, uspesifikt bånd for *nosZ* primeren. Primeren ble derfor testet ut i Real Time PCR og PCR produktet viste en spesifikk smeltekurve. På bakgrunn av dette ble den egendesignede *nosZ* primeren benyttet i transkripsjonsanalysen for både stamme 79b1 og 104a.

Det ble også funnet en *norCD* (Sameshima-Saito et al. 2006) primerpar for stamme 79b1 og 87j1, men ikke for stamme 104a. Siden det var ønskelig å studere 79b1 og 104a under transkripsjonsanalysen ble ikke primeren benyttet videre i forsøket. At *norCD* primeren ikke

ga noe spesifikt PCR produkt for 104a kan ikke konkluderes med at det ikke eksisterer et *norCD* gen i genomet. Genomet til 104a er ikke blitt sekvensert og det kan ikke utelukkes at den kan ha en helt annet sekvens for *norCD* enn hva de andre to stammene har. En annen mulighet kan være at den ikke har *norCD*, men et annet enzym som reduserer nitrat til nitritt, for eksempel under DNRA.

#### 5.4 Transkripsjonsanalyse

Under transkripsjonsanalysene ble kun tre utvalgte flasker målt for gasskinetikk, mens de gjenværende flaskene ble inkubert under samme forhold. Det ble ekstrahert cellematerialet fra tre hele flasker ved hvert tidspunkt man ønsket å måle for transkripsjon av *nirK* og *nosZ*. Selv om flaskene ble inokulert fortløpende vil det stå uvisst om denitrifikasjonen i flaskene startet på eksakt det samme tidspunkt ettersom det store antallet av flasker ikke kan bli inokulert ved samme tidspunkt. Siden stamme 79b1 og 87j1 viser seg å ha store likheter med hensyn på gasskinetikk ble det bestemt å kun gå videre med 79b1 i transkripsjonsanalysene. Dette var et tidsbegrenset valg ettersom innsamling av celler under en transkripsjonsanalyse er en tung metode, spesielt med saktevoksende bakterier som *Bradyrhizobium*, siden det kreves jevnlig prøvetakning og derfor tilstedeværelse på laboratoriet under hele eksperimentet.

Etter ekstraksjonen av mRNA er det viktig å kontrollere at prøven ikke inneholder genomisk DNA. En tilstedeværelse av genomisk DNA vil resultere i amplifisering av dette under Real Time PCR på lik linje som cDNA og gi et falskt positivt signal. For å kontrollere at ekstraksjonene ikke inneholdt en tilstedeværelse av genomisk DNA etter å ha blitt behandlet med DNase, ble det kjørt en Real Time PCR av ekstrahert mRNA før revers transkripsjon ble utført. Da vil kun det genomsike DNAet gi et PCR produkt og en eventuell kontaminering vil bli klart synlig i Real Time PCR resultatene.

Selv om celler fra en hel flaske med 50 ml kultur ble sentrifugert ned for nukleinsyre ekstraksjon var det nødvendig å øke oksygenkonsentrasjonen til 2 %. På denne måten vil cellene kunne vokse over en lengre periode i et aerobt miljø slik at celletallet i den interessante fasen under inkubasjonen vil være høy nok til å gi en stor nok cellepellet for å ekstrahere nukleinsyrer. De cellene som ble spunnet ned ved tid null, ble ekstrahert direkte fra inokulumet som ble injisert i resten av flaskene ved starten av forsøket. Inokulumet hadde en celletetthet på 0.2 OD<sub>420</sub>. Transkripsjonsresultatene for tid null viste ingen konstitutiv uttrykkelse av verken *nirK* eller *nosZ* noe som også betyr at inokulumet har holdt seg aerobt og ikke dannet noe denitrifikasjonsproteom under oppdykningsfasen. På denne måten ble det

også kontrollert for at det ikke fantes noe gammelt proteom fra frysestocken som startkulturen ble inokulert fra.

Gasskinetikken for 79b1 under transkripsjonsanalysen (Figur 4.11-A) viste et tilsvarende gasskinetikkmønster som ble observert i tidligere forsøk (Figur 4.2). Tidsrommet for å redusere all nitrat til  $N_2$  var nærmest halvert sammenliknet med tidligere målinger (30 timer isteden for 60 timer). Dette skyldes det økte celletallet ved tilsatt 2 % oksygen, noe som resulterte i en høyere celletetthet ved tidspunktet hvor oksygenet ble brukt opp.

Under transkripsjonsanalysen viste gasskinetikken for stamme 104a en stor akkumulering av NO med inntil 9 – 10  $\mu\text{mol}$  per flaske. Den høye celletettheten i kulturene, med 2 % tilsatt oksygen i headspacet, resulterte i en høyere respirasjonsrate ved tidspunktet hvor oksygenet ble oppbrukt og forårsaket en raskere overgang til anaerobe forhold. Disse observasjonene er også blitt påvist tidligere i en artikkel om *Agrobacterium tumefaciens*, en slekt som er nært beslektet *Bradyrhizobium* (Bergaust et al. 2008). *A. tumefaciens* viste også en ubalansert overgang i gasskinetikkk-forsøk ved høy celletetthet. Flaskene ble tilsatt 7 % oksygen og på grunn av det økte celletallet i den aerobe fasen resulterte det i en rask transisjon fra et oksisk til anoksisk miljø. For disse flaskene viste gasskinetikken en høy NO produksjon som undertrykker den metabolske aktiviteten, også med hensyn på produksjon av  $N_2O$  og  $CO_2$ . Etersom cellene får mer energi under aerob respirasjon vil de ikke starte med anaerob respirasjon før det er absolutt nødvendig. Men en forutsetning for anaerob respirasjon er at cellene har rukket å uttrykke et proteomet før alt oksygenet er brukt opp. De organismene som plutselig befinner seg i et miljø uten noen tilgjengelig elektron akseptor og ingen energi til å kunne utføre en senere syntese av proteomet vil bli fanget i den anoksiske fasen. I sammenheng med artikkelen om *Paracoccus* oppstod begreper  $F_{\text{den}}$ . Dette er hypotesen om at det kun er et fåtall av bakteriene i en kultur som vil inducere reduksjonsenzymene tidsnok for å unngå å bli fanget i et anoksisk forhold (Bergaust et al. 2010).

Det har tidligere vært detektert høy NO hos stamme 104a (triplikat nr. 3 i tabell 4.2), men konsentrasjonen var ikke like høy (1.6  $\mu\text{mol}/\text{flaske}$ ) slik at bakteriene klarte å redusere den videre til  $N_2O$  og  $N_2$ . I tillegg var celletettheten mye lavere ettersom kulturene startet med 1 % oksygen i headspacet. Dette kan tyde på at kontrolleringen over NO produksjonen ikke er like stringent som det er sett hos andre *Bradyrhizobium*, som stamme 87j1. Som diskutert ovenfor viser stamme 104a på mange måter et likt mønster som *A. tumefaciens* (Bergaust et al. 2008) med tanke på kontroll av NO produksjon. *A. tumefaciens* er en plantepatogen og



under en interaksjon med planten kan bakteriene bli angrepet av plantens forsværssystem i form av NO. Man vil derfor anta at symbiotiske bakterier eller parasitter ville ha en fordel av å ha en høy toleranse for NO og dette kan føre til en mindre stringent kontroll av NO produksjon. Det kan spekuleres i om stamma 104a er en mindre fordelaktiv symbiose og nærmere relatert til en parasitt enn stamme 79b1 og 87j1 som viser en stringent kontroll av NO.

Transkripsjonsanalysene for stamme 79b1 og 104a viste begge en ekspresjon av *nirK* og *nosZ* når oksygenkonsentrasjonen minket (mellom 1 - 0.5  $\mu\text{mol}/\text{flaske}$ ). I genekspresjon er det en statistisk induksjon som betyr at det vil være en viss variasjon mellom flaskene ved samme tidspunkt og det er kun noen bakterier i kulturen som uttrykker ett gen. I en publikasjon hvor det ble studert DRP av *Paracoccus denitrificans* viser det til at det kun er en liten del av kulturen som vil skifte til anaerob respirasjon og starte ekspresjonen av reduksjonsenzymene (Bergaust et al. 2011). Studier på elektronfluks kinetikk viser at så få som 2 % av bakteriene i kulturen fullfører transisjonen og går over til å denitrifisere (Bergaust et al. 2010). Det kan påvirke ekspresjon, og dermed også kopinumrene, mellom triplikatene som ble tatt for hvert av tidspunktene. Siden flere flasker ikke kan inokuleres på samme tid har dette også ført til en liten variasjon i når ekspresjon av *nirK* og *nosZ* ble detektert. Dette ses i figur 4.12-D hvor ekspresjonen av *nirK* og *nosZ* starter før de andre to replikatene.

For begge stammene viste det seg å være en høyere ekspresjon av *nirK* mRNA kopier per celle enn hva som ble observert for *nosZ*, med et unntak for 104a som hadde en replikat med lav produksjon av *nirK* (0.2 kopier per celle). Begge stammene hadde en eller flere replikater som viste en lav uttrykkelse av *nirK* når det enda var oksygen igjen, før produksjonen av NO og N<sub>2</sub>O gassene begynte. mRNA kopier per celle for 104a viser seg å være mye lavere enn hva som ble kvantifisert for 79b1. Dette kan skyldes at det var en større prosent av bakteriene i 104a som ble inhibert av NO og ikke overlevde transisjonen mellom oksisk til anoksiske forhold på grunn av den høye akkumuleringen av NO.

### **5.5 Konklusjon og videre arbeid**

De 39 *Bradyrhizobium* stammene som ble studert i sluttpunktsanalysen viste en diversitet med hensyn på reduksjonsenzymmer under denitrifikasjon og det ble registrert sluttprodukt av NO, N<sub>2</sub>O eller N<sub>2</sub>. Mer detaljerte data fra gasskinetikken for de tre utvalgte stammene sammenfattet under begrepet DRP. Ved å inkludere ekspresjon med Real Time PCR utgjør denne studien en beskrivelse av fenotypiske og genotypiske karakteristikk. Frem til i dag er

*Bradyrhizobium* mest studert på bakgrunn av nitrogenfiksering og man vet fortsatt lite om regulering av denitrifikasjon. På bakgrunn av sluttpunktsanalysen med flere ulike stammer, og gasskinetikk for stamme 104a, kan det spekuleres i om det er flere av disse stammene som benytter seg av andre veier for å oppnå energi i form av ATP ved å redusere nitrat gjennom DNRA. For å bekrefte dette trengs mer utfyllende forsøk ved for eksempel å måle for produksjon av nitritt og ammonium i mediet. For stamme 104a ville det vært interessant med en helgenomsekvensering for å kartlegge denitrifikasjonsgenene, for å se etter andre reduksjonsprosesser (DNRA) og for å kunne designe molekulære verktøy som primere.

Resultatene i denne oppgaven kan bli benyttet til å støtte oppom data for matematisk modellering. En slik modell blir konstruert på bakgrunn av fenotypiske data fra modellorganismen *Paracoccus denitrificans* (Hassan, J. artikkel under arbeid). En slik modell med flere datasett som inkluderer ulike grupper av relevante denitrifiserende organismer kan benyttes for å øke kunnskapen om utslipp av NO og N<sub>2</sub>O i komplekse bakterielle samfunn fra ulike miljøer. Innenfor *Bradyrhizobium* stammene finner vi en stor variasjon med hensyn på denitrifikasjon og i denne oppgaven ble det identifisert stammer med fullstendig denitrifikasjon og stammer som hadde en trunkert denitrifikasjon. Det ble også funnet *Bradyrhizobium* som sannsynligvis utfører DNRA. Denne informasjonen vil være med på å bane vei for videre forskning av denitrifikasjon i *Bradyrhizobium* som vil være med på å gi en større forståelse av denitrifiserende samfunn i jord.

## 6. REFERANSELISTE

- Abdel-Salam, M., Ibrahim, S., Abd-El-Halim, M., Badawy, F. & Abo-Aba, S. (2010). Phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. *Journal of American Science*, 6 (9).
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357 (Pt 3): 593.
- An, S. & Gardner, W. S. (2002). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology Progress Series*, 237 (2711): 41-50.
- Baek, S. H., Hartsock, A. & Shapleigh, J. P. (2008). Agrobacterium tumefaciens C58 uses ActR and FnrN to control nirK and nor expression. *Journal Of Bacteriology*, 190 (1): 78-86.
- Bakken, L. R. (1985). Separation and purification of bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (6): 1482-1487.
- Bedmar, E. J., Robles, E. F. & Delgado, M. J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium Bradyrhizobium japonicum. *Biochemical Society Transactions*, 33: 141-144.
- Bergaust, L., Shapleigh, J., Frostegard, A. & Bakken, L. (2008). Transcription and activities of NO(x) reductases in Agrobacterium tumefaciens: the influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental Microbiology*, 10 (11): 3070-3081.
- Bergaust, L., Mao, Y. J., Bakken, L. R. & Frostegard, A. (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 (19): 6387-6396.
- Bergaust, L., Bakken, L. R. & Frostegard, A. (2011). Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 39: 207-212.
- Bleakley, B. H. & Tiedje, J. M. (1982). Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (6): 1342.
- Bonin, P. (1996). Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: a dissimilatory pathway. *Fems Microbiology Ecology*, 19 (1): 27-38.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28 (3): 495-503.
- Bothe, H., Ferguson, S. J. & Newton, W. E. (2007). *Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier. 427 s.
- Bueno, E., Bedmar, E. J., Richardson, D. J. & Delgado, M. J. (2008). Role of Bradyrhizobium japonicum cytochrome c550 in nitrite and nitrate respiration. *FEMS microbiology letters*, 279 (2): 188-194.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N. & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. 330.
- Casella, S., Shapleigh, J., Toffanin, A. & Basaglia, M. (2006). Investigation into the role of the truncated denitrification chain in Rhizobium sllae strain HCNT1. *Biochemical Society Transactions*, 34 (1): 130-132.
- Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G. & Boivin-Masson, C. (2003). Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ -Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology*, 185 (24): 7266-7272.
- Davidson, E. A. & Verchot, L. V. (2000). Testing the hole-in-the-pipe model of nitric and nitrous oxide emissions from soils using the TRAGNET database. *Global Biogeochemical Cycles*, 14 (4): 1035-1043.

- Delgado, M. J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E. J. & Muller, P. (2003). The Bradyrhizobium japonicum napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology-Sgm*, 149: 3395-3403.
- Dresler-Nurmi, A., Fewer, D., Räsänen, L. & Lindström, K. (2009). The diversity and evolution of rhizobia. *Prokaryotic Symbionts in Plants*: 3-41.
- Falk, S., Liu, B. & Braker, G. (2010). Isolation, genetic and functional characterization of novel soil nirK-type denitrifiers. *Systematic and Applied Microbiology*, 33 (6): 337-347.
- Firestone, M., Davidson, E., Andreae, M. & Schimel, D. (1989). Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*: 7-21.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants.
- Haltia, T., Brown, K., Tegoni, M., Cambillau, C., Saraste, M., Mattila, K. & Djinovic-Carugo, K. (2003). Crystal structure of nitrous oxide reductase from Paracoccus denitrificans at 1.6 Å resolution. *Biochemical Journal*, 369 (Pt 1): 77.
- Hansen, S., Bleken, M. A. & Sitaula, B. (2005). Effekt av gjødsling og kjørelastning på lystgassproduksjon. *Plantemøtet Østlandet 2005. Grønn kunnskap*, 9 (2): 148-152.
- Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. & Saraste, M. (2000). Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1459 (2-3): 266-273.
- Huang, P. M. (2010). *Handbook of Soil Sciences, Volume I: Properties and Processes, Second Edition*: Taylor and Francis.
- Jordan, D. C. (1982). Transfer of Rhizobium japonicum buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen-nov, a genus of slow-growing, root nodule bacteria from Leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (1): 136-139.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M. & Sasamoto, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research*, 3 (3): 109-136.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., et al. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium Bradyrhizobium japonicum USDA110. *DNA Research*, 9 (6): 189-197.
- Kloos, K., Mergel, A., Rösch, C. & Bothe, H. (2001). Denitrification within the genus Azospirillum and other associative bacteria. *Functional Plant Biology*, 28 (9): 991-998.
- Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. E. & Appelbaum, E. R. (1987). Induction of Bradyrhizobium japonicum common nod genes by isoflavones isolated from Glycine max. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (21): 7428.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B. & Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27 (2-3): 95-125.
- Lane, D. J. (1991). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*: John Wiley & Sons.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). DNA Cloning with Plasmid Vectors.
- Lodwig, E., Hosie, A., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. & Poole, P. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis. *Nature*, 422 (6933): 722-726.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30 (6): 1292.
- Mahne, I. & Tiedje, J. M. (1995). Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3): 1110-1115.
- Maier, R. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2009). *Environmental microbiology*, b. 2: Academic press.

- Mesa, S., Göttfert, M. & Bedmar, E. J. (2001). The nir , nor , and nos denitrification genes are dispersed over the Bradyrhizobium japonicum chromosome. *Archives of Microbiology*, 176 (1-2): 136-142.
- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M. E., Delgado, M. J. & Bedmar, E. J. (2002). Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium Bradyrhizobium japonicum. *Microbiology-Sgm*, 148: 3553-3560.
- Mesa, S., Alche, J. D., Bedmar, E. J. & Delgado, M. J. (2004). Expression of nir, nor and nos denitrification genes from Bradyrhizobium japonicum in soybean root nodules. *Physiologia Plantarum*, 120 (2): 205-211.
- Molstad, L., Dörsch, P. & Bakken, L. R. (2007). Robotized incubation system for monitoring gases (O<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) in denitrifying cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 71 (3): 202-211.
- Mosier, A. R. (1998). Soil processes and global change. *Biol Fertil Soils*, 27: 221–229.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155 (1): 335-350.
- NanoDrop. (2010). *Thermo Scientific NanoDrop products - Nucleic acid*. <http://nanodrop.com/ND1/NucleicAcid-Booklet.html> (red.).
- Newton, W. E. (2007). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands: 109-129.
- Philippot, L. & Hallin, S. (2005). Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (3): 234-239.
- Ravishankara, A., Daniel, J. S. & Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 326 (5949): 123.
- Richardson, D., Berks, B., Russell, D., Spiro, S. & Taylor, C. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (2): 165-178.
- Richardson, D. J., van Spanning, R. J. M. & J., F. S. (2007). *The Prokaryotic Nitrate Reductases*. Biology of the nitrogen cycle. Amsterdam: Elsevier. 427 s.
- Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C. & Klemmedtsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8: 1779-1791.
- Saeki, Y., Ozumi, S., Yamamoto, A., Umehara, Y., Hayashi, M. & Sigua, G. C. (2010). Changes in Population Occupancy of Bradyrhizobia under Different Temperature Regimes. 309–312.
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K. & Minamisawa, K. (2004). New method of denitrification analysis of Bradyrhizobium field isolates by gas chromatographic determination of N-15-labeled N-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (5): 2886-2891.
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K. & Minamisawa, K. (2006). Correlation of denitrifying capability with the existence of nap, nir, nor and nos genes in diverse strains of soybean Bradyrhizobia. 21 (3): 174-184.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. & Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49 (3): 155-179.
- SerialCloner. (2012). Serial Basics. I: [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) (red.).
- Silver, W. L., Herman, D. J. & Firestone, M. K. (2001). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. *Ecology*, 82 (9): 2410-2416.
- Simon, J., Einsle, O., Kroneck, P. & Zumft, W. (2004). The unprecedented nos gene cluster of Wolinella succinogenes encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase. *FEBS letters*, 569 (1-3): 7.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*: Springer-Verlag New York Inc.

- Stacey, G. (2007). The Rhizobium– legume nitrogen fixing symbiosis. *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, SJ and Newton, WE, eds): 147-163.
- Stougaard, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology*, 124 (2): 531-540.
- Strohm, T. O., Griffin, B., Zumft, W. G. & Schink, B. (2007). Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (5): 1420.
- Sutton, M. A., Howard, C. M. & Erisman, J. W. (2011). *The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives*: Cambridge Univ Pr.
- Terefework, Z., Kaijalainen, S. & Lindström, K. (2001). AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of Rhizobium galegae isolated from Galega orientalis and Galega officinalis. *Journal of Biotechnology*, 91 (2): 169-180.
- Tischner, R. & Kaiser, W. (2007). *Assimilation in Plants. I Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier. 427 s.
- 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: Cost Edition*.
- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. & Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7 (3): 737-750.
- Wallenstein, M. D., Myrold, D. D., Firestone, M. & Voytek, M. (2006). Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological applications*, 16 (6): 2143-2152.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. 7 utg.
- Wilson, L. A. & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular biology and evolution*, 23 (6): 1156-1168.
- Wofsy, S., Zhang, X., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. & Heinze, C. (2007). Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. *Carbon*: 499-587.
- Wolde-meskel, E., Berg, T., Peters, N. K. & Frostegard, A. (2004a). Nodulation status of native woody legumes and phenotypic characteristics of associated rhizobia in soils of southern Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils*, 40 (1): 55-66.
- Wolde-meskel, E., Terefework, Z., Lindstrom, K. & Frostegard, A. (2004b). Metabolic and genomic diversity of rhizobia isolated from field standing native and exotic woody legumes in southern Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (5): 603-611.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (4): 533-616.
- Zumft, W. G. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type. *Journal of inorganic biochemistry*, 99 (1): 194-215.
- Zumft, W. G. & Körner, H. (2007). Nitrous oxide reductases. *Biology of the nitrogen cycle, 1st ed.* Elsevier Academic Press, Inc., Amsterdam, The Netherlands: 67-81.

## 7. Vedlegg

Sammenstilling av sekvens med fremover primer for ny glycerolstock (seq\_1 1) og sekvens med fromover primer fra gammel glycerolstock (seq\_2 1) hadde en sekvenslengde på 490 bp og viste en likhet på 100 %.

Seq_1	1	GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTGGCGTGCTGATCCACGATTACTA	60
Seq_2	1	GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTGGCGTGCTGATCCACGATTACTA	60
Seq_1	61	GCGATTCCAAC TTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAACTGAGACGGCTTTTTG	120
Seq_2	61	GCGATTCCAAC TTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAACTGAGACGGCTTTTTG	120
Seq_1	121	AGATTTGCGAAGGGTTGCCCTTAGCGTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	180
Seq_2	121	AGATTTGCGAAGGGTTGCCCTTAGCGTCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	180
Seq_1	181	GCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCGCGGCTTATCA	240
Seq_2	181	GCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCGCGGCTTATCA	240
Seq_1	241	CCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGCTC	300
Seq_2	241	CCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGCTC	300
Seq_1	301	GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	360
Seq_2	301	GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	360
Seq_1	361	GTTCCAGGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCCCTGGACATGTCAAGGGCT	420
Seq_2	361	GTTCCAGGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCCCTGGACATGTCAAGGGCT	420
Seq_1	421	GGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC	480
Seq_2	421	GGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC	480
Seq_1	481	CGTCAATTCC 490	
Seq_2	481	CGTCAATTCC 490	

## Vedlegg B - Forkortelser og benevninger

### Forkortelser

ATP	Adenosin 5'-trifosfat	OD	Optisk tetthet
DNA	Deoksyribonukleinsyre	PCR	Polymerase chain reaction
DRP	Denitrification regulatory phenotypes		
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann	ssDNA	Enkeltrådet DNA
ddNTP	2', 3'-dideoksynukleosidtrifosfat	TAE-buffer	Tris-Acetat-EDTA-buffer
dNTP	Deoksynukleosid trifosfat	TCA-syklus	Trikarboksylsyre-syklus
dsDNA	Dobbeltrådet DNA	UV	Ultrafiolett
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid		
EtBr	Etidiumbromid		
EtOH	Etanol		
MQ-vann	Milli-Q vann		

### Benevninger

bp	basepar	mg	milligram
°C	grader celsius	min	minutt
cm	centimeter	ml	milliliter
g	gram	mM	millimolar
Kb	kilobaser	nm	nanometer
kDa	kiloDalton	pmol	pikomol
kV	kiloVolt	sek	sekund
l	liter	t	time
M	molar	µg	mikrogram
Mbp	megabasepar	µl	mikroliter
m	meter	V	volt