

**Polyphasische Taxonomie,
Kerngenom und Lebenszyklus von
Rhodopirellula-Stämmen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der

Universität Bremen vorgelegt von

Carsten S. Frank

aus Rödermark

Bremen, Mai 2011

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Doktorarbeit wurden von November 2007 bis Mai 2011 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Amann

2. Gutachter: PD Dr. Jens Harder

3. Prüfer: Prof. Dr. Ulrich Fischer

4. Prüfer: Dr. Marcus Elvert

Tag der Promotion: 04. Juli 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	IV
Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang	1
A. Einleitung	1
1. Taxonomie	1
1.1. Definition von Arten	1
1.2. Polyphasische Taxonomie	3
2. Das Phylum der Planctomyceten	5
3. <i>Rhodopirellula baltica</i>	8
3.1. Lebenszyklus von <i>Rhodopirellula baltica</i>	11
4. Bakterien und ihre Umwelt	12
4.1. Einfluss der Nährstoffe auf mikrobielles Leben	12
4.2. Sessile Lebensweise als Anpassung an Umweltbedingungen	13
5. Kultivierung von Bakterien	15
5.1. Chemostate	15
6. Microarrays	16
6.1. Klassische Anwendung von Microarrays	16
6.2. Definition des Kerngenoms	17
6.3. Anwendung von Microarrays zur Genomanalyse	17
7. Zielsetzung der Arbeit	19
B. Ergebnisse und Diskussion	20
1. Physiologische Eigenschaften von <i>Rhodopirellula</i> - Stämmen	20
2. Morphologische Eigenschaften von <i>Rhodopirellula</i> - Stämmen	22
3. Chemotaxonomie von <i>Rhodopirellula</i> -Stämmen	23
3.1. Clusteranalyse der Lipidprofile	25
3.2. Clusteranalyse der physiologischen Daten	27
4. Pigmentierung von <i>Rhodopirellula</i> -Stämmen	27
5. Einfluss von Ammonium auf <i>Rhodopirellula</i> -Stämme	28
5.1. Modell für einen Ammoniumsensor	29
5.2. Die ökologische Dimension	30

Inhaltsverzeichnis

6.	Wachstum von <i>R. baltica</i> SH1 ^T bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen...	32
7.	Wachstum von <i>R. baltica</i> SH1 ^T unter mikroaerophilen und anaeroben... Bedingungen	33
8.	Definition des Kerngenoms von <i>R. baltica</i>	33
8.1.	Microarraystudien.....	34
8.2.	Genomsequenzierung	36
8.3.	Vergleich der Ergebnisse aus Microarray- und Genomanalyse	37
9.	G+C-Gehalt.....	42
10.	Stammdifferenzierung und Benennung neuer Arten	43
11.	Ausblick.....	44
C.	Literatur.....	45
Teil II: Publikationen		60
A.	Publikationsliste mit Erläuterungen.....	60
B.	Publikationen	61
1.	Ammonium and attachment of <i>Rhodopirellula baltica</i>	62
2.	Polyphasic taxonomy of <i>Rhodopirellula</i> -related strains: Emended description of the genus <i>Rhodopirellula</i> and the species <i>Rhodopirellula baltica</i> , and the description of <i>Rhodopirellula europaea</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula sallentina</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula maiorica</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula flandrensis</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula gimesia</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula syltensis</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula philippinensis</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula clava</i> sp. nov., <i>Rhodopirellula magna</i> sp. nov. and <i>Rhodopirellula bahusiensis</i> sp. nov. and the description of the <i>Rhodopilula</i> gen. nov. with <i>Rhodopilula apulia</i> sp. nov.	71
3.	The core genome of <i>Rhodopirellula baltica</i>	113
C.	Danksagung.....	141

Abkürzungsverzeichnis

ANI	Durchschnittliche Nukleotididentität (<i>average nucleotide identity</i>)
ASW	Artifizielles Seewasser
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
CDS	<i>Protein <u>c</u>oding <u>s</u>equences</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
DDH	DNA-DNA-Hybridisierung
FAME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICM	Intracytoplasmatische Membran
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie
Mb	Megabasen
MLSA	Multilocus Sequenz Analyse
MS	Massenspektroskopie
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
RB	<i>Rhodopirellula baltica</i>
<i>R. baltica</i>	<i>Rhodopirellula baltica</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RP-HPLC	<i>Reverse phase high performance liquid chromatography</i>
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SH	Schlesner Heinz
TLC	Dünnschichtchromatographie (<i>thin layer chromatography</i>)
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with averages</i>

Zusammenfassung

Planctomyceten der Art *Rhodopirellula baltica* waren in den letzten Jahren Gegenstand einer ganzen Reihe von Untersuchungen. Diese beinhalteten die komplette Sequenzierung und Annotation des Genoms, Transkriptomstudien sowie die Isolation neuer Stämme. Neben der intrazellulären Kompartimentierung gehört der dimorphe Lebenszyklus mit juvenilen, freischwimmenden und adulten, angehaftet lebenden Zellen und die damit verbundene Bildung von Rosetten zu den herausstechendsten Merkmalen von *R. baltica*. Die Schwerpunkte der Arbeit lagen auf drei Projekten.

In einer polyphasischen Taxonomiestudie wurden 17 neu isolierte Stämme auf ihre morphologischen, physiologischen und chemotaxonomischen Charakteristika hin untersucht. Auf Grundlage dieser sowie phylogenetischer Daten erfolgte die Benennung der neuen Gattung *Rhodopilula* gen. nov. mit der Art *Rhodopilula apulia* sp. nov. und der zehn neuen *Rhodopirellula* Arten *Rhodopirellula europaea* sp. nov., *Rhodopirellula sallentina* sp. nov., *Rhodopirellula maiorica* sp. nov., *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov., *Rhodopirellula gimesia* sp. nov., *Rhodopirellula syltensis* sp. nov., *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov., *Rhodopirellula clava* sp. nov., *Rhodopirellula magna* sp. nov. und *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov..

Die Physiologie der Stämme wurde insbesondere hinsichtlich der Reaktion auf Ammonium untersucht. In vorherigen Studien erfolgte die Kultivierung von *R. baltica* meist unter stickstoffgesättigten Bedingungen, während der immer Zellhaufen von sich aneinander anhaftenden Zellen beobachtet wurden. Diese Zellaggregate wurden in ammonium-limitierten Kulturen nur in kleinen Mengen gefunden. Es dominierten freischwimmende Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde ein Anstieg aggregierter Zellen gegenüber Einzelzellen parallel zur Erhöhung der Ammoniumkonzentration beobachtet. Im Chemostat löste ein Ammoniumschock die Bildung eines Biofilms von *R. baltica* durch Anhaftung der Zellen an die Fermenterwand aus. Im Genom wurde ein Kandidatengens für einen Ammoniumsensor als Beginn einer Signalkaskade nachgewiesen. Die ökologische Relevanz dieser Induktion des Anhaftungsprozesses könnte die gerichtete Besiedlung des mikroaerophilen Lebensraums im Sediment sein.

Mit zehn *Rhodopirellula*-Stämmen wurde in Microarray-Studien und durch Genomsequenzierung das gemeinsame Genom, das Kerngenom, bestimmt. Das *R. baltica* Kerngenom enthält nach Microarray-Analyse 3314 gemeinsame Gene,

IV

während die Genomannotation auf 4232 gemeinsame Gene kommt. Bei eng verwandten Stämmen innerhalb einer Art detektieren die Microarrays somit weitestgehend das Kerngenom. Die Kenntnis der Draftgenome erlaubte eine Reklassifizierung des Stammes SH398 von *R. baltica* in *R. europaea*.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sind die Grundlage für zukünftige, vergleichende Studien zwischen *Rhodopirellula*-Arten.

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A. Einleitung

1. Taxonomie

1.1. Definition von Arten

In der Mikrobiologie war und ist die Definition von Artgrenzen immer ein sehr wichtiges, aber auch heikles Thema. In früheren wissenschaftlichen Arbeiten wurden mikrobielle Arten meist anhand phänotypischer Merkmale definiert und voneinander abgegrenzt (Rossello-Mora und Amann, 2001). Ein Eckpunkt bei der Beschreibung von Bakterienarten ist bis heute die Charakterisierung bakterieller Arten anhand morphologischer, chemotypischer und phänotypischer Charakteristika (Vandamme et al., 1996). Auf DNA basierende Analysemethoden werden hauptsächlich verwendet, um Neuisolate taxonomisch einzuordnen. Seit den 1960er Jahren wird hierbei DNA-DNA-Hybridisierung (DDH) verwendet, um Genome zu vergleichen (Rossello-Mora und Amann, 2001). Bei dieser Methode wird der Grad der Reassoziations der DNA-Sequenzen zweier Arten ermittelt. Bei DDH-Experimenten werden Stämme mit einer DNA-Ähnlichkeit von mehr als 70% Homologie als zu einer Art gehörig angesehen (Wayne et al., 1987), bei einer Übereinstimmung zwischen 30 und 70% wird individuell nach phänotypischen Charakteristika über die Zugehörigkeit entschieden. Ein Hauptdefizit der DDH ist ihre verhältnismäßig schlechte Reproduzierbarkeit, die zeitaufwendige Durchführung (Gevers et al., 2005) und das Unvermögen, kumulative Datenbanken mit DDH-Resultaten anzulegen (Richter und Rossello-Mora, 2009; Stackebrandt et al., 2002). Als alternative Methode wurde die 16S rRNA-Analyse eingeführt, die heute breite Akzeptanz gefunden hat. Die Methode wurde von Carl Woese entwickelt und basiert auf der Sequenzierung von 16S rRNA-Genen. Diese stehen aufgrund der wichtigen Funktion der Ribosomen unter einem sehr starken evolutionären Druck, weshalb Veränderungen durch beispielsweise lateralen Gentransfer oder Mutationen, die zu Funktionsverlust führen können, sehr unwahrscheinlich sind (Woese und Fox, 1977). Bei der 16S rRNA-Analyse liegen die

Einleitung

Art- und Gattungsgrenzen bei 98.7 bzw. 96.4%. Diese Grenzwerte wurden durch Vergleich von veröffentlichten rRNA-Sequenzen mit DDH-Daten ermittelt (Stackebrandt und Ebers 2006; Yarza et al., 2008). Es handelt sich bei ihnen nicht um starre Grenzen, sondern um Richtwerte, von denen die individuellen Grenzwerte abweichen können. Allerdings ist die Auflösung in vielen Fällen ungenügend. Bei Sequenzähnlichkeiten über 99% kann aufgrund der zu geringen Auflösung der Methode keine klare Aussage mehr getroffen werden. In diesem Fall ist eine DNA-DNA-Hybridisierung erforderlich, um die Einzigartigkeit eines Isolates sicherzustellen. Auch wenn beide Techniken weithin akzeptiert sind und als Goldstandard zur Artdefinition angesehen werden, so sind sie doch allein nicht ausreichend für eine Klassifizierung. In den letzten Jahren wurden weitere Techniken entwickelt: Bei der Multilocus Sequenz Analyse (MLSA) werden verschiedene Haushaltsgene sequenziert. Haushaltsgene sind essentiell für den Grundstoffwechsel jeder Zelle. Sie werden konstitutiv unabhängig von Zellzyklus und Umweltbedingungen exprimiert und unterliegen ebenfalls einem evolutionären Druck, wodurch sie generell konserviert sind (Maiden et al., 1998; Winkelmann et al., 2010). Als weitere Alternative zur DDH hat sich zunehmend die Gesamtgenomsequenzierung und der Vergleich der Sequenzen eines Genompaars entwickelt (Konstantinidis und Tiedje, 2005). Es wird eine durchschnittliche Nukleotididentität berechnet (%ANI), die den Grad der evolutionären Distanz zwischen zwei verglichenen Genomen wiedergibt. Ein Wert von 94%ANI entspricht der DDH-Artgrenze von 70%. Dieser Wert konnte auch für die MLSA an Isolaten von *Ensifer* als Speziesgrenze bestätigt werden (Martens et al., 2007). Zudem konnte durch Metagenomanalysen, die zeigen, dass im Bereich zwischen 90 und 94%ANI eine Unterrepräsentation von Genen vorliegt, herausgefunden werden, dass der Wert bei 94%ANI eine natürliche Grenze bildet (Konstantinidis und DeLong, 2008).

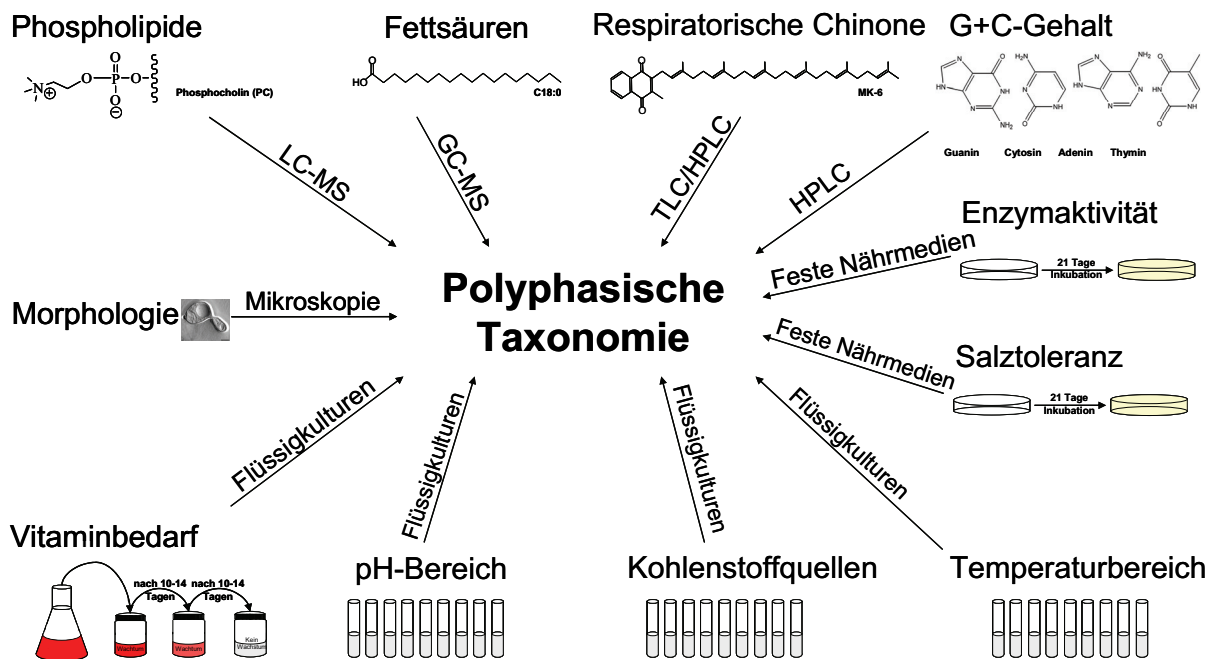


Abbildung 1: Übersicht über die im Rahmen der polyphasischen Taxonomie (Projekt 2) durchgeführten Versuche und angewendeten Methoden.

1.2. Polyphasische Taxonomie

Die Beschreibung neuer Spezies ist entscheidend für das Verständnis und den Vergleich der Diversität von ökologischen Nischen (Prakash et al., 2007). Die Anordnung von bakteriellen Stämmen in im hohen Grad homogene Gruppen, die vom nächsten gemeinsamen Vorfahren abstammen, ist dabei das oberste Ziel bei der Klassifizierung von Bakterien. Der Begriff der polyphasischen Taxonomie wurde erstmals durch Colwell (1970) verwendet, um bakterielle Arten in Ergänzung zu phylogenetischen Analysen anhand von morphologischen und biochemischen Merkmalen mit molekularen Techniken zu charakterisieren. Diese sollen die Beschreibung und Unterscheidung von jedem anderen Taxon ermöglichen (Schleifer, 2009). Werden neue Bakterien isoliert und beschrieben, so geschieht dies meist zuerst anhand phylogenetischer Daten. Allerdings reichen diese allein nicht aus, um Taxa vollständig zu beschreiben. Aus diesem Grund werden die phylogenetischen Merkmale durch morphologische, chemotaxonomische und phänotypische Merkmale ergänzt, wodurch sich ein Gesamtbild ergeben soll (Vandamme et al., 1996; Abbildung 1). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es in mehr als 95% aller

Einleitung

bisher untersuchten Gattungen eine eindeutige Korrelation zwischen phänotypischen und phylogenetischen Charakteristika gibt. Morphologische Merkmale können zelluläre Charakteristika wie Zellform, -größe, -einschlüsse, Flagellen sowie Koloniecharakteristika wie Farbe, Form, Größe und Konsistenz sein. Zur Charakterisierung der Physiologie werden Wachstum auf unterschiedlichen Substraten und bei unterschiedlichen Temperaturen, pH-Werten, Salinitäten und atmosphärischen Bedingungen sowie die Aktivität verschiedener Enzyme getestet. Die Chemotaxonomie gehört zum Standard bei der Beschreibung einer Art (Fredrickson et al., 1986; Guckert et al., 1991; Kohring et al., 1994) und beinhaltet qualitative und quantitative Tests auf Phospholipid-, Fettsäure-, Chinon- und Pigmentgehalte. Insbesondere Fettsäure- und Phospholipidprofile (Abel et al., 1963; Abraham et al., 1997) haben sich dabei als nützlich zur Ergänzung von DDH-Daten erwiesen und zeigen in vielen Fällen übereinstimmende Ergebnisse. Wichtig ist zudem die gute Vergleichbarkeit der Methoden. Sie können schnell und unkompliziert durchgeführt werden, mit hoher Automatisierung und als Bindeglied zwischen Strukturanalyse und der Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften fungieren (Pelz et al., 1997; Suzuki et al., 1993). Jedes Taxon hat sein eigenes spezifisches Fettsäuremuster, das meist art-, aber nur selten gattungsspezifisch ist (Kates, 1964). Phospholipide sind besonders nützlich, um Variationen innerhalb einer Art aufzudecken. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Versuchs- und Wachstumsbedingungen hoch standardisiert sind, da sich Lipidprofile in Abhängigkeit von beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Alter und verfügbaren Nährstoffen stark ändern können (Lambert und Moss, 1983; Nunes et al., 1992). Ungünstige Lebensbedingungen führen zu einem erhöhten Anteil gesättigter Fettsäuren sowie mehr trans- gegenüber cis-Fettsäuren, ein niedriger pH kann zu einer Verlängerung der Fettsäuren führen und niedrigere Temperaturen zu höheren Mengen an ungesättigten und kurzkettigen Fettsäuren, wodurch eine Verschlechterung der Membranfluidität verhindert wird (Niepel, 1999; Wada und Murata, 1990; Canillac et al., 1982; Kaneda, 1972).

2. Das Phylum der Planctomyceten

Bakterien des Phylums *Planctomycetes* wurden erstmals in einem See nahe Budapest (Gimesa, 1924) beobachtet. Aufgrund der Rosettenbildung und der Proliferation durch Knospung wurden sie zunächst fälschlicherweise für planktonische Pilze gehalten, woher sich der Wortstamm „myces“ herleitet. Eine Isolierung in Reinkultur gelang zunächst nicht. Das beobachtete Bakterium wurde erst 1980 mittels Elektronenmikroskopie eindeutig den Prokaryoten zugeordnet (Schmidt und Starr, 1980) und 1986 als *Planctomyces bekefii* (Schlesner und Stackebrandt, 1986) beschrieben. Erst 1973 gelang es mit *Pirellula staleyii* (Staley, 1973), den ersten Planctomyceten zu isolieren, damals allerdings noch unter dem Namen *Pasteuria ramosa*. 1976 wurde mit *Planctomyces maris* der erste Planctomycet publiziert (Bauld und Staley 1976). Der Name wurde für das Phylum beibehalten (Staley et al., 1992).

Planctomyceten sind in terrestrischen und aquatischen Lebensräumen allgegenwärtig und konnten bis heute überall auf der Welt, hauptsächlich mittels 16S rRNA-Analyse nachgewiesen werden (Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003; Woebken et al., 2007; Winkelmann und Harder, 2009). Sie konnten in einer Vielzahl verschiedener Lebensräume und ökologischer Nischen wie beispielsweise verschiedenen Böden, Klärschlamm, Süßwasser, Brackwasser (Liesack et al., 1992; Ward et al., 2006; Ivanova und Dedysh, 2006; Wang et al., 2002; Hirsch und Müller, 1985; Schlesner, 1986) sowie in der Tiefsee (Lopez-Garcia et al., 2001), in Larven von Crustaceen und in marinen Schwämmen (Pimentel-Elardo et al., 2003), in den Larven der Garnele *Penaeus monodon* (Fuerst et al., 1997) und des im Mittelmeer vorkommenden Schwammes *Aplysina aerophoba* beobachtet werden (Gade et al., 2004). Vor kurzem wurden mit *R. baltica* verwandte Planctomyceten in den Biofilmen auf der Oberfläche des Tangs *Laminaria* gefunden (Bengtsson und Ovreas, 2010). In marinen Habitaten konnte ein verstärktes Auftreten während der Algenblüte beobachtet werden (Brümmer et al., 2000, 2004; Eiler und Bertilsson, 2004; Tadonleke, 2007). Dies deutet darauf hin, dass eine Verbindung mit Eukaryoten für das Leben vieler Planctomyceten von großer Wichtigkeit ist. Hierbei kommt ihnen wahrscheinlich ihre Fähigkeit zur Anhaftung zu Gute.

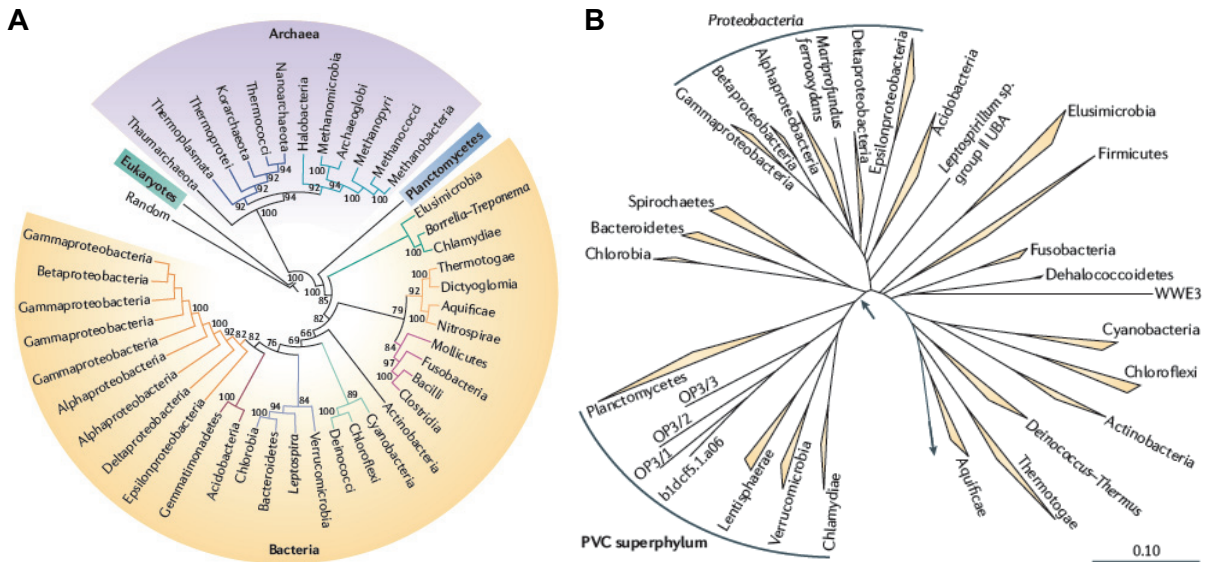


Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen Planctomyceten und anderen Vertretern der Bakterien, Archaea und Eukaryoten basierend auf Gesamtproteomstudien (A) und Stellung innerhalb der Bakterien auf Grundlage von 23S rRNA-Gensequenzen (B). Fuerst und Sagulenko, 2011.

Das Phylum der Planctomyceten zeigt eine große innere Diversität. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden zwei Ordnungen beschrieben: die Ordnung *Planctomycetales* umfasst die Familie *Planctomycetaceae* (Schlesner und Stackebrandt, 1986) mit den zehn Gattungen *Aquisphaera*, *Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Isophaera*, *Schlesneria*, *Singularisphaera* und *Zarvazinella* sowie die Familie *Phycisphaeraceae* einschließlich der Gattung *Phycisphaera*. Die Ordnung *Brocadiales* umfasst die Anammox-Bakterien (Bondoso et al., 2011; Staley et al., 1992; Schlesner et al., 2004; Kulichevskaya et al., 2007, 2008, 2009; Fukunaga et al., 2009). Letztere konnten bisher noch nicht in Reinkultur isoliert werden. 2006 wurde das Phylum der Planctomyceten in das PVC Superphylum eingeordnet, das zusätzlich die verwandten Phyla *Verrucomicrobia* und *Chlamydia* einschließt (Wagner und Horn, 2006). Die genauen Verwandtschaftsverhältnisse der Planctomyceten sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die speziellen morphologischen Eigenschaften von Planctomyceten gehören zu den Hauptgründen, warum sie zu begehrten Forschungsobjekten geworden sind. Das herausstechende Merkmal, durch das sie sich auf den ersten Blick von allen anderen Bakterien unterscheiden lassen, ist ihre intrazelluläre Kompartimentierung durch intracytoplasmatische Membranen (ICM). Diese ist bei den unterschiedlichen

Planctomycetengruppen sehr verschieden komplex. In ihrer einfachsten Form wird das Kompartiment nur von einer einzelnen Membran umgeben. Dieser Aufbau ist beispielsweise bei den Gattungen *Rhodopirellula*, *Pirellula* und *Blastopirellula* zu finden (Abbildung 3 A). Das Kompartiment wird in diesem Fall Pirellosom genannt (Lindsay et al., 2001; Fuerst, 2005). Innerhalb des Pirellosoms, im Riboplasma, befindet sich der fibrilläre Nucleoid, der wahrscheinlich die DNA und den größten Teil der Ribosomen der Zelle enthält. Der Umstand, dass sich im Cytoplasma außerhalb des Pirellosoms im Bereich zwischen ICM und Zellwand, im sogenannten Paryphoplasma, keine Ribosomen befinden, konnte durch Elektronenmikroskopie und Immunofluoreszenz-Methoden bewiesen werden. Je nach Art können noch weitere kleine Einschlusskörper außerhalb des Pirellosoms gefunden werden.

Ein noch komplexerer Aufbau der Zelle wurde bei der Gattung *Gemmata* und bei den Anammox-Bakterien gefunden. Bei der Gattung *Gemmata* kann innerhalb des Riboplasma eine weitere doppelte ICM gefunden werden. Diese umgibt den Nucleoid und hat Ähnlichkeit mit einer Zellkernmembran (Fuerst, 2005). Bei den Anammox-Bakterien enthält das Riboplasma ein weiteres Zellkompartiment, genannt Anammoxosom (van Niftrik et al., 2008). Dessen Membran besteht zu ca. 53% aus Ladderanen genannten Lipiden, die ihr eine für Membranen ungewöhnlich hohe Dichte geben (Sinninghe Damste et al., 2002). Dies ermöglicht den Anammox-Bakterien die Aufbewahrung des giftigen Hydrazin im Anammoxosom, was eine Voraussetzung für ihre spezifische Fähigkeit zur anaeroben Ammoniumoxidation ist, bei der Ammonium (NH_4^+) mit Nitrit (NO_2^-) zu molekularem Stickstoff (N_2) oxidiert (Schmid et al., 2003) und Hydrazin als Zwischenprodukt gebildet wird.

Das zweite für Bakterien einzigartige Charakteristikum ist die peptidoglycanfreie Zellwand. Sie besteht stattdessen aus miteinander quervernetzten Proteinen – u.a. wirken Schwefelbrücken stabilisierend – und ist reich an insbesondere Prolin und Cystein (Liesack et al., 1986; Stackebrandt et al., 1986). Durch diesen Aufbau sind Planctomyceten gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent, insbesondere gegen solche, die die Peptidoglycansynthese hemmen wie die β -Lactam-Antibiotika. Neben Planctomyceten sind Chlamydien die einzigen bisher gefundenen Bakterien, die über eine peptidoglycanfreie Zellwand verfügen (Teeling et al., 2006).

Durch den einzigartigen Aufbau der Planctomyceten wurde lange spekuliert, ob sie ein mögliches Bindeglied zwischen Prokaryoten und Eukaryoten sind. Insbesondere die Anwesenheit organellenähnlicher Zellstrukturen, die strikt durch eine Lipiddoppelschicht vom Cytoplasma getrennt sind, wie bei *Gemmata*, und einem

Einleitung

Zellkern ähneln, grenzt sie klar von anderen Prokaryoten ab. Ähnliche durch Lipiddoppelschichten getrennte Strukturen wurden bei Prokaryoten bisher nur bei der Endosporenbildung und Acidocalcisomen und Magnetosomen (Schüler, 2008) gefunden.

3. *Rhodopirellula baltica*

Der *Rhodopirellula baltica* SH1^T wurde 1986 aus Oberflächenwasser der Kieler Bucht von Heinz Schlesner isoliert (Schlesner, 1986). Im Jahr 2004 wurde die Gattung *Pirellula* in die beiden unpigmentierten Gattungen *Pirellula* und *Blastopirellula* sowie die rötlich gefärbte Gattung *Rhodopirellula* aufgeteilt (Schlesner et al., 2004). Von allen drei Gattungen wurde eine Vielzahl von Stämmen isoliert und entsprechend ihrer verschiedenen Lebensräume beschrieben (Schlesner, 1986, 1994). Die Differenzierung erfolgte anhand von DDH sowie morphologischer, physiologischer und chemotaxonomischer Charakteristika. Mittlerweile wurde die dauerhafte Anwesenheit in der Kieler Bucht mittels FISH bewiesen, zudem konnte mittels DDH bewiesen werden, dass *R. baltica* SH1^T im Gewebe des Mittelmeerschwamms *Aplysina aerophoba* vorkommt (Gade et al., 2004; Schlesner et al., 2004). Auf diesen Erkenntnissen aufbauend und darauf, dass Gene, die auf *Rhodopirellula baltica* verwandte Arten hindeuten, in einer Vielzahl von verschiedenen Lebensräumen gefunden wurden (Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003; Woebken et al., 2007), konnten von Winkelmann und Kollegen (2009 und 2010) zwischen 2005 und 2009 über 70 neue Planctomycetenstämme in Reinkultur isoliert werden, deren 16S rRNA-Sequenz sie als nächste *R. baltica* SH1^T Verwandte auswies. Diese stammten aus einer Vielzahl von verschiedenen Probennahmegebieten von überall auf der Welt, mit dem Fokus auf europäischen Meeren. Die Stämme wurden hierbei mit PCR-Screening, 16S rRNA-Sequenzierung sowie anhand von Farbe, Gestalt der Zellen, ihrer Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika und ihrer Fähigkeit, auf N-Acetylglucosamin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen, ausgewählt.

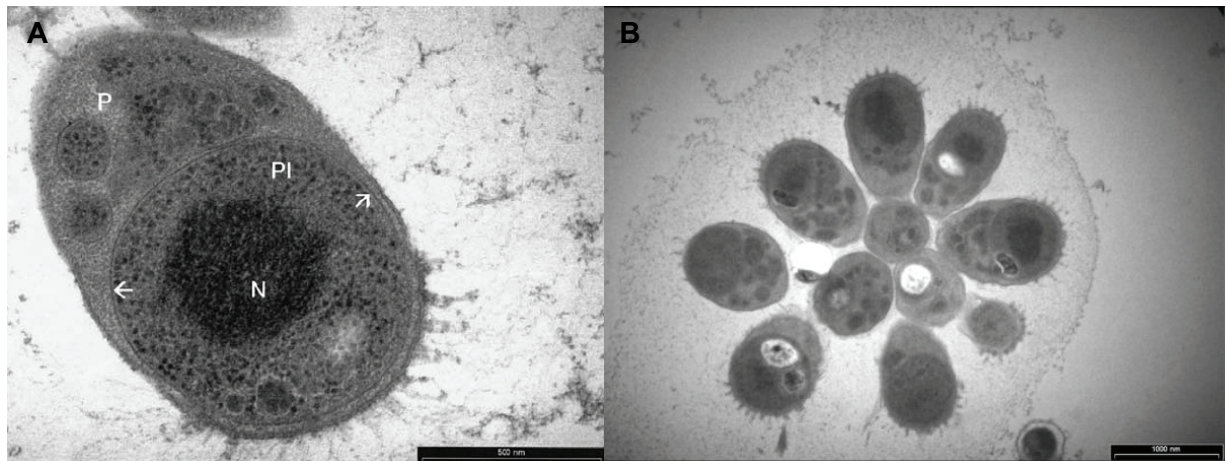


Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Rhodopirellula baltica* Stamm SH796 (A; Gade et al., 2004) und elektronenmikroskopische Aufnahme einer Rosette von ebenfalls SH796 (B; Schlesner et al., 2004). Deutlich wird eine Anhaftung am vegetativen Pol. Balkenlänge: 0,5 μm bzw. 1 μm . PI = Pirellosom; N = Nucleoid; P = Paryphoplasma.

In den letzten Jahren wurden viele wissenschaftliche Experimente und Arbeiten basierend auf Genomdaten des Planctomyceten *Rhodopirellula baltica* durchgeführt. Im Jahr 2000 wurde der *R. baltica* Typstamm SH1 für eine Kompletengenomsequenzierung, Genomannotation und funktionelle Genanalyse ausgewählt. Das Genom wurde im Jahr 2003 durch Glöckner und Kollegen als erstes Planctomycetengenom publiziert. Es ist 7,145 Mb groß und enthält 7325 offene Leseraster (ORF) sowie 72 RNA Gene. Damit gehörte das *R. baltica* SH1^T-Genom zu diesem Zeitpunkt zu den größten bisher sequenzierten bakteriellen Genomen.

Im Anschluss wurden weitere Planctomycetengenome publiziert. Von *Blastopirellula marina* (Schlesner et al., 2004) und *Planctomyces maris* (Bauld und Staley, 1976) liegen teilweise sequenzierte und fast komplett annotierte Genome vor (Woeckel et al., 2007).

Durch die Verfügbarkeit des *R. baltica* SH1^T-Genoms wurden eine Reihe von Proteomstudien ermöglicht (Gade et al., 2005; Hieu et al., 2008) sowie Protein-Kristallisationsstudien (Dabin et al., 2008) und Studien, die sich mit der Enzymaktivität (Wallner et al., 2004) und dem Lebenszyklus (Gade et al., 2005) befassen. Zudem wurden Genexpressionsstudien durchgeführt und ein Gesamtgenom-Microarray (whole genome microarray) entworfen, der alle bisher annotierten 7325 Gene enthält.

Einleitung

R. baltica ist ein sessiles, angehaftet-lebendes, heterotrophes und marines Bakterium. Es ist streng aerob und chemoorganotroph. Die Zellen sind rosa bis rot gefärbt, birnenförmig und enthalten einen reproduktiven und einen vegetativen Pol (Schlesner, 1986). Als typisches Mitglied der Planctomyceten wird *R. baltica* durch eine Zellwand umgeben, die kein Peptidoglycan enthält, aber aus miteinander quervernetzten Proteinen besteht (Liesack et al., 1986). Der intrazelluläre Farbstoff, der für die Rotfärbung verantwortlich ist, ist bisher unbekannt. Vermutlich schützt er die Zellen in höheren Wasserschichten vor Photooxidation, wo *R. baltica* zusätzlich zum Sediment gefunden werden kann. *R. baltica* vermehrt sich durch Knospung. Die adulten Zellen leben angehaftet an Strukturen im Meer wie beispielsweise marinem Schnee, Phytoplankton und Sedimentpartikeln (Morris et al., 2006; Musat et al., 2006). Durch Anhaftung aneinander können sie Aggregate bilden (Abbildung 3 B). Dies wird besonders deutlich, wenn sie in Kultur gehalten werden (Gade et al., 2005; Hall und Aller, 1992). Der dimorphe Lebenszyklus wurde in Proteomstudien mittels 2D DIGE (2-D Fluoreszenz Difference Gel Electrophorese, Gade, 2005) näher untersucht und begeißelte juvenile bewegliche, als auch adulte sessile Zellen nachgewiesen. Weitere Proteom- und Genexpressionsstudien wurden von Wecker und Hieu durchgeführt (Wecker et al., 2009; Hieu et al., 2008).

Auf dem *R. baltica*-Genom wurden unter anderem Gene zur Peptidoglycan-Synthese entdeckt und Gene, die zur Fermentation benötigt werden. Dies ist erstaunlich, da *R. baltica* bisher immer als strikt aerob beschrieben wurde. Das *R. baltica*-Genom enthält fast alle Gene für den C1-Metabolismus, wobei die Gene für die ersten Schritte fehlen. Wachstum auf Methanol und Methylamin ist nicht möglich. 110 für Sulfatasen kodierende Gene konnten nachgewiesen werden. Viele Gene, die für heterogene Bakterien typische Stoffwechselwege benötigt werden, wie die Glykolyse, den Citratzyklus, die Oxidative-Phosphorylierung und den Pentose-Phosphat-Weg, nicht aber den Entner-Doudoroff-Weg und den Glyoxylat-Bypass, konnten nachgewiesen werden. Die Synthese sämtlicher Aminosäuren ist möglich. Eine Reihe von Genen für Nitrattransporter, die das Wachstum unter ammoniumlimitierten Bedingungen ermöglichen, wurden gefunden (Glöckner et al., 2003).

3.1. Lebenszyklus von *Rhodopirellula baltica*

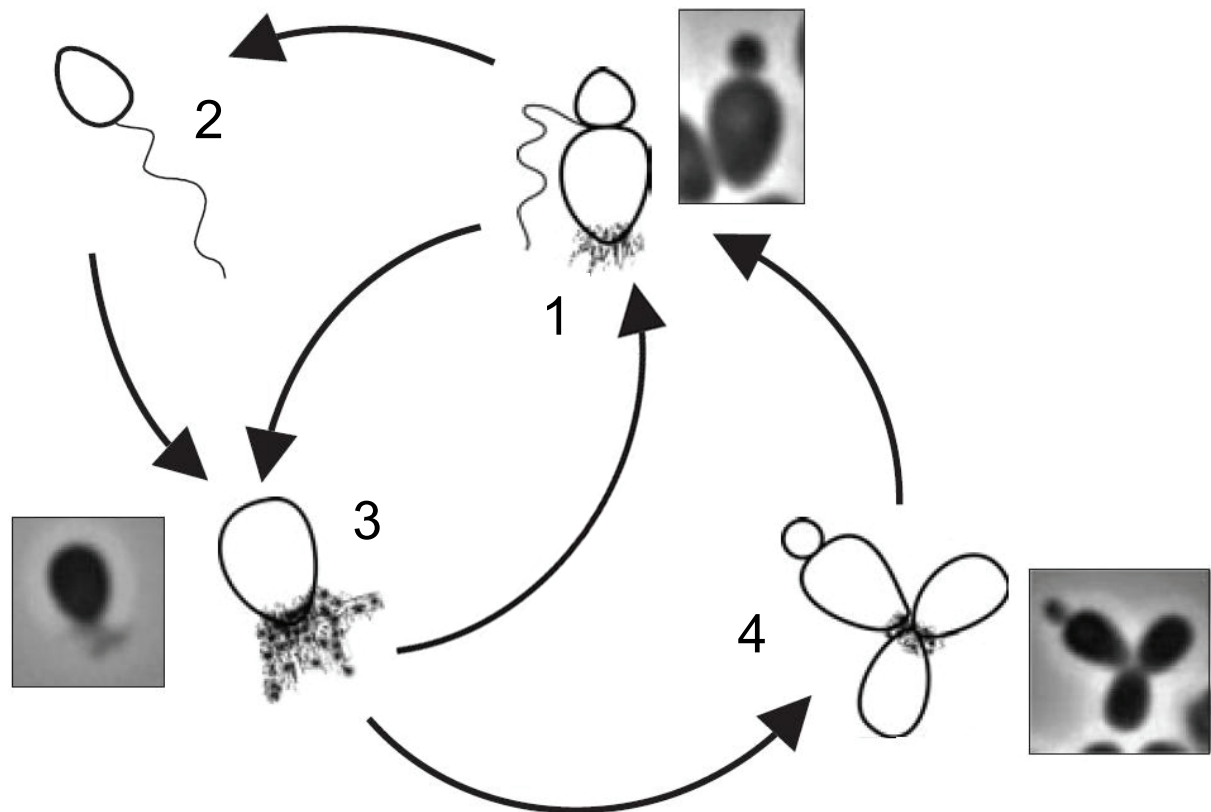


Abbildung 4: Lebenszyklus von *R. baltica*. Modifiziert nach Gade et al., 2005.

R. baltica besitzt einen dimorphen Lebenszyklus (Abbildung 4). Die juvenilen Zellen lösen sich im ersten Schritt vom reproduktiven Pol der adulten Zellen ab (Abbildung 4.1). Sie sind durch Besitz einer einzelnen Flagelle beweglich (Abbildung 4.2). Finden sie eine Nahrungsquelle, so haften sie sich an diese mittels einer aus Glycoproteinen bestehenden sogenannten „Holdfast-Substanz“ an, die am vegetativen Pol gebildet wird (Abbildung 4.3). Während der folgenden Reifung verlieren die Zellen ihr Flagellum und kraterförmige Strukturen bilden sich am vegetativen Pol. Die adulten Zellen leben angehaftet an Strukturen im Meer und bilden Aggregate. Dies wird besonders deutlich, wenn sie in Kultur gehalten werden (Gade et al., 2005). Letztere werden dann im Mikroskop als Rosetten sichtbar (Abbildung 4.4). Der Prozess der Anhaftung ist nach bisherigem Kenntnisstand irreversibel. Die Prozesse und Faktoren, die daran beteiligt sind, dass freilebende Zellen zu einer sessilen Lebensweise übergehen, wurden bisher nicht nähergehend erforscht (Dworkin, 2006). Allerdings wurde vorgeschlagen, dass beispielsweise Nährstoffgradienten bei

Einleitung

diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen (Marshall, 2006). Die Verdopplungszeit wurde mit 10-14 Stunden beschrieben (Gade et al., 2005).

4. Bakterien und ihre Umwelt

4.1. Einfluss der Nährstoffe auf mikrobielles Leben

Das Leben auf der Erde ist hauptsächlich an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor gebunden (Wolfe-Simon et al., 2010; Stevenson, and Cole, 1999) wobei Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor bei Prokaryoten zumeist die limitierenden Faktoren sind. Phosphor ist v.a. als Bestandteil von Nukleinsäuren, Adenosintriphosphat (ATP), Phospholipiden in den Zellmembranen und in Coenzymen von Bedeutung. Seine wichtigste Form ist anorganisches Phosphat PO_4^{3-} . Es kommt hauptsächlich im Sedimentgestein der Meere, aber auch in gelöster Form im Meer oder in Böden und phosphathaltigem Gestein vor. Stickstoff ist ein wesentliches Element mikrobiellen Lebens, da es Bestandteil von beispielsweise Proteinen und Nukleinsäuren ist. Die Verfügbarkeit stickstoffhaltiger Verbindungen, einschließlich Nitrat, Nitrit, Harnstoff, Ammonium oder organischen Molekülen, wie beispielsweise freien Aminosäuren, ist vergleichsweise gering in der Natur und damit ein Faktor für die Begrenzung der primären und sekundären Produktion in den Ozeanen (Stal, 2009). Eine evolutionäre Lösung ist die biologische Fixierung von Stickstoff in Form von Ammonium. Eine andere Strategie kann bei *Nevskia ramosa*, einem beweglichen Süßwasser-Bakterium, beobachtet werden, das bei Stickstoffmangel Exopolysaccharide akkumuliert. Durch diese erhalten die Bakterien Auftrieb, durch den sie ins Epineuston gelangen, wo sie gasförmiges Ammoniak aus der Atmosphäre aufnehmen können (Stürmeyer et al., 1998). Ein Chemorezeptor für Ammonium ist nicht bekannt (Armitage, 2006), aber stickstoffhaltige Verbindungen wie Aminosäuren, sind Lockstoffe für viele bewegliche Bakterien.

Nur in anoxischen Habitaten, wie beispielsweise marinen Sedimenten, ist in der Regel eine ausreichende Ammoniumversorgung gewährleistet. Durch Gärung und Mineralisierung von Proteinen und anderen organischen Stoffen wird Ammonium

transient akkumuliert und diffundiert zur suboxischen Zone, wo es entweder oxidiert oder Bestandteil der Biomasse wird.

Die Stickstoffnachfrage zur Biomassegewinnung kann mit Bezug auf den Kohlenstoffgehalt ausgedrückt werden. Wie von Redfield gezeigt, hat marines Phytoplankton ein C:N:P-Verhältnis von 106:16:1 (Redfield, 1958), und damit ein C:N-Verhältnis von 6,6:1. Umweltbakterien haben ein C:N-Verhältnis von 5:1 (Fagerbakke et al., 1996), während das C:N-Verhältnis in Kultur zwischen 4,5:1 und 12:1 liegt (Tezuka, 1990). Dabei kann das C:N-Verhältnis bei verschiedenen Wachstumsraten konstant sein, wie Versuche mit ammonium-begrenzten Chemostaten gezeigt haben. So führte eine Erhöhung der Wachstumsrate bei *Pseudomonas aeruginosa* zu keiner Veränderung des zellulären Stickstoffpools, wohl aber zu einer Verdopplung des RNA-Gehalts in der Zelle (Ng und Dawes, 1973). Unter aeroben Bedingungen können chemoorganotrophe Bakterien jedes zweite Kohlenstoffatom zum Aufbau von Biomasse verwenden (Stanier et al., 1986), woraus sich ein für eine ausgeglichene Nährstoffversorgung nötiges C:N-Verhältnis von 15:10:1 ergibt.

4.2. Sessile Lebensweise als Anpassung an Umweltbedingungen

Bakterien haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um sich an verschiedene Umweltbedingungen, wie unterschiedliche Temperaturen, Salinitäten, Verfügbarkeiten von Substraten, pH und die UV-Einstrahlung, anzupassen.

Neben Bakterien, die ihr gesamtes Leben planktonisch verbringen, gibt es solche, die die Fähigkeit haben, an Oberflächen wie marinen Schnee anzuhafte und einen Teil oder ihr gesamten Leben in diesem Zustand zu verbringen (Marshall, 2006). Die Anhaftung an Oberflächen hat viele Vorteile, da es den Zugang zu Nährstoffansammlungen erlaubt. Zudem sind sessile Bakterien resistenter gegen antibakterielle Substanzen wie Antibiotika, Chlor oder Schwermetalle, die das Wachstum hemmen können (Costerton et al., 1981; Marshall, 2006). Dieser Effekt kann durch die Bildung von Biofilmen durch weitere Besiedlung noch verstärkt werden. Zudem erhöhen Biofilme den Schutz vor Räubern und Phagen. Es gibt verschiedene Arten anzuhafte, wie chemische und ionische Bindungen. Die Anhaftung kann reversibel oder irreversibel sein sowie spezifisch oder unspezifisch.

Einleitung

Im Zusammenhang mit der Anhaftung von Bakterien an Oberflächen spielen Nährstoffgradienten und damit zusammenhängend Chemotaxis in Richtung dieser Oberflächen eine große Rolle (Marshall, 2006).

Ein Hauptproblem, mit dem sessil lebende Bakterien konfrontiert werden, ist die Erschließung neuer Nahrungsmittelquellen, wenn die alten versiegen. Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich oder Tochterzellen von einmal besiedelten Oberflächen wieder zu lösen. Weit verbreitet unter Prokaryoten ist der Wechsel zwischen zwei verschiedenen Zuständen wie Wachstums- und Ruhephasen, infektiösen und fruchtbaren sowie mobilen und sessilen Phasen. Bakterielle Lebenszyklen können unterschiedlich komplexe Stadien erreichen bis hin zur Formung von multizellulären Aggregaten und differenzierten Populationen (Dworkin, 2006).

Neben *R. baltica* gibt es eine Reihe von Bakterien, die dimorphe Lebenszyklen besitzen und unter verschiedenen Bedingungen eine sessile oder mobile Lebensweise bevorzugen. So formt *Planctomyces bekefii* nur in eutrophen Seen im Sommer und frühem Herbst Rosetten, wenn die Nährstoffkonzentrationen sehr hoch sind, wohingegen in mesotrophen Seen nur Einzelzellen beobachtet werden können (Ward et al., 2006). Bei marinen *Vibrio*-Stämmen wurde beobachtet, dass sie bei Nährstoffmangel eine mobile Lebensweise annehmen (Marshall, 2006). *Caulobacter crescentus* besitzt einen *R. baltica* sehr ähnlichen Lebenszyklus. Hier konnte ebenfalls ein Wechsel zwischen zwei Stadien, einem freischwimmenden, in dem keine Vermehrung stattfindet, und einem sessilen, in dem das Bakterium an Oberflächen angehaftet ist und die Reproduktion stattfindet, beobachtet werden (Laub et al., 2000). *Rhodomicrobium vannielii* besitzt ebenfalls einen sehr ähnlichen Lebenszyklus. Hier induziert eine hohe Lichtintensität Knospung und Reproduktion (Dworkin, 2006). Bei dem Eukaryot *Dictyostelium mucoroides* ist die Ammoniakkonzentration verantwortlich für die Entscheidung, ob Aggregatbildung stattfindet oder nicht; zusätzlich bewirkt es einen chemotaktischen Stimulus (Feit, 1988; Yoshino et al., 2007). *Nevskia ramosa* formt rosettenähnliche Mikrokolonien am Übergang zwischen Luft und Wasser. Diese bilden sich nur in der Abwesenheit von Stickstoff (Stürmeyer et al., 1997).

5. Kultivierung von Bakterien

5.1. Chemostate

Bei einer Chemostat- oder auch kontinuierlichen Kultivierung wird bei konstanter Flussrate kontinuierlich frisches Medium zu einer Kultur zugegeben und die gleiche Menge Medium wieder entnommen (Monod, 1950; Tempest, 1969). Sie steht damit im Gegensatz zu Single-Fed-Batch- oder Fed-Batch-Kulturen, bei denen nur einmal bzw. in begrenztem Umfang Medium nachgefüttert werden kann.

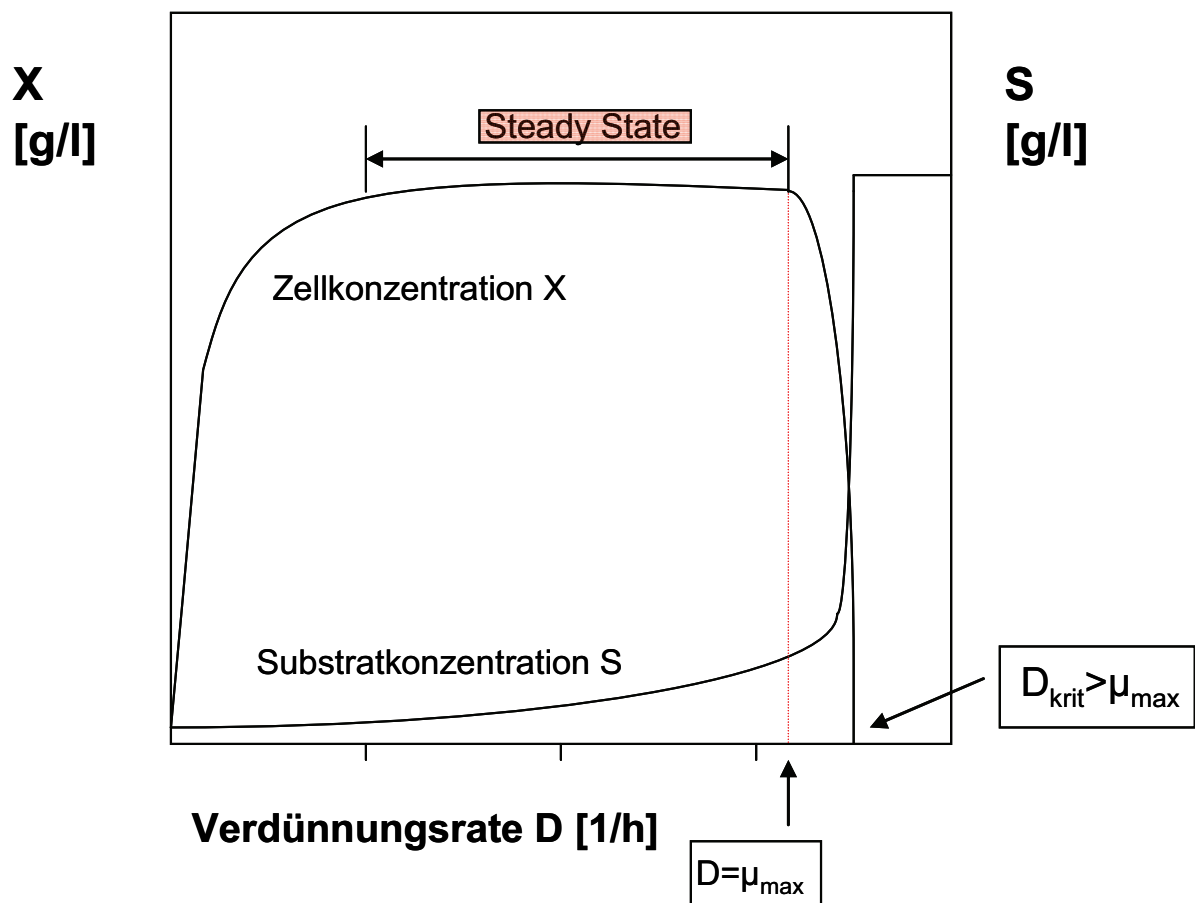


Abbildung 5: X-D Diagramm einer Kultur mit Monodkinetik. Dargestellt werden Zell (X)- und Substratkonzentration (S) gegen die Verdünnungsrate (D). In Steady State ist μ gleich D . Wird die Verdünnungsrate bis auf D_{krit} erhöht, kommen die Zellen mit dem Wachstum nicht mehr hinterher und werden ausgewaschen. Bei $D = \mu_{\max}$ ist die Produktivität am höchsten (Langhammer, 2007).

Ziel der kontinuierlichen Kultivierung ist es, dass die Bedingungen im Fermenter konstant bleiben (Abbildung 5). Diese wird im Fermenter als ideal und homogen angenommen, d.h. der zufließende Mediumstrom (Substratkonzentration S_{ein}) nimmt

Einleitung

bei Eintritt in den Fermenter umgehend die Umgebungskonzentration (Substratkonzentration S) an. Meist wird bei der kontinuierlichen Kultivierung dem Fermenter ein Substrat in einer limitierenden Konzentration zugeführt. Alle anderen Substrate sollten im Überfluss vorhanden sein. Die konstante Flussrate ($F=V/t$ [ml/h]) bestimmt die Verdünnungsrate ($D=F/V_{\text{ferm}}$ [h^{-1}]). Diese ist der Schlüsselparameter der Fermentation. Ihr Kehrwert stellt die mittlere Verweilzeit [h] aller nicht umgesetzten Substrate, Nährstoffe und Zellen im Fermenter dar. Grundlage der kontinuierlichen Fermentation ist die Einstellung des Fließgleichgewichts („Steady State“), das sich bei einer konstanten Verdünnungsrate nach mindestens fünf Verweilzeiten einstellt (Ihssen und Egli, 2004). Anders als bei Batchkultivierungen wird die Fermentationszeit im Steady State irrelevant. Die Wachstumsrate des Organismus (μ) wird von der Verdünnungsrate (D) und der Substratkonzentration (S_{ein}) beeinflusst, wobei im Steady State weder makroskopische Änderungen noch Änderungen der Substrat- und Zellkonzentrationen auftreten sollten. Die Kultivierung unter kontinuierlichen Bedingungen ist insbesondere bei Experimenten von Vorteil, die die Untersuchung der Physiologie eines Organismus zum Ziel haben (Hoskisson und Hobbs, 2005). Stressfaktoren kommen unter kontinuierlichen Kultivierungsbedingungen wesentlich seltener vor als unter Batchbedingungen (Hayers und Zhang, 2002; Piper et al., 2002).

6. Microarrays

6.1. Klassische Anwendung von Microarrays

DNA-Microarrays sind eine Hochdurchsatztechnologie, die es erlaubt, tausende von genetischen Sequenzen parallel zu analysieren. Dies hat einerseits zu einer dramatischen Verschnellerung von Analysen geführt, andererseits zur Miniaturisierung beigetragen. Am bekanntesten ist der Genexpressions-Microarray, der für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen verwendet wird, so bei Bakterien (Hu et al., 2005; Steglich et al., 2006), Hefen und zur Untersuchung von Säugetiergewebe (Alizadeh und Staudt, 2000), in der Krebsforschung (Amersham, 2002) und zur Untersuchung von Umweltproben (Zhou, 2003; Parro et al., 2007).

Ein DNA-Microarray besteht üblicherweise aus tausenden von DNA-Proben und DNA-Sonden, die auf eine Glas- oder Silikonoberfläche oder eine Nylonmembran bespottet sein können. Üblicherweise werden die Proben-DNAs vor Zugabe auf den DNA-Chip fluoreszenzmarkiert. Die Auswertung erfolgt über die Fluoreszenzstärke, die proportional zur an die Sonden gebundenen Menge Proben-DNA ist, und mit einer geeigneten Auswertungssoftware.

6.2. Definition des Kerngenoms

Im Jahr 2004 wurde ein paarweiser Kompletengenomvergleich (pairwise whole genome comparison) von einer Reihe von komplett sequenzierten verwandten Stämmen, die mehr als 94%ANI untereinander zeigten, durchgeführt (Konstantinidis und Tiedje, 2005). Mittels BLAST-Analyse wurden orthologe proteinkodierende Gene (CDS) identifiziert, die einerseits konserviert waren und in mehreren oder allen untersuchten Genomen vorkamen und andererseits solche, die nur in einzelnen Genomen auftraten. Erstere repräsentieren das sogenannte Kerngenom aller untersuchten Stämme einer Art. In der zitierten Arbeit wurden die Kerngenome von neun *E. coli*, sieben *Salmonella enteric* und fünf *Staphylococcus aureus* Stämmen definiert und die Genome mittels COG (Cluster of Orthologous Genes) verglichen.

6.3. Anwendung von Microarrays zur Genomanalyse

In den letzten Jahren wurden DNA-Microarrays zusätzlich für eine Reihe anderer Anwendungen, wie Transkriptionsanalyse (Tang et al., 2007), single-nucleotide Polymorphismus (Tillib und Mirzabekov, 2001), zur Detektion von Mutationen (Sougakoff et al., 2004), vergleichender Genomik (Koide et al., 2004) und der Identifikation von bakteriellen Arten (Cho und Tiedja, 2001; Bontemps et al., 2005) verwendet. Vergleichende Genomanalysen mittels Microarrays wurden erfolgreich in einer großen Anzahl von verwandten Stämmen verschiedener Gattungen eingesetzt. In den meisten dieser Studien wurden bakterielle Gemeinschaften in der Umwelt untersucht und die enthaltenen Arten identifiziert (Tiquia et al., 2004) oder die

Einleitung

Phylogenie von bakteriellen Genomen in Kombination mit Genomsequenzierung untersucht (Lee et al., 2001). Dabei beruhte die Genidentifikation in den meisten Studien auf spezifischer Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden sowie auf PCR amplifizierten Zielgenen (Bodrossy und Sessitsch, 2004; Zhou, 2003). Die Verwendung genomischer DNA (gDNA) ist eine gute Alternative zur Verwendung von PCR amplifizierter DNA, da es sowohl eine geringere Vorselektion als auch ein geringeres Risiko gibt, dass es zu PCR-Biasen kommt (Avarre et al., 2006).

Der Gebrauch genomischer DNA ist bereits weit verbreitet bei der Analyse von Umweltdaten (Avarre et al., 2006) und bei vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) für genetische Variationen (Madsen et al., 2002). Es gibt jedoch eine Reihe von Problemen und Herausforderungen bei dem Einsatz genomischer DNA zu bewältigen. So kann es zu Problemen bei der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit kommen (Avarre et al., 2006; Letowski et al., 2004). Trotz dieser Einschränkungen haben Gesamt-Genom-Microarrays in einer ganzen Reihe von Arbeiten Anwendung gefunden, in denen verschiedene zu einer Art oder Gattung gehörende Stämme, wie beispielsweise *Helicobacter pylori* (Dong et al., 2009), *Oenococcus oeni* (Bornemann et al., 2010), *Campylobacter jejuni* (Poly et al., 2004), *Dehalococoides*-Stämmen (Lee et al., 2011), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Madsen et al., 2007) sowie *Xylella fastidiosa* (da Silva et al., 2007), verglichen wurden. In vielen Fällen wurden dabei neben den Microarray-Experimenten Genomsequenzierungen durchgeführt, die dem Vergleich sowie der Unterstützung und Validierung dienten oder die Microarrays wurden mit Hilfe von aus Gesamtgenomsequenzierungen erhaltenen Daten entworfen (Lee et al., 2011; Witney et al., 2005).

7. Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeit besteht aus drei in sich unabhängigen Projekten. Alle drei haben die Erforschung der Planctomyceten-Gattung *Rhodopirellula* zum Ziel:

Projekt 1

Es ist bekannt, dass *Rhodopirellula baltica* einen dimorphen Lebenszyklus hat (Gade et al., 2005) sowie Rosetten und Aggregate durch Anhaftung aneinander bildet. Im Rahmen dieses Projektes sollte in Chemostatkulturen der Effekt von Ammonium auf die Aggregatbildung bei *R. baltica* Typstamm SH1 und vier weiteren *Rhodopirellula*-Stämmen untersucht werden.

Projekt 2

Aufbauend auf der Arbeit von Winkelmann und Kollegen (2010), in der die genetische Vielfalt von Neuisolaten der Gattung *Rhodopirellula* in Bezug auf die Biogeographie untersucht worden ist, wurde von 17 Stämmen, die in 12 OTUs (operational taxonomic units) eingeordnet wurden, eine polyphasische Taxonomie durchgeführt, um neue Arten benennen und beschreiben zu können.

Projekt 3

Ziel war es, das Kerngenom von *Rhodopirellula* bzw. *R. baltica* mit Hilfe eines für *R. baltica* SH1^T entwickelten Microarrays zu definieren. Sechs *R. baltica*-Stämme und vier weitere *Rhodopirellula*-Stämme wurden aufgrund vorheriger Arbeiten von Schlesner (2004), Winkelmann (2010) und Projekt 2 ausgewählt. Eine Genomanalyse mittels 454 Pyrosequencing wurde angeschlossen, um zu prüfen, in wie weit die Microarrays zu diesem Zweck verwendbar sind.

B. Ergebnisse und Diskussion

1. Physiologische Eigenschaften von *Rhodopirellula*-Stämmen

Die sessil-lebenden Planctomyceten der Gattung *Rhodopirellula* wurden vor kurzem in Bezug auf die Biogeographie studiert (Winkelman et al., 2010). Die Isolate wurden durch 16S rRNA-Sequenzierung, Multilocus Sequenz Analyse (MLSA) sowie DNA-DNA-Hybridisierung (DDH) genetisch charakterisiert. Aufbauend auf diesen Daten wird hier eine polyphasische taxonomische Studie von 17 Isolaten, die den zwölf verschiedenen OTUs A (rot), B (blau), C (lindgrün), D (gelb), E (violett), F (gelbgrün), G (rosa), H, J (orange), M (dunkelgrün), N (hellgrün), O (grasgrün) angehören, durchgeführt (Abbildung 6).



Abbildung 6: Isolationsorte der aus europäischen Gewässern isolierten Stämme (modifiziert nach Winkelman, 2009). Zusätzlich wurden zwei Stämme aus philippinischen Gewässern beschrieben.

Die Salztoleranz der Stämme ähnelte der des *R. baltica* Typstamms SH1, sie variierte zwischen 12,5 und 100% ASW (artificial sea water). Kein Stamm war hypersalin (300% ASW). Wachstum in Süßwasser wurde nicht beobachtet. Die Stämme wuchsen bei Temperaturen zwischen 4°C und 37°C. Die Optimumtemperatur variierte im OTU A zwischen 16-20°C für SH1^T, 20°C für SWK14 und 28-32°C für WH47. Im Gegensatz zu Stämmen aus Ostsee, Skagerrak und von Sylt hatten die Stämme aus dem Mittelmeer und dem Pazifischen Ozean nur Optimumtemperaturen oberhalb von 25°C. Bei den Stämmen WH47, SWK7^T und SWK13^T wurde bereits ab pH 5,5 ein Wachstum beobachtet. Alle Stämme des OTU A sowie SWK7^T und SWK13^T wuchsen ab pH 6,0, alle anderen ab pH 6,5. Alkalische Medien verhinderten das Wachstum oberhalb von pH 10,0, nur die Stämme des OTU H benötigten mindestens eine Protonenkonzentration von pH 9,0. Am Ende des Wachstums betrug der pH-Wert 6,1 bis 6,5, bei Wachstum bei pH 4,0, 5,0 oder 5,5 lag der End-pH bei pH 4,21, 5,18 und 5,73 (siehe Tabelle 3, Publikation 2). Die Ansäuerung ist auf die Kohlendioxidbildung zurückzuführen, die zur Dissoziation von H₂CO₃ zu H⁺ und HCO₃⁻ führt. Heute bewegt sich der pH-Wert in den Ozeanen zwischen pH-Werten von 7,9 und 8,25 (Raven, 2005) und damit in einem Bereich, bei dem alle untersuchten Stämme gut wachsen.

Das einzige Vitamin, dessen Zugabe für das Wachstum der meisten Stämme essentiell war, war Vitamin B₁₂. Lediglich die Stämme SM1^T, K587^T, WH49^T und CS14^T zeigten keine Vitaminabhängigkeit. Vorherige Studien zeigten für *R. baltica* SH1^T eine Vitamin-B₁₂-Abhängigkeit, wohingegen die nächsten *Rhodopirellula* Verwandten *B. marina* und *P. staley* unabhängig davon zu wachsen in der Lage waren (Schlesner et al., 2004). Trotzdem wurden auch im sequenzierten Stamm SM1^T nicht wesentlich mehr am Vitamin-B₁₂-Stoffwechsel beteiligte Enzyme gefunden; lediglich die Nikotinsäure-Mononukleotid-5,6-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase (CobT) konnte mittels KEGG-Analyse nachgewiesen werden. Diese wurde allerdings ebenfalls in Stämmen nachgewiesen, die eine Vitamin-B₁₂-Abhängigkeit zeigten, wie beispielsweise SWK14, WH47 und 6C^T.

Alle 17 Stämme wuchsen auf Cellobiose, Galactose, Glucose, Lactose, Melibiose, Maltose, Mannose, Melezitose, Raffinose, Saccharose, Xylose, N-Acetylglucosamin, Glucuronat und Salicin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Dagegen war kein Stamm in der Lage, Fucose und Glutamin zu nutzen. Fructose, Lyxose, Rhamnose, Ribose, Trehalose, Dextrin, Glycerin, Mannitol, Aesculin, Amygdalin, L-Lactat, Gluconat und Chondroitinsulfat konnten zur Differenzierung der Stämme

Ergebnisse und Diskussion

verwendet werden. Insgesamt zeigten die Stämme der OTUs A und B und diejenigen aus Tjärnö eine hohe Übereinstimmung bei den genutzten Substraten. Die Ergebnisse von *R. baltica* SH1^T stimmten mit den Beobachtungen von Schlesner überein (Schlesner et al., 2004).

2. Morphologische Eigenschaften von *Rhodopirellula*-Stämmen

Unter dem Lichtmikroskop wurde in allen Stämmen am reproduktiven Pol ein großes intrazelluläres Kompartiment beobachtet, bei dem es sich wahrscheinlich um das Pirellulosom handelt. Eine Vermehrung durch Knospung sowie erwachsene sessile und juvenile freibewegliche Zellen und die Bildung von mehrzelligen Rosetten kennzeichneten das mikroskopische Bild der Stämme. Die meisten Zellen hatten die für *R. baltica* typische birnenförmige Morphologie. Die Zellen der Stämme WH49^T, SM35^T, SM23 und SM50^T waren allerdings rund. CS14^T fiel durch eine keulenförmige Morphologie auf. Der Zellgrößen variierten von 1,1 x 1,1 bis 2,9 x 1,8 µm und wichen damit insgesamt nur leicht von den von Schlesner (2004) für *R. baltica* SH1^T gemessenen Größen ab (1,0-2,5 x 1,2-2,3 µm). Hiervon wichen nur die auffallend kleineren Zellen der Stämme SM1^T, SM23 und SM50^T und die größeren Zellen der Stämme SWK7^T und SWK13^T ab.

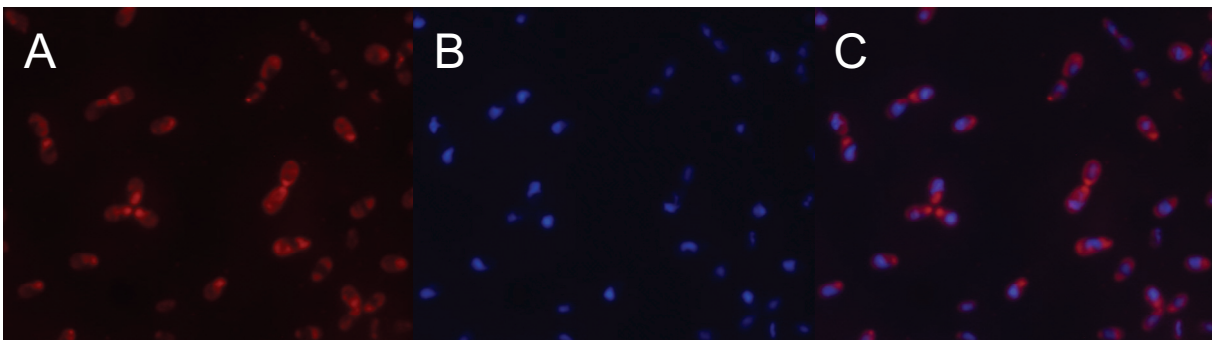


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. A = Nile-Red-Färbung, B = DAPI-Färbung, C = Doppelfärbung mit Nile Red und DAPI. Balkenlänge: 10 µm.

Eine der größten Herausforderungen ist die Isolation und Charakterisierung des Pirellulosoms. Um dieses nach Isolation erkennen zu können, ist eine spezifische Färbung nötig. Stamm SWK7^T wurde mit Nile Red (Greenspan et al., 1985) und DAPI (Kapusinski, 1995) gefärbt (Abbildung 7). Die alleinige Färbung mit Nile Red färbt

insbesondere den äußeren Teil der Zellen - es scheint sich hierbei um die Zellmembran zu handeln - sowie einen Teil im Inneren in der Nähe des vegetativen Pols stark. DAPI färbt Bereiche im Innern der Zellen, insbesondere einen runden in der Nähe des reproduktiven Pols. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um das Pirellosom, da sich in diesem die DNA von *Rhodopirellula* befindet und DAPI v.a. diese, aber auch andere Nukleinsäuren anfärbt. DAPI färbt genau die Bereiche der Zelle, die Nile Red nicht färbt. Da sich Nile Red in Lipiden löst und unter hydrophoben Bedingungen fluoresziert, scheint es sich bei den in den Zellen liegenden gefärbten Strukturen um interne Fettspeicher zu handeln. Nile Red kann durch den ebenfalls lipophilen Farbstoff Synapto Red ersetzt werden. Damit wurden intrazelluläre Vesikel in den Stämmen SH28, SM41^T, SM1^T, SM35^T und SM23 sichtbar dargestellt (Wegener, 2011). Färbungen mit Synapto Red und DAPI zeigten in *Gemmata obscuriglobus* ebenfalls eine saubere räumliche Trennung. Mittels GFP wurden Vesikel in den Zellen außerhalb des Pirellosoms gefunden sowie deren endocytoseähnliche Entstehung postuliert (Fuerst et al., 2011).

3. Chemotaxonomie von *Rhodopirellula*-Stämmen

Die Chemotaxonomie der *Rhodopirellula*-Stämme wurde durch chromatographische (HPLC, RP-HPLC, TLC) und massenspektroskopische Methoden (LC-MS, GC-MS) erforscht. Deutliche Unterschiede gab es bei den Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzungen sowie bei der Pigmentierung. Menachinon MK-6 wurde als dominierendes Chinon in allen Stämmen nachgewiesen, ebenso wie es für alle bisher untersuchten Planctomyceten beschrieben ist (Sittig und Schlesner 1993; Ward et al., 2006). In Planctomyceten wurden im Gegensatz zu anderen Bakterien bisher keine längerkettigen Menachinone wie MK-8 oder MK-12 gefunden.

Ein ganz anderes Bild ergab sich bei der Betrachtung der Phospholipid- und Fettsäuremuster. Diese variierten innerhalb der 17 getesteten Stämme stark und eignen sich daher gut zu deren Differenzierung. In allen Stämmen sind die Phospholipide Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylcholin (PC) und die methylierten Derivate von Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylmethylethanolamin (PME) und Phosphatidylmethylethanolamin (PDME) vorhanden. PDME war dabei mit einem Gehalt von 46 bis 81% das

Ergebnisse und Diskussion

dominierende Phospholipid in allen Stämmen mit Ausnahme von Stamm 6C^T (19%). Am zweithäufigsten kamen PC mit 6,5 bis 45%, gefolgt von PG mit 3 bis 14% und PME mit 1 bis 13% vor. PE konnte nur in den Stämmen SWK7^T, SWK13^T und vor allem 6C^T (17%) in größeren Mengen nachgewiesen werden. Phosphoserine (PS) wurde nur in den Stämmen SWK14, SM41^T, WH49^T, CS14^T, SM50^T und SWK21^T in kleineren Mengen nachgewiesen.

Phosphatidylcholin kommt nicht in *B. marina* und *P. staley* vor und ist ein Unterscheidungskriterium zwischen diesen und *R. baltica* (Schlesner et al., 2004). Auch die hier getesteten genetischen Gruppen lassen sich gut mit der Hilfe des PC-Gehalts voneinander unterscheiden. Die Stämme der OTU B enthalten den deutlich höchsten Anteil an PC (37-45%), wohingegen die Stämme der OTU H die niedrigsten Anteile aufwiesen (6-8%); die Stämme der OTU A enthalten mittlere Anteile von 22-28%. Im Gegensatz dazu ist der Anteil bei Stämmen innerhalb einer OTU sehr homogen. Deutliche Unterschiede gibt es zwischen aus kälteren (Nord-, Ostsee, Skagerrak) und wärmeren Gewässern (Mittelmeer, Pazifik) isolierten Stämmen. So war der PC-Anteil in ersteren deutlich höher und der PDME-Anteil deutlich niedriger als in zweiteren, ausgenommen OTU B, deren Stämme in ganz Europa gefunden wurden. Sowohl das Verwandtschaftsverhältnis als auch die Biogeographie der Stämme scheinen hier eine Rolle zu spielen.

Phosphatidylcholin wirkt stabilisierend auf Membranen (Goldfine und Hagen, 1964; Goldfine, 1984). Es wird in Prokaryoten häufig in Membranen intrazellulärer Kompartimente gefunden. Zudem ist es ein Hauptphospholipid der Membranen von Eukaryoten (Lopez-Lara et al, 2003), so auch das Hauptphospholipid des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dagegen wurde es bisher nur in 10% aller Bakterien nachgewiesen (Sohlenkamp et al., 2003), darunter Cyanobakterien und Rhizobien, die intrazelluläre Membransysteme besitzen und mit Eukaryoten assoziiert sein können. Auch *Rhodopirellula*-Stämme leben in Assoziation mit Algen. Die Funktion des PC in *Rhodopirellula*-Stämmen ist nicht bekannt. Da sich PC stabilisierend auf die Membran auswirkt, könnte seine Anwesenheit in *Rhodopirellula*-Zellen im Unterschied zu denen von *B. marina* und *P. staley* im Zusammenhang mit der höheren Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen in der Umwelt stehen, zumal Halophilie polare Kopfgruppen begünstigt. Die stabilisierende Anwesenheit von PC könnte auch im Zusammenhang mit einer erweiterten Funktion des Pirellosoms stehen. So ist PC die Hauptkopfgruppe der Ladderane von Anammox-Bakterien (Boumann et al., 2006). *R. baltica* besitzt mehrere PC-Synthesewege: auf

dem N-Methylierungs-Weg wird PC durch Methylierung von PS über PE, PME und PDME gebildet. Der CDP-Cholin-Weg (CDP=Cytidin-Diphosphat) wird hauptsächlich in Eukaryoten und in mit Eukaryoten assoziierten Bakterien gefunden. Sein Hauptenzym, die Phosphatidylcholin-Synthase, kann auf dem *R. baltica*-Genom gefunden werden (Sohlenkamp et al., 2003; Martinez-Moral et al., 2003; Vergleiche Tabelle 5, Publikation 2).

In den 17 Stämmen wurden sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren mit variierendem Gehalt nachgewiesen. Vorherrschend waren C16- und C18-Fettsäuren, insbesondere C16:0 und C18:1 Δ 9c, die in allen Stämmen mit Werten von 19 bis 32% bzw. 23 bis 66% den größten Anteil hatten. In den meisten Stämmen wurden zudem die Fettsäuren C16:1 Δ 9c, C16:1 Δ 9t, C17:1 Δ 9 und C18:0 in größeren Mengen nachgewiesen. C18:1 Δ 9t wurde in wenigen Stämmen nachgewiesen, konnte allerdings bis zu 20% aller Fettsäuren ausmachen. In nur einem Teil der Stämme und auch stets in kleineren Mengen wurden die Fettsäuren C12:0, C14:0, C15:0, C17:0, C19:0, C20:0 und C22:0 nachgewiesen. Das Fettsäuremuster ähnelte den bei den Phospholipiden gemachten Beobachtungen, allerdings waren die Unterschiede zwischen den Stämmen insgesamt geringer. Die Fettsäuremuster der Stämme aus Nordeuropa (Nord-, Ostsee, Skagerrak) zusammen mit denen der Stämme der OTU B waren einander allerdings ähnlicher als Fettsäuremuster von aus wärmeren Gewässern (Mittelmeer, Pazifik) isolierten Stämmen. Mit Ausnahme von OTU H ist bei letzteren kein klares Muster erkennbar.

Insgesamt spiegelt das Fettsäuremuster größtenteils die Ergebnisse der genetischen Analysen wieder (Winkelmann et al., 2010). Der einzige klar abweichende Stamm ist SM41^T, da hier einerseits der Anteil von C16:1 Δ 9t (22.9%) und C19:0 (11.9%) wesentlich höher ist als in allen anderen Stämmen und andererseits der Anteil an C18:1 Δ 9c (22.5%) vergleichbar gering ist.

3.1. Clusteranalyse der Lipidprofile

Die Phospholipid- und Fettsäuremuster wurden in Dendrogrammen mit UPGMA (unweighted pair group method with averages) visualisiert. Basierend auf euklidischen Distanzen, zeigten sich zwei Hauptcluster (Abbildung 8). Cluster 1 enthält die Stämme der OTUs A und B sowie die Stämme aus Tjärnö und K587^T aus

Ergebnisse und Diskussion

Belgien. CS14^T aus Brest liegt etwas außerhalb dieses Clusters. Die Stämme der OTU H sowie die Stämme SM1^T, SM50^T und WH49^T bilden Cluster 2; SM41^T hatte ein ungewöhnliches Fettsäuremuster, welches die Position als eine separate Linie begründete. Cluster 1 enthält vor allem nordeuropäische, Cluster 2 südeuropäische Stämme und die von den Philippinen.

Die Alleinstellung von Stamm 6C^T innerhalb des OTU B im Cluster 1 liegt in erster Linie am Phospholipidmuster. Hierzu passt, dass das Fettsäuremuster als artspezifisch beschrieben wurde, während das Phospholipidmuster gut zur Unterscheidung von Stämmen innerhalb einer Art ist (Kates, 1972). Auch die MLSA-Daten zeigten, dass 6C mit CS115 und K1070 nicht so stark verwandt ist wie diese untereinander. Die Stämme SWK14 und WH47 sind auch nach den Lipiddaten die nächsten Verwandten von *R. baltica* SH1^T.

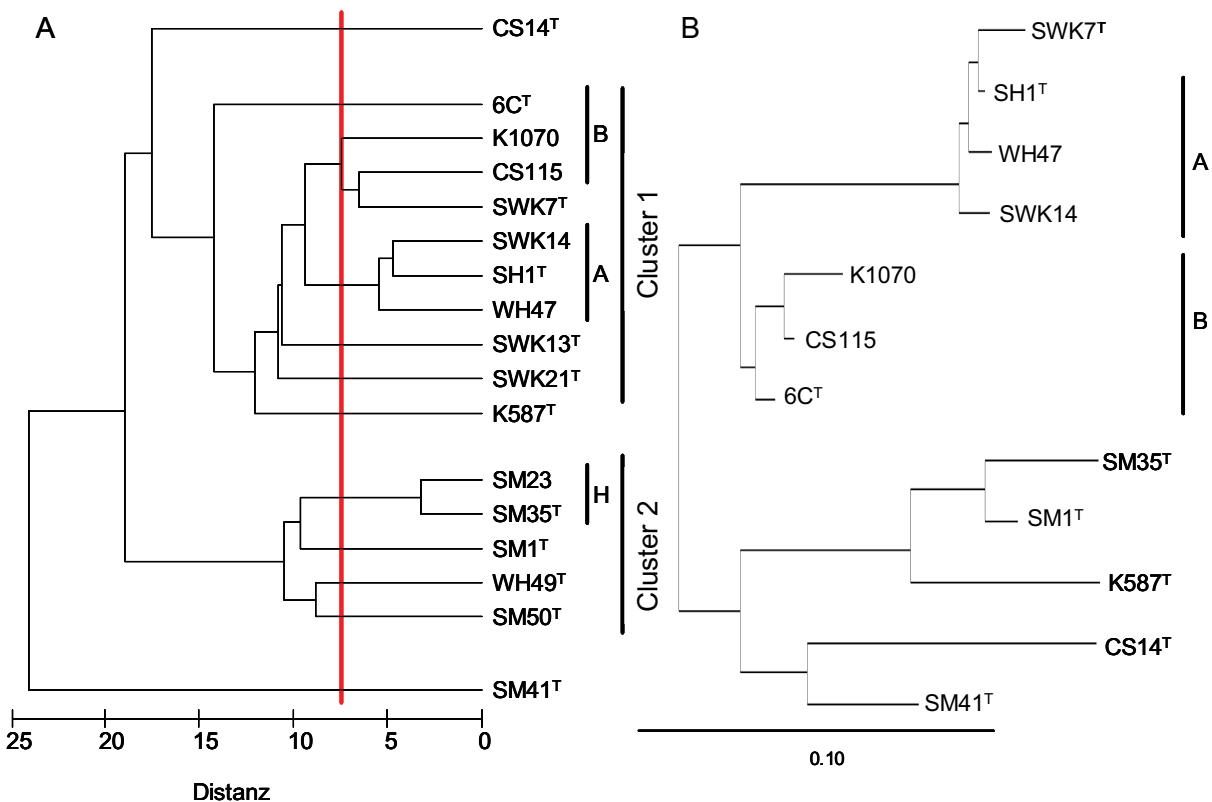


Abbildung 8: Dendrogramm auf Grundlage der euklidischen Distanz und der Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung der aufgeführten Stämme (A) im Vergleich mit einem phylogenetischen Dendrogramm, basierend auf MLSA mit den Haushaltsgenen *mdh* und *glpF*. Die rote Linie markiert die mögliche Artgrenze gemäß OTU A und B. Die Stämme 6C^T (OTU B) und SWK7^T (OTU F) sind Ausreißer. Cluster 1 enthält die nächsten Verwandten von *R. baltica* SH1^T.

Die Biogeographie der Stämme wird vor allem bei den Stämmen aus dem Skagerrak durch die Ähnlichkeit zueinander und zu den Stämmen der OTUs A und B sowie der

Stämme aus dem Mittelmeer und den Philippinen zueinander deutlich. Die Verwendung euklidischer Distanzen hat den Nachteil, dass die Hauptfettsäuren stärker gewichtet werden. Da Nebenfettsäuren für die Differenzierung wichtig sein können, kann dies zu Fehlinterpretationen führen (Vauterin et al., 1996). Insgesamt entsprachen die Lipidprofile weitestgehend den phylogenetischen Daten und geben damit eine sehr ähnliche Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Stämme wieder.

3.2. Clusteranalyse der physiologischen Daten

Ein zweites Dendrogramm basierend auf dem Jaccard-Koeffizient (Frank et al., Publikation 2, unveröffentlicht) stellte die Zusammengehörigkeit anhand von Morphologie, Vitamin-B₁₂-Abhängigkeit sowie Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen, Salinitäten, Temperaturen und pH-Werten dar. Das Dendrogramm zeigt eine ähnliche Aufteilung wie zuvor das Dendrogramm der Lipidprofile. OTU A bildete zusammen mit OTU B und den Stämmen aus Tjärnö Cluster 1. Stamm 6C^T zeigte auch hier einen größeren Abstand zu den anderen Stämmen des OTU B als diese untereinander. Diesbezüglich ist das Ergebnis sowohl den Lipidmustern als auch den MLSA-Daten sehr ähnlich. Cluster 2 besteht hier aus den Stämmen SM35^T, SM23, SM41^T, SM1^T und K587^T. SM35^T, SM23, SM41^T und SM1^T hatten ein sehr ähnliches Phospholipidmuster. K587^T zeigte anhand der Lipidprofile eher Ähnlichkeit zu den Stämmen in Cluster 1, anhand der MLSA ist er allerdings nah mit SM35^T und SM1^T verwandt. Deutlicher unterschieden sich die Stämme CS14^T, WH49^T und SM50^T.

4. Pigmentierung von *Rhodopirellula*-Stämmen

Als typisch für *R. baltica* wurden die rötlich pigmentierten Zellen beschrieben. Die Pigmentierung reichte in den hier untersuchten Zellen von einem sehr leichten Rosa (SM1^T) bis zu einem intensiven Rot (6C^T). Lediglich die Zellen der Stämme des OTU H waren unpigmentiert. Die Pigmentierung war dabei in den meisten Fällen

Ergebnisse und Diskussion

unabhängig von den Wachstumsbedingungen. Lediglich Stamm SM1^T zeigte deutliche Farbveränderungen in Abhängigkeit vom Medium. Konnte die charakteristische rosa Farbe bei Wachstum auf NAcGI-Medium auf Platte sowie in Batch- und Chemostatkulturen in M13-, M13a- und M40-Medium festgestellt werden, so waren die Kolonien bei Wachstum auf M13-Platten farblos.

Die Pigmentierung der Stämme SH1^T, 6C^T, SM41^T, CS96 und SM1^T wurde nach Ethanolextraktion mittels HPLC untersucht. In allen fünf Stämmen wurden drei Hauptkomponenten beobachtet, die Extinktionsmaxima zwischen 460 und 470 nm, 499 und 501 nm (Maximum) und 528 und 533 nm aufwiesen. Stamm SM1^T enthielt ein zusätzliches Hauptpigment, das Extinktionsmaxima bei 425 nm, 452 nm (Maximum) und 480 nm hatte. Extraktion mit Ethanol resultierte in Extrakten mit wesentlich intensiverer Farbe als Extraktionen mit Methanol und Aceton. Methanolextrakte zeigten laut Schlesner (2004) Absorptionsmaxima bei 460, 495 und 520 nm. Er zeigte zudem, dass eine Extraktion des Farbstoffs in Chloroform und Petrolether nicht möglich ist. Auch führte er einen Schwefelsäuretest für polyene Carotinoide durch. Dieser war negativ. Im Gegensatz zu vorherigen Vermutungen (Glöckner et al., 2003) deutet all das darauf hin, dass es sich um kein Carotinoid handelt.

5. Einfluss von Ammonium auf *Rhodopirellula*-Stämme

Für das Wachstum von Bakterien auf Glucose wird Stickstoff zur Biomassenproduktion benötigt. Dabei sind C:N-Verhältnisse von 15:1-10:1 für Glucose und Ammonium optimal für ein gleichmäßiges Wachstum. Den Einfluss des C:N-Verhältnisses auf das Wachstum des *R. baltica* Typstamms SH1 wurde in Batch- und Chemostatkulturen untersucht (Frank et al. 2011, Publikation 1). In Batch-Kulturen entsprach der Glucose- und Ammonium-Konsum C:N-Verhältnissen zwischen 45:1 und 13:1, in ammoniumlimitierten Chemostaten 12:1 und in ammoniumgesättigten und glucoselimitierten Chemostaten 8:1. Eine Erklärung für die extremen C:N-Verhältnisse könnten das Anlegen von Kohlenstoffspeichern und die Synthese von Stickstoffspeicherstoffen bei Ammoniumsättigung sein.

Rhodopirellula wurde in vorherigen Studien immer als sessiler Organismus dargestellt. So deutete eine 2005 veröffentlichte Proteomstudie, für die *R. baltica*

SH1^T auf N-Acetylglucosamin als einzige C:N-Quelle gewachsen ist (=C:N-Verhältnis von 8:1), auf Proteomebene auf keinen weiteren Stickstoffbedarf hin (Gade et al. 2005). In diesen Studien war Stickstoff nicht limitiert. Bei Einführung einer Stickstofflimitierung in Chemostatkultur beobachteten wir eine große Anzahl von freilebenden mobilen Zellen, aber keine anhaftende Zellen. Auch in Batch-Kulturen gab es bei niedrigen Ammoniumkonzentrationen überwiegend einzelne Zellen (Abbildung 9). Mit der überraschenden Beobachtung, dass in Folge von experimenteller Zugabe von Ammonium die Aggregation induziert wurde, befasst sich folgende Analyse.

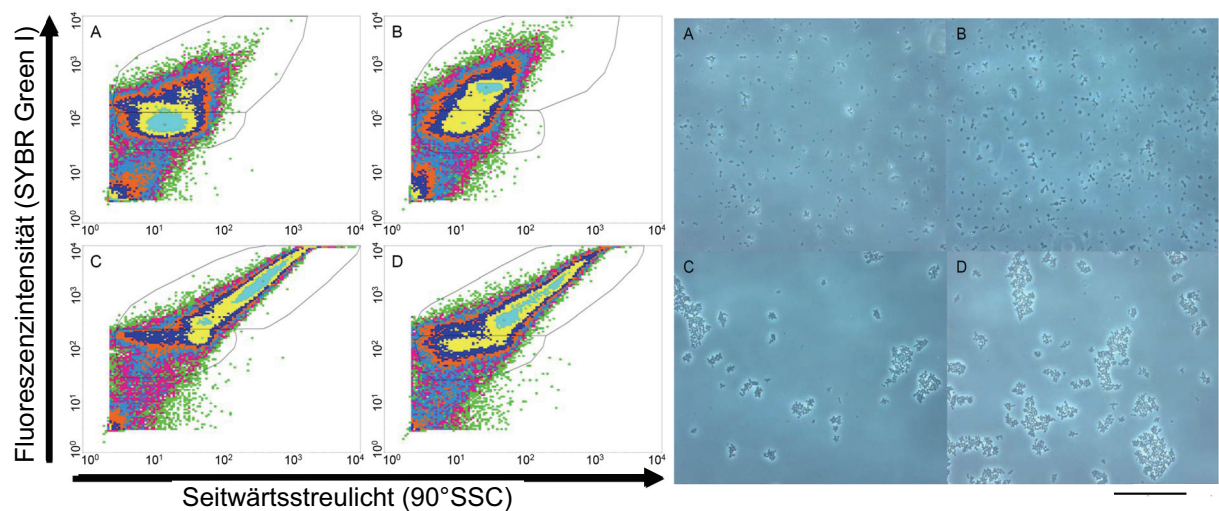


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Daten (links) und die entsprechenden lichtmikroskopischen Bilder (rechts) von *R. baltica* SH1^T. In der mit 1 mM Ammonium gewachsenen Kultur sind nur eine kleine Menge Partikel, die größer als eine Zelle sind, zu sehen (A und B). Größere Partikel wurden in Kulturen gefunden, die mit 4 mM Ammonium wuchsen. Gezeigt werden Proben nach 8 (A und C) bzw. 42 (B und D) Tagen Inkubation. Balken: 50 µm.

5.1. Modell für einen Ammoniumsensor

Ammonium ist ein Kation (NH₄⁺). Es kommt bei pH 9,25 mit Ammoniak im Gleichgewicht vor. Als Gas kann Ammoniak durch Membranen diffundieren. Allerdings macht es bei einem physiologischen pH nur etwa 1% der Gesamtmenge von Ammonium und Ammoniak aus (Andrade und Einsle, 2007). Der größte Teil muss daher aktiv transportiert werden. Dieser wird durch Transporter, beispielsweise

Ergebnisse und Diskussion

der Amt/Mep/Rh-Familie, durchgeführt. Zudem konnte in kürzlich erschienenen Studien eine Kombination von Ammoniak- und Protonenaufnahme nachgewiesen werden (Andrade und Einsle, 2007; Tremblay und Hallenbeck, 2009). Ein Ammoniumschock induziert in Bakterien die Expression des PII-Proteins. Dieses scheint als Trimer am aktiven AmtB-Trimer zu binden und somit auch den aktiven Transport zu inhibieren (Tremblay und Hallenbeck, 2009). Das Genom des *R. baltica* SH1^T enthält zwei Gene für Amt-Transporter und vier Gene für PII-Proteine (RB5003 und RB297 bzw. RB1065, RB2975, RB5005 und RB9794). Die Ammoniumassimilation wird durch ein Zweikomponenten-System, bestehend aus der Sensorkinase NtrB und dem Response-Protein NtrC sowie dem Sigma-Faktor 54 für die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA, gesteuert. In *R. baltica* SH1^T wird der Sigmafaktor durch RB6491, NtrCB durch RB11036 und RB11037 und NtrC durch RB4487 und RB13118 kodiert.

Dieses Netzwerk an Regulatoren scheint allerdings nur ein Teil der Resonanz der Zelle auf Ammoniumsättigung zu sein. Das Fusionsprotein/Sensor-Histidin-Kinase RB10892 eines Amt-Transporters könnte eine separate Reaktion auslösen. Ähnliche hypothetische Sensorkinasen konnten am Beginn des Ammoniumaufnahmeweges einiger andere Planctomyceten gefunden werden, so bei *Planctomyces limnophilus*, *Pirellula staleyi*, *Blastopirellula marina*, *Planctomyces brasiliensis* und *Planctomyces maris*. In anderen Bakteriengruppen scheint es allerdings selten zu sein. Eine *in silico* BlastP-Suche ergab eine Anwesenheit lediglich bei *Lyngbya* sp. PCC8106, *Acarychloris marina*, *Spirochaeta thermophila*, *Vibrio corallilyticus*, *Shewanella violacea* und dem α -Proteobakterium BAL199. Die Charakterisierung des RB10892-Proteins und der Signalkaskade ist eine Aufgabe für die Zukunft. Erste Einsichten werden Expressionsstudien ergeben, für die Zellen bereitgestellt wurden (Klockow et al., unveröffentlicht).

5.2. Die ökologische Dimension

R. baltica SH1^T reagierte auf eine plötzliche Erhöhung der Ammoniumkonzentration von $< 1 \mu\text{M}$ auf 3-4 mM mit einer Zellaggregation. Ein molekulares Modell für die durch den Anstieg der Ammoniumkonzentration über einen bestimmten Grenzwert induzierte Aggregation ist der eben genannte Sensor-Response-Weg. Über eine

Signalkaskade wird die Genexpression von Proteinen, die u.a. zur Ausbildung der Anhaftungssubstanz führen, ausgelöst. Dieser Prozess sollte in naher Zukunft mit Genexpressionsstudien und Proteomstudien näher untersucht werden.

Zu den ökologischen Vorteilen, die der Aggregationszustand mutmaßlich hat, gehört die Reduktion der Oberfläche zum umgebenden Wasser. Damit ist die Diffusion von toxischen Substanzen, aber auch von Nährstoffen, in den Biofilm und die darin befindlichen Zellen begrenzt. Dies kann zu langsamerem Wachstum aber damit verbunden auch zu einer höheren Resistenz gegenüber toxischen Substanzen führen, wodurch Zellen in Biofilmen eine geringere Sensitivität gegenüber diesen aufweisen. Des Weiteren ist es natürlich von Vorteil, an ammoniumreichen Oberflächen im Sediment zu siedeln, wo viel organisches Material und Fermentationsprodukte zu finden sind. Da es sich hier um Sauerstoff-Minimumzonen handelt, wäre eine mikroaerophile Lebensweise von Vorteil. Die Genomdaten unterstützen diese Physiologie: die Atmungskette enthält eine cbb3-Typ-Chinon-Oxidase, die eine hohe Sauerstoffaffinität hat. Allerdings sind weder der bc1-Komplex noch die für aerobe Bakterien sonst typische Cytochrom-c-Oxidase im Genom zu finden. All dies spricht für eine mikroaerophile ökologische Nische, für die eine hohe Ammoniumkonzentration charakteristisch ist. Tatsächlich wurde eine hohe Abundanz an Planctomyceten in den oxischen und mikroaerophilen Bereichen des Wattenmeers gefunden (Musat et al., 2006). Es scheint daher eine Anhaftung an Sandkörner zu geben. Daneben könnte eine Anhaftung an Plankton und marinen Schnee eine Rolle spielen (Morris et al., 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *R. baltica* unter Ammoniumlimitierung einen freischwimmenden Lebensstil bevorzugt, während die Anwesenheit von Ammonium die Aggregation der Zellen und die Anhaftung auslöst. Die genauen Prozesse, die dies steuern, sind bis heute unbekannt, aber ein komplexer Prozess und ein globales Response-Netzwerk, auf das viele Stimuli wirken, könnte eine Rolle spielen.

6. Wachstum von *R. baltica* SH1^T bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen

Auch das Wachstum von *R. baltica* SH1^T unter Phosphatlimitierung wurde in Batch-Kulturen untersucht (Abbildung 10). In einem ersten Versuch mit 5 mM Glucose und 2 mM Ammonium wurden Phosphatgehalte von 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 oder 640 μM verwendet.

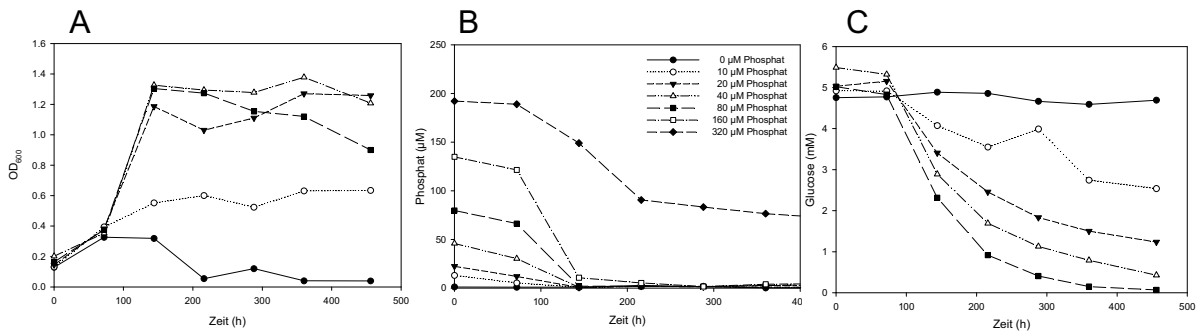


Abbildung 10: Wachstum von *R. baltica* SH1^T mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen. A = Anstieg der optischen Dichte (OD_{600}), B = Änderung der Phosphatkonzentration (μM), C = Änderung der Glucosekonzentration (mM).

Nach sechs Tagen Wachstum wurde in den Kulturen, die 0 bis 160 μM Phosphat enthielten, im Gegensatz zu Kulturen, die 320 und 640 μM Phosphat enthielten, kein gelöstes Phosphat mehr gefunden. Es wurden maximal etwa 140 μM Phosphat aufgenommen. Glucose wurde ab einer initialen Phosphatkonzentration von 80 μM vollständig verbraucht. In Kulturen, die 20 μM Phosphat und weniger enthielten, war das Wachstum sichtbar beeinträchtigt. Die optischen Dichten der 40 und 80 μM Phosphatkulturen lag immer unter 1,4, im Gegensatz zu den Kulturen mit höheren Phosphatgehalten, die optische Dichten von 1,4 bis 1,55 erreichten (Abbildung 10). Insgesamt zeigen diese Experimente eine Phosphataufnahmefähigkeit von 140 μM für eine vollständige Umsetzung von 5 mM Glucose, bei Konzentrationen unter ca. 50 μM Phosphat beginnt eine Phosphatlimitierung der Kultur.

Aufbauend auf diesen Experimenten wurden im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Edgar Büttner (Hochschule Lausitz) Batch- und Chemostatexperimente unter phosphatlimitierten und -gesättigten Bedingungen mit dem Ziel durchgeführt, Unterschiede bei der Proteinexpression zu erkennen und Proteine, die am Phosphatstoffwechsel beteiligt sind, zu identifizieren (Büttner, 2011).

7. Wachstum von *R. baltica* SH1^T unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen

Aufbauend auf der These, dass *Rhodopirellula* im mikroaerophilen, nährstoffreichen Sediment lebt (Musat et al, 2006), wurden mit *R. baltica* SH1^T Wachstumsversuche mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. Das verwendete Medium enthielt 10 mM Glucose und 4 mM Ammonium. Ein Ansatz wurde mit aerobem Medium durchgeführt und drei weitere mit anaerobem Medium unter Zusatz von 25 ml, 5 ml oder 1 ml Luft; dies entspricht Sauerstoffanteilen von 21, 4,2 oder 0,8% in der Gasphase. Der fünfte Ansatz war komplett anaerob, es wurde keine Luft zugegeben. Unter aeroben Bedingungen wurde eine maximale OD₆₀₀ von 1,4 mit 21% O₂, eine maximale OD₆₀₀ von 0,9 mit 4,2% O₂ und eine maximale OD₆₀₀ von 0,3 mit 0,8% O₂ erreicht. Ohne O₂-Zusatz konnte kein Wachstum beobachtet werden. In Sedimenten ist also ein mikroaerophiles Wachstum bis zu einem Sauerstoffanteil von mindestens 4% möglich. Diese Befunde passen sehr gut sowohl zum starken Vorkommen von Planctomyceten im mikrooxischen Sediment im Wattenmeer als auch zum unter Punkt 5.2 erwähnten Vorkommen der cbb3-Typ-Chinon-Oxidase.

8. Definition des Kerngenoms von *R. baltica*

Die genetische Diversität innerhalb der Gattung *Rhodopirellula* und die Identifikation des Kerngenom von *R. baltica* sollte mit Hilfe von Microarrays untersucht werden. Zehn Stämme aus Deutschland, Schweden, Italien und Spanien wurden verwendet (Tabelle 1). SH26, SH28 und SH398 wurden mittels DDH von Schlesner klassifiziert und charakterisiert (Schlesner et al., 2004), Winkelmann klassifizierte die Stämme SWK14, WH46, WH47, 6C^T, SM41^T, SM1^T und SWK7^T mittels DDH und MLSA (Winkelmann et al., 2010). Dementsprechend wurden die Stämme SH26, SH28 und SH398 bzw. SWK14, WH46 und WH47 von Schlesner bzw. Winkelmann der Art *R. baltica* (OTU A) zugeordnet, die Stämme 6C^T, SM41^T, SM1^T dagegen den OTUs B, C, D und F. Es handelt sich um gut charakterisierte Stämme innerhalb der Gattung *Rhodopirellula*.

8.1. Microarraystudien

Der von Wecker und Kollegen (2009) entworfene, konstruierte und validierte Microarray enthielt spezifische Sonden, mit denen alle 7325 ORFs von *R. baltica* SH1^T abgedeckt waren. Da die Methode bisher für die Analyse von mRNA optimiert war, wurde in einem ersten Schritt geprüft, ob diese auch auf genomische DNA (gDNA) anwendbar ist. Für *R. baltica* SH1^T wurde eine durchschnittliche Gengröße von 939 bp angegeben (Glöckner et al., 2003). Aus diesem Grund wurde die gDNA zunächst in bis zu 1000 bp große Stücke zerkleinert und dann auf den Array gespottet. Die Spezifität wurde mit *R. baltica* SH1^T als Positiv- und *B. marina* als Negativkontrolle getestet sowie mit verschiedenen DNA-Gehalten (2 µg und 3,5 µg DNA) und Temperaturen (42°C und 52°C) mit Bezug auf Literaturangaben (Wecker et al., 2009; Tiquia et al., 2004). Sowohl höhere Temperaturen als auch größere DNA-Mengen erwiesen sich als am günstigsten. Die *R. baltica* SH1^T DNA zeigt in > 7000 Spots positive Signale, die von *B. marina* in nur 386 Spots. Letztere erwiesen sich zudem nach vergleichender Analyse der SONDENSEQUENZEN mit dem *B. marina* Genom als unspezifisch. Eine der Hauptbedenken vor Versuchsbeginn war die Gefahr einer Rehybridisierung der gDNA bei Zugabe auf dem Chip gewesen. Die große Zahl positiver Signale zeigte, dass diese Bedenken unbegründet waren.

Um das Kerngenom zu identifizieren, wurde die gDNA der zehn zu untersuchenden Stämme paarweise zusammen mit der gDNA von *R. baltica* SH1^T auf die Chips aufgetragen. Letztere diente dabei als Referenz. Nur Signale, die in beiden Fällen positiv waren, wurden in der weiteren Analyse verwendet. Mit der Hilfe von JCoast und BioVenn wurden die Gene bestimmt, die allen Stämmen gemein sind und solche, die nur mit *R. baltica* SH1^T geteilt werden (Richter et al., 2008; Huslen et al., 2008). Daraus ergab sich für *R. baltica* (OTU A) ein Kerngenom von 3314 Genen. WH47 zeigte 940, SH28 160 und SWK14 156 positive Signale, die nur mit SH1^T übereinstimmten. Die OTUs B, C, D und F zeigten zusätzlich 1168, 114, 5 und 49 Gene, die mit allen Stämmen des OTU A übereinstimmten. Somit wurde eine Abnahme der positiven Signale in Korrelation mit dem abnehmenden Grad an Verwandtschaft beobachtet. Auffällig sind die Schwankungen innerhalb von OTU A. So zeigten WH47 5728, SH26 5685, SH28 4570, SWK14 4066, WH46 3645 und SH398 1816 positive Signale (Tabelle 1, zweite Spalte von rechts). Auffällig ist zudem, dass 6C^T (OTU B) mit 3302 deutlich mehr Übereinstimmungen zu SH1^T hatte als SH398.

Tabelle 1: CDS (zweite Spalte von links) bzw. ORFs auf den Chips (zweite Spalte von rechts), die mit SH1^T übereinstimmen (oberer Tabellenbereich) sowie die errechneten Kerngenome für OTU A (= Art *R. baltica*) und OTU A kombiniert mit den OTUs B, C, D, F (unterer Tabellenbereich). Die unterste Reihe kombiniert alle untersuchten Kerngenome und gibt somit das Kerngenom der Gattung *Rhodopirellula* an. Die Spalte ganz rechts gibt die Anzahl positiver Signale je Chip nur für die Referenz (= SH1^T) an.

Stamm/Gruppe	Proteinkodierende Sequenzen (CDS)	Microarray-Analyse	
		positive ORFs	positive ORFs
SH28	4605	5470	6841
SWK14	4648	4066	6320
WH47	4549	5728	6674
6C ^T	4168	3302	7218
SH398	4342	1816	7246
SM41 ^T	3137	208	7067
SM1 ^T	2977	15	7242
SWK7 ^T	3360	96	7303
OTU A	4232	3314	
OTU A + B	3785	1168	
OTU A + C	2959	114	
OTU A + D	2816	5	
OTU A + F	3154	49	
<i>Rhodopirellula</i>	2214	2	

Eine Hauptproblematik der Microarray-Analyse ist die Varianz in der Anzahl der positiven Spots der Referenz (SH1^T) (Tabelle 1). So waren beispielsweise von 7325 möglichen positiven Signalen auf den SWK14/SH1^T-Chips nur 6320 positiv. Auf den WH47/SH1^T-Chips waren es dagegen 6974 (Tabelle 1, ganz rechte Spalte). Wenn allein für die Referenz 600 Gene weniger als positive gewertet werden, kann dies zu einer Unterrepräsentation der Anzahl positiver Gene für SWK14 führen. Das Ergebnis könnte in Wirklichkeit 10% höher liegen. Ein Blick auf die Anzahl positiver Referenzsignale von Chips, auf die DNA von OTU B, C, D und F Stämmen zugegeben wurde, zeigte zudem, dass die Signalintensität des Typstamms vergleichsweise höher war. Ein Grund dafür könnte eine Hybridisierung sehr ähnlicher Sequenzen miteinander sein, da die Stämme des OTU A näher mit *R. baltica* SH1^T verwandt sind als die Stämme der anderen OTUs. Durch diese erhöhte Konkurrenz zur Sonden-DNA bindet weniger DNA an die Sonden, was zu einem schwächeren Signal führt.

Ergebnisse und Diskussion

Vorherige Microarray-Experimente mit Umweltproben, die mit gDNA und PCR-amplifizierter Ziel-DNA durchgeführt wurden, zeigten, dass es bei Hybridisierungstemperaturen von 50°C oder höher zu keinen Kreuzhybridisierungen kommt und das Signal-Rausch-Verhältnis niedrig ist (Tiquia et al., 2004). Des Weiteren kann die Signalintensität, wenn DNA aus Reinkulturen vorliegt, durch die Verwendung erhöhter DNA-Mengen von 5 (Wu et al., 2004) bzw. 8 ng (Tiquia et al., 2004) intensiviert werden. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen eingesetzter gDNA-Menge und Signalintensität. Wu und Kollegen (2004) erreichten mit 55°C und 50% Formamid eine gute Klassifikation auf Artebene, für eine Klassifikation auf Stammebene waren Temperaturen zwischen 65 und 75°C nötig.

8.2. Genomsequenzierung

Die Genome der Stämme SH28, SWK14, WH47, 6C^T, SH398, SM41^T, SM1^T und SWK7^T wurden mittels 454-Pyrosequencing sequenziert. Um anhand der Genomdaten eine Aussage über die Verwandtschaft dieser Stämme machen zu können, wurde die durchschnittliche Nukleotididentität (ANI, Altschul et al., 1997) ihrer DNA berechnet. Mit einer ANI über der Artgrenze von 94% wurde dabei die Zugehörigkeit von WH47 (97,35%ANI), SH28 (97,05%ANI) und SWK14 (97,25%ANI) zur OTU A bestätigt. Die Stämme SH398 und 6C^T waren mit 95,84%ANI am nächsten miteinander verwandt. Dagegen war die ANI von SH398 zu SH1^T nur 88,48%. Dies deutet, im Gegensatz zu der von Schlesner (2004) mit DDH durchgeführten Zuordnung zu OTU A, auf eine Zugehörigkeit von SH398 zu OTU B hin. Die Ergebnisse wurden mit einer neuen DDH bestätigt, die Sequenzähnlichkeiten von SH398 zu SH1^T bzw. 6C^T von 49,3 bis 58,9% bzw. 75 bis 75,1% ergab. Damit wurde SH398 in OTU B reklassifiziert. Für SM41^T bzw. SM1^T und SWK7^T wurden geringere ANI-Werte von 70,47 bzw. 70,42 und 68,72% errechnet.

Zur Bestimmung des Kerngenoms wurde ermittelt, wie viele proteinkodierende Sequenzen (CDS für coding sequences) die acht sequenzierten Stämme mit *R. baltica* SH1^T teilen (Tabelle 1, zweite Spalte von links). Dies waren für SWK14, SH28, WH47, SH398, 6C^T, SWK7^T, SM41^T und SM1^T je 4648, 4605, 4549, 4342, 4168, 3360, 3137 oder 2977 Sequenzen. *B. marina* als nächster Verwandter der Gattung dagegen teilte nur 2095 CDSs mit *R. baltica* SH1^T. Entsprechend enthielten

die Kerngenome der OTU A 4232 CDSs, die der OTU A zusammen mit OTU B bzw. OTU C, D oder F dagegen 3785 bzw. 2959, 2816 oder 3154 CDSs. Dies entspricht einer Kerngenomgröße der Art *R. baltica* von 4232 Genen und der Gattung *Rhodopirellula* von 2214 Genen. Die Anzahl der CDSs stieg bei zu OTU A und B gehörenden Stämmen mit einer steigenden prozentualen Identität zu SH1^T-CDSs. Zwischen 96,8 (=SWK14) und 97,8% (=WH47; SH28=97,4%) der CDSs von OTU A zeigten Identitäten > 90%, bei OTU B variierte dieser Wert zwischen 76,5 und 76,8%. Für die CDSs der Stämme SM41^T, SM1^T und SWK7^T ergab sich kein klares Muster.

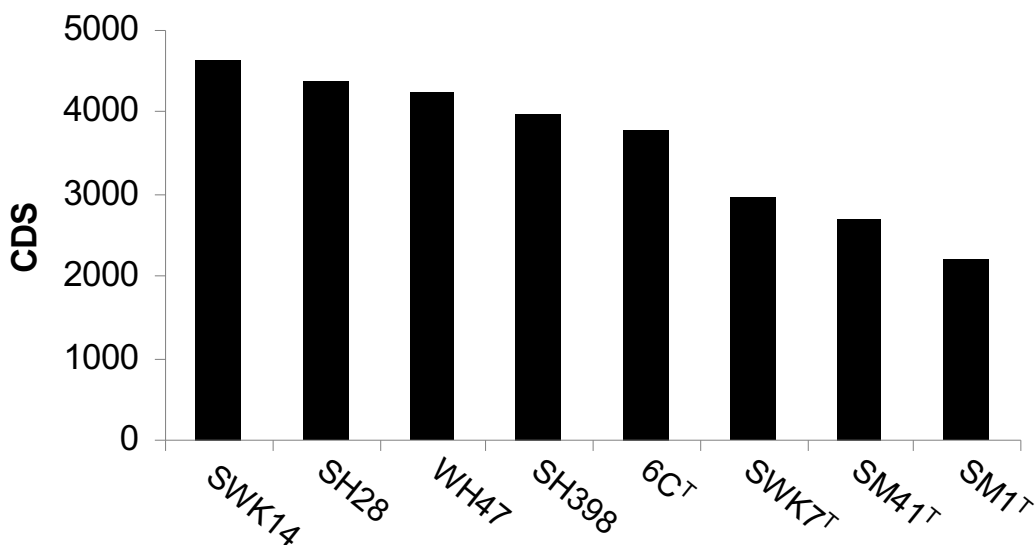


Abbildung 11: Gemeinsame Gene. Die erste Säule gibt die Anzahl der Gene wieder, die sowohl in SH1^T als auch in SWK 14 gefunden wurden, die zweite Säule die Anzahl der in SH1^T, SWK14 und SH28 gefundenen Gene usw.

8.3. Vergleich der Ergebnisse aus Microarray- und Genomanalyse

Die Genome wurden in erster Linie sequenziert, um die Verwendbarkeit der Microarrays zur Kerngenomanalyse zu validieren. Daher wurde die Sequenzähnlichkeiten *in silico* durch Vergleich der *R. baltica* SH1^T-Sondensequenzen mit den Sequenzen der Gene auf den Draftgenomen ermittelt. Als Resultat stieg bei OTU A und B Stämmen die Anzahl positiver Gene mit steigender Sequenzähnlichkeit.

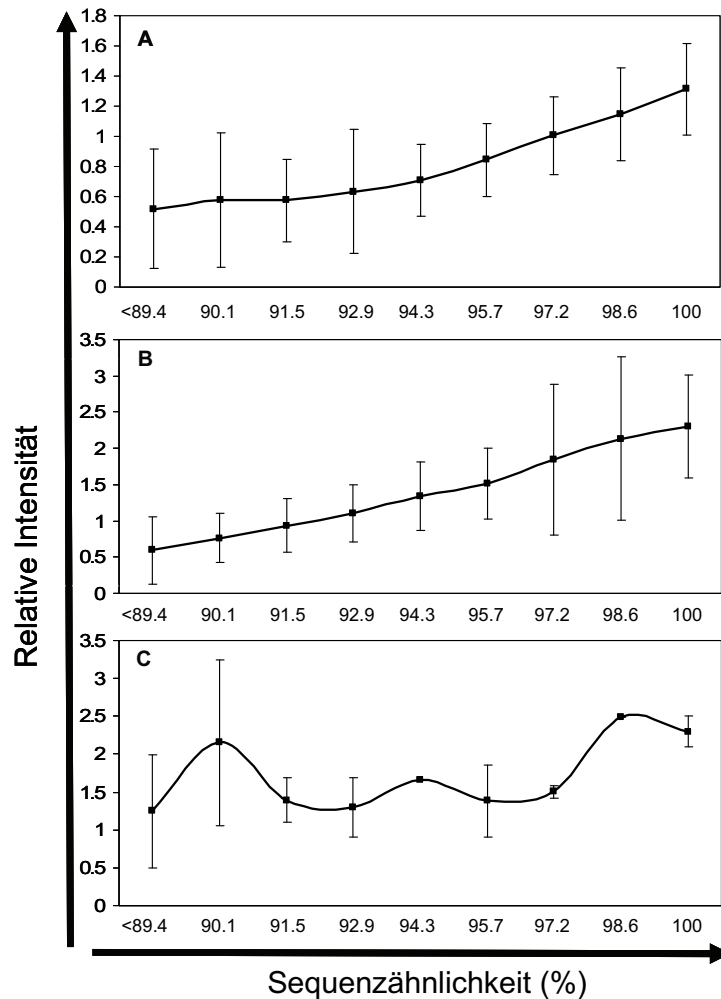


Abbildung 12: Relative Signalintensitäten (Teststamm gegen SH1^T) gemäß Microarray-Analyse, aufgetragen gegen die Sequenzähnlichkeit (%), die sich für jede Sonde auf dem jeweiligen Chip ergibt, wenn sie *in silico* auf ihre entsprechenden Gene auf den Draftgenomen binden. Gezeigt werden die Ergebnisse für die Stämme WH47 (A), 6C^T (B) und SWK7^T (C).

Des Weiteren wurden für alle Stämme die relativen Signalintensitäten, d.h. die Intensitäten der jeweiligen Probe (gDNA zu testendem Stamm) geteilt durch die Signalintensitäten der Referenz (gDNA von SH1^T) aus den Arrays berechnet. Diese wurden gegen die berechneten Sequenzähnlichkeiten aufgetragen (Abbildung 12). Innerhalb von OTU A stiegen die relativen Signalintensitäten linear zu den Sequenzähnlichkeiten an, beginnend mit 94%ANI, was auf eine Korrelation zwischen beiden im Bereich höherer Genkonserviertheit spricht und die Verwendbarkeit der Microarrays für die Kerngenomanalyse bestätigt. Ähnliches wurde auch in vorherigen Experimenten gezeigt, in denen ein starker Anstieg der Signalintensitäten für Sonden

ab einer Sequenzähnlichkeit von über 90% zur Ziel-DNA gezeigt werden konnte (Tiquia et al., 2004). Die Standardabweichungen lagen im Bereich des linearen Anstiegs ab 94%ANI bei +/- 0,2, unter 94% ist sie höher und liegt bei +/- 0,5. Die Graphen für OTU B zeigen fast lineare leichte Anstiege der Signalintensitäten zwischen 90 und 97%ANI, ab 98%ANI tritt eine Sättigung auf. Auch hier ist also noch eine Korrelation zwischen Signalintensitäten und Sequenzähnlichkeiten erkennbar. Etwas problematisch sind die höheren Standardabweichungen zwischen +/- 0,3 bis über +/- 1, die v.a. im Bereich höherer Sequenzähnlichkeiten besonders hoch ist. Bei den Stämmen SM41^T, SM1^T und SWK7^T konnte keine Korrelation von Signalintensitäten und Sequenzähnlichkeiten beobachtet werden. Dies deutet auf eine gute Verwendbarkeit des Microarray innerhalb der Art *R. baltica* hin, eine limitierte Verwendbarkeit bei eng Verwandten Stämmen (> 88%ANI) und eine schlechte Verwendbarkeit bei nicht so nah verwandten Stämmen.

Schaut man sich die Anzahl an CDSs an, so zeigen sich auch hier Parallelen zu den Microarray-Daten. Die Ergebnisse zu OTU A zeigen einen Anstieg der positiven Signale bei Genomsequenzierung, Microarray und CDS mit einer steigenden Sequenzähnlichkeit der Sonden-DNA zu den entsprechenden Genen auf den Draftgenomen. Bei allen anderen Stämmen ist dies nicht der Fall. Hier hat der größte Teil der Gene Ähnlichkeiten < 90%.

Es ergab sich ein Gesamtanteil von zum Kerngenom gehörigen Genen von 45% für OTU A nach Microarray-Analyse und 58% nach Analyse der CDS bei einer Gesamtzahl von 7325 Genen im Genom von *R. baltica* SH1^T. Dies entspricht einer Abweichung von 13%. Genomische Analysen mit *E. coli* bzw. *Helicobacter pylori* ergaben Kerngenome, die 55-60% bzw. an 66% des Gesamtgenome ausmachten (Konstantinidis und Tiedje, 2005; Dong et al., 2009).

Zusammen mit den vorherigen Ergebnissen kommt man somit zu dem Schluss, dass die Microarrays sehr gut für nah verwandte Stämme funktionieren, die zur gleichen Art gehören (OTU A).

Die Beobachtung, dass Microarrays sehr gut funktionieren, um verschiedene Arten voneinander, nicht aber um Stämme innerhalb einer Art zu unterscheiden, wurde bereits in Experimenten mit beispielsweise *Bifidobacterium*-Stämmen gezeigt (Boesten et al, 2009)

Ergebnisse und Diskussion

Um einen Eindruck über den Inhalt der Kerngenome zu bekommen, wurde eine KEGG-Orthologie durchgeführt und die funktionelle Verteilung der Gene innerhalb der Kerngenome angeschaut.

Ein Vergleich der Kerngenome untereinander zeigt, dass die Verteilung sehr ähnlich ist. Auch ist bei der Verteilung zwischen den ORFs eines Kerngenoms und denen außerhalb des Kerngenoms kein Unterschied erkennbar. In jedem Fall sind über 60% der Gene im Stoffwechsel involviert. Nur das OTU A/OTU C-Kerngenom enthält vergleichsweise viele Metabolismusgene und wenige, die an der genetischen Informationsverarbeitung (genetic information processing) beteiligt sind. Das OTU A/OTU D-Kerngenom enthält nur Gene, die an der genetischen Informationsverarbeitung beteiligt sind. Dies liegt aber mit großer Wahrscheinlichkeit an der geringen Anzahl von nur fünf enthaltenen Genen. Die Verteilung der Gesamtheit der stammspezifischen ORFs untereinander zeigt ähnliche Ergebnisse. Größere Abweichungen gibt es nur bei den Stämmen SM41^T, SM1^T und SWK7^T. Eine Tabelle mit einer ausführlichen Verteilung befindet sich in Publikation 3. Ein Vergleich der KEGG-Verteilung in den Genomen zeigt ebenfalls ein sehr homogenes Bild sowohl zwischen den neu sequenzierten Stämmen untereinander als auch zu *R. baltica* SH1^T, *B. marina*, *P. staley* und *P. maris* (Abbildung 13). Ein Vergleich mit *E. coli* und *B. subtilis* zeigt, dass diese im Verhältnis einen höheren Anteil von Genen haben, die an genetischer Informationsverarbeitung beteiligt sind. Außerdem ist sehr auffällig, dass der Anteil der ORFs ohne zugewiesene Funktion bei allen Planctomyceten, auch bei solchen mit vollständigem Genom wie *R. baltica* SH1^T, sehr hoch ist. Ein Vergleich der KEGG-Verteilung in den Genomen mit denen der Microarray-Daten führt zu dem Schluss, dass die meisten Unterschiede, die sich dort zwischen den Stämmen ergeben haben, eine Konsequenz zu weniger positiver Signale auf den Chips ist. Stamm- oder artspezifische Muster konnten nicht beobachtet werden. Eine vorherige Studie mit *Helicobacter pylori* Stämmen zeigte, dass das Kerngenom in erster Linie Gene enthält, die an metabolischen und zellulären Prozessen beteiligt sind, wohingegen sich außerhalb des Kerngenoms Restriktions- und Modifikationsgene, Transposasen und Gene, die für Zelloberflächenproteine kodieren, befinden. Zu letzteren zählen demnach in erster Linie Gene, mit deren Hilfe die Bakterien auf sich ändernde Umwelteinflüsse reagieren können (Borneman et al., 2010; Salama et al., 2000).

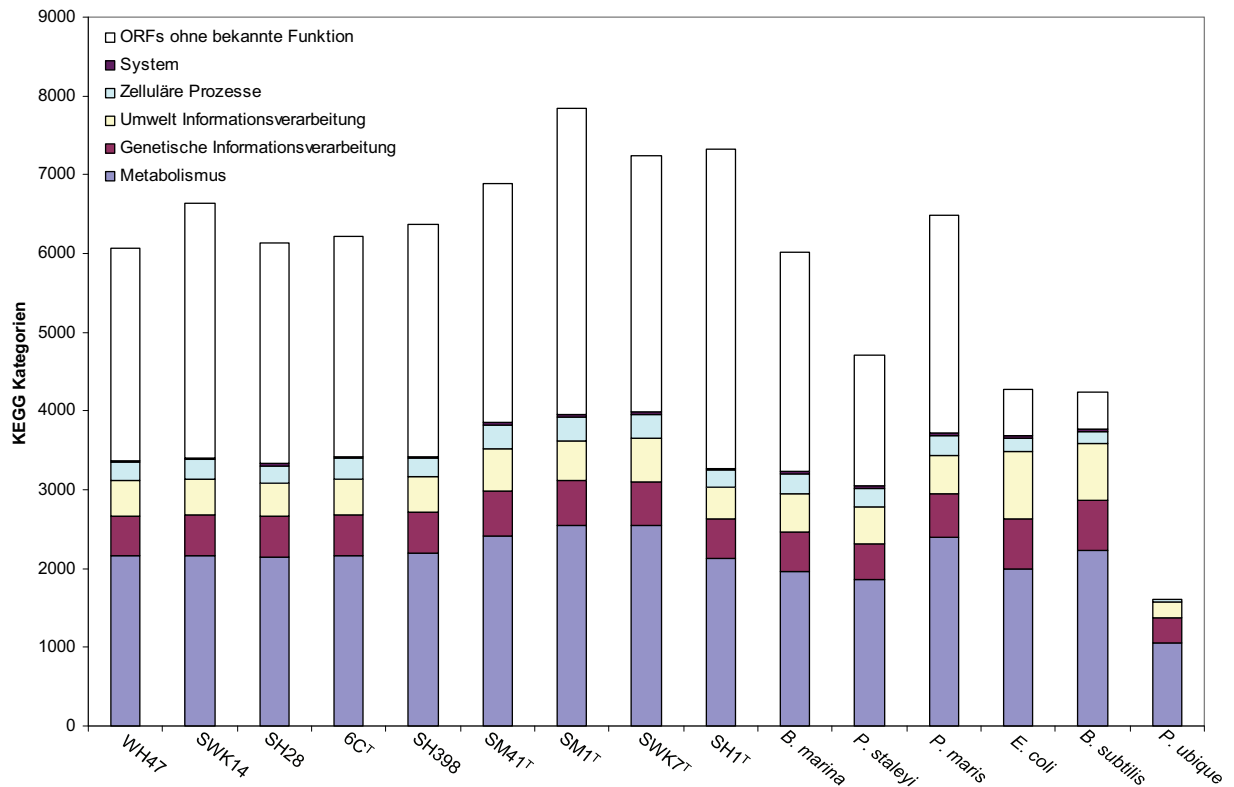


Abbildung 13.: KEGG-Verteilung auf allen untersuchten Genomen sowie Referenzgenomen. Über 4000 ORFs konnte eine spezifische Funktion zugeordnet werden.

Mit Hilfe der vergleichenden Genomik wurde ein Kerngenom von 4232 (58%) Genen für die Art *Rhodopirellula baltica* errechnet und von 2214 (30%) Genen für die Gattung *Rhodopirellula*. Ein Vergleich mit Kerngenomen anderer Bakterien ist schwierig, da die Größe eines Kerngenoms immer von der Anzahl und Diversität der untersuchten Bakterien abhängt. Ein Vergleich von acht *E. coli* Stämmen miteinander zeigte, dass 56% der Gene konserviert sind und damit eine ähnliches Ergebnis (Konstantinidis und Tiedje, 2004). Bei *Helicobacter pylori*, dessen Genom allerdings nur 1590 ORFs enthält, waren es 70% (Dong et al., 2009). Diese wesentlich höhere Übereinstimmung kann auf die homogenen Bedingungen in ihrem Lebensraum zurückgeführt werden. In einer Untersuchung an Cyanobakterien wurden 42% des Genoms als konserviert angegeben, wobei eine Schwankung von 25-66% auftrat, die weitgehend auf die stark verschieden großen Genome der untersuchten Stämme zurückgeführt wurde (Mulkidjanian et al., 2006). 88% der im Kerngenom kodierten Proteine stimmten mit anderen Bakteriengruppen überein und enthielten größtenteils Haushaltsgene bzw. am Energiemetabolismus, Replikation und Proteinbiosynthese beteiligte Gene. Dies bestätigt sich auch für *Rhodopirellula*.

9. G+C-Gehalt

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen genotypischen Methoden (Winkelmann 2010), wurde der G+C-Gehalt aller 17 Stämme gemessen (Mesbah et al., 1989). Die Stämme hatten G+C-Gehalte zwischen 53 und 60 mol%. Hieraus lässt sich auf eine genetische Vielfalt, die größer als eine einzelne Art ist, schließen. Bei den Stämmen der OTU A wurden Werte im Bereich zwischen 55 mol% (*R. baltica* SH1^T; WH47: 55 mol%) und 58 mol% (SWK14) gemessen. Die Werte der Stämme des OTU B schwankten zwischen 55 und 56 mol%, die Werte für OTU H lagen zwischen 56 und 57 mol%. Die Werte aller weiteren Stämme wichen um nicht mehr als drei Prozent von denen des *R. baltica*-Typstamms SH1 ab. Einzige Ausnahme ist der Stamm SM50, für den ein G+C-Gehalt von 60 mol% gemessen wurde. Dies spricht dafür, dass dieser Stamm einer anderen Gattung angehört, da die Abweichung innerhalb einer Art nicht höher als 3 mol% und innerhalb einer Gattung nicht höher als 10 mol% betragen sollte (Vandamme et al., 1996). Der Umstand, dass die nächsten Verwandten von *R. baltica*, *B. marina* und *P. staley* G+C-Gehalte zwischen 54 und 57 mol% bzw. 57 und 60 mol% aufweisen, verstärkt diese These (Schlesner et al., 2004; Staley et al., 1992). Während der Genomsequenzierungen der acht Genome, wurden ebenfalls die G+C-Gehalte der Stämme berechnet. Diese variieren in nur sehr geringem Maße von den nach Mesbah gemessenen G+C-Gehalten. Nur die Werte der Stämme SWK14 (58 mol%), SM41^T (55 mol%), SM1^T (57 mol%) und SWK7^T (53 mol%) wichen um mehr als 0,5 mol% von diesen ab (Publikation 2).

10. Stammdifferenzierung und Benennung neuer Arten

Basierend auf diesen Ergebnissen, erfolgte die Benennung des neuen Genus *Rhodopilula* gen. nov. mit der Art *Rhodopilula apulia* sp. nov. und der zehn neuen *Rhodopirellula* Arten *Rhodopirellula europaea* sp. nov., *Rhodopirellula sallentina* sp. nov., *Rhodopirellula maiorica* sp. nov., *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov., *Rhodopirellula gimesia* sp. nov., *Rhodopirellula syltensis* sp. nov., *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov., *Rhodopirellula clava* sp. nov., *Rhodopirellula magna* sp. nov. und *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov.. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme, deren Herkunft und Verwandtschaftsverhältnisse.

Tabelle 2: Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme im Vergleich. OTU-Nomenklatur nach Winkelmann et al. (2010). +, positiv = über 98,7% 16S rRNA-Genidentität zu SH1^T. Die angegebenen DDH- und %ANI-Werte geben die Genidentitäten eines Stammes zu SH1^T an.

Art	Stamm	OTU	16s rRNA Genidentität (%)	G+C-Gehalt (mol%)			%ANI Projekt 3	DDH (%) Projekt 3	Projekt	Ort der Probenahme	Land
				Projekt 2	Projekt 3	Winkelmann et al., 2010					
<i>Rhodopirellula baltica</i>	SH1 ^T	A	+	55	55	55			1, 2, 3	Kieler Bucht	Deutschland
<i>Rhodopirellula baltica</i>	SH26	A	+						3	Kieler Bucht	Deutschland
<i>Rhodopirellula baltica</i>	SH28	A	+		55		97		3	Kieler Bucht	Deutschland
<i>Rhodopirellula baltica</i>	SWK14	A	+	58	55		97		2, 3	Tjörnö	Schweden
<i>Rhodopirellula baltica</i>	WH46	A	+						3	Sylt	Deutschland
<i>Rhodopirellula baltica</i>	WH47	A	+	55	55		97		2, 3	Sylt	Deutschland
<i>Rhodopirellula europaea</i>	6C ^T	B	+	55	56	55	88		1, 2, 3	Porto Cesareo	Italien
<i>Rhodopirellula europaea</i>	SH398	B	+		56	54	89	49,3-58,9	3	Kieler Bucht	Deutschland
<i>Rhodopirellula europaea</i>	CS115	B	98	56					2	Piräus Kavos	Griechenland
<i>Rhodopirellula europaea</i>	K1070	B	+	55		55			2	Helgoland	Deutschland
<i>Rhodopirellula sallentina</i>	SM41 ^T	C	97	55	57	55	71		1, 2, 3	San Cataldo	Italien
<i>Rhodopirellula sallentina</i>	CS96	C	97	57		56			1, 2	San Cataldo	Italien
<i>Rhodopirellula maiorica</i>	SM1 ^T	D	95	57	55		70		1, 2, 3	Pt Andratx Mallorca	Spanien
<i>Rhodopirellula flandrensis</i>	K587 ^T	E	95	56			69		2	Oostende	Belgien
<i>Rhodopirellula gimesia</i>	SWK7 ^T	F	98	53	56			9,5-9,8	2, 3	Tjörnö	Schweden
<i>Rhodopirellula syltensis</i>	WH49 ^T	G	96	56					2	Sylt	Deutschland
<i>Rhodopirellula philippinensis</i>	SM35 ^T	H	95	58					2	Bohol Panglao Beach	Philippinen
<i>Rhodopirellula philippinensis</i>	SM23	H	94	57					2	Bohol Panglao Beach	Philippinen
<i>Rhodopirellula clava</i>	CS14 ^T	J	96	53					2	Brest	Frankreich
<i>Rhodopirellula magna</i>	SWK13 ^T	N	97	54					2	Tjörnö	Schweden
<i>Rhodopirellula bahusiensis</i>	SWK21 ^T	O	+	55					2	Tjörnö	Schweden
<i>Rhodopilula apulia</i>	SM50 ^T	M	93	60					2	San Cataldo	Italien
<i>Blastopirellula marina</i>	DSM3645 ^T		88	57	65					Kieler Bucht	Deutschland
<i>Pirellula staleyi</i>	DSM6068 ^T		85	57	65					Lake Lansing, Michigan	USA

11. Ausblick

Die Sequenzierung von acht *Rhodopirellula*-Genomen eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein kleiner Überblick über den funktionellen Aufbau der Genome gegeben werden. Hier sollte eine wesentlich detailliertere Analyse folgen. Zudem wurden die Kerngenome basierend auf Microarray- und CDS-Analyse nur oberflächlich anhand der enthaltenen Genanzahl verglichen. Wünschenswert wäre ein genauerer Vergleich. Sind die mit den beiden unterschiedlichen Methoden berechneten Kerngenome und die stammspezifischen Genome deckungsgleich? Welche Gene und Gengruppen sind besonders konserviert, welche nicht?

Die Kombination mit bei der Stammbeschreibung erhaltenen Daten ist naheliegend. Spiegeln sich die Ergebnisse auf dem Genom wieder?

Hier ist sicherlich auch ein genauerer Blick auf die an der Ammonium/Stickstoff-Aufnahme und Regulation beteiligten Gene sinnvoll beispielweise durch Isolation, Überexpression und Charakterisierung des beschriebenen beteiligten Zweikomponentensystems. In diesem Zusammenhang muss auch das Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen gesehen werden.

Die Informationen über die Genome erlauben auch ein genaueres Primerdesign. Um die Biogeographie (Winkelmann, 2009) detaillierter beschreiben zu können, sollen unterschiedliche neue degenerierte Primer designt werden und *Rhodopirellula*-Stämme in Umweltproben kulturunabhängig nachgewiesen werden.

Schließlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Pigmentierung untersucht. Alles spricht für ein bisher unbekanntes Pigment. Massenspektroskopische Untersuchungen und eine Strukturanalyse sollten hier Aufschluss geben. Von großer Wichtigkeit ist hier auch die Frage des Einflusses der Wachstumsbedingungen auf die Pigmentierung. Hier konnten Unterschiede beobachtet werden.

Zu guter Letzt besteht immer noch die Frage nach dem Aufbau und der Funktion des Pirellulosoms.

C. Literatur

- Abel, K. H., De Schmertzing, H., und J. I. Peterson.** 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. *J. Bacteriol.* **85**:1039-1044.
7796-7806.
- Abraham, W. R., H. Meyer, S. Lindholst, M. Vancanneyt, and J. Smit.** 1997. Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter* sensu lato, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **20**:522-539.
- Abraham, W. R., C. Strompl, H. Meyer, S. Lindholst, E. R. B. Moore, R. Christ, M. Vancanneyt, B. J. Tindall, A. Bennasar, J. Smit, and M. Tesar.** 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:1053-1073.
- Alizadeh, A. A. and L. M. Staudt.** 2000. "Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells." *Curr. Opinion Immun.* **12**: 219-225.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.
- Andrade S. L. A., O. Einsle.** 2007. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol Membr Biol* **24**:357–365.
- Armitage J.** 2006. Bacterial behavior. In: **Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. (eds).** *The prokaryotes, vol 1*, 3rd edn. Springer, New York, pp 102–139.
- Avarre, J. C., P. de Lajudie, and G. Bena.** 2007. Hybridization of genomic DNA to microarrays: A challenge for the analysis of environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* **69**:242-248.
- Amersham,** 2002. *Microarray Handbook*, Amersham Biosciences.
- Bauld, J. and J. T. Staley.** 1976. *Planctomyces maris* sp. nov.: A marine isolate of *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. *Journal of General Microbiology* **97**:45-55.

Literatur

- Bengtsson, M. M., and L. Ovreas.** 2010. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *BMC Microbiology* **10**:261
- Bodrossy, L., and A. Sessitsch.** 2004. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Current Opinion in Microbiology* **7**:245-254.
- Boesten, R. J., F. H. J. Schuren, and W. M. de Vos.** 2009. A *Bifidobacterium* mixed-species microarray for high resolution discrimination between intestinal bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **76**:269-277.
- Bondoso, J., L. Albuquerque, M. F. Nobre, A. Lobo-da-Cunha, M. S. Dacosta, and O. M. Lage.** 2011. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov. A novel planctomycete isolated from a freshwater aquarium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 10.1099/ijs.0.027474-0.
- Bontemps, C., G. Golfier, C. Gris-Liebe, S. Carrere, L. Talini, and C. Boivin-Masson.** 2005. Microarray-based detection and typing of the rhizobium nodulation gene nodC: Potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:8042-8048.
- Borneman, A. R., E. J. Bartowsky, J. McCarthy, and P. J. Chambers.** 2010. Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:681-691.
- Boumann, H. A., E. C. Hopmans, I. van de Leemput, H. J. M. Op den Camp, J. van de Vossenberg, M. Strous, M. S. M. Jetten, J. S. S. Damste, and S. Schouten.** 2006. Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups. *FEMS Microbiology Letters* **258**:297-304.
- Brümmer, I. H. M., W. Fehr, I. Wagner-Döbler.** 2000. Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3078-3082.
- Brümmer, I. H. M., A. D. M. Felske, I. Wagner-Döbler.** 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5094–5101.
- Büttner, E.,** 2011. Charakterisierung der Phosphatlimitation bei *Rhodopirellula baltica* SH1^T. Bachelorarbeit, Hochschule Lausitz.

- Canillac, N., M. T. Pommier, and A. M. Gounot.** 1982. Effect of incubation-temperature on lipid-composition of *Arthrobacter* and *Corynebacterium*. *Canadian Journal of Microbiology* **28**:284-290.
- Cho, J. C., and J. M. Tiedje.** 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3677-3682.
- Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of genus *Vibrio* - numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* **104**:410-433.
- Costerton, J. W., R. J. Irvin, K. J. Cheng.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**:299–324.
- Dabin, J., M. Jam, M. Czjzek, and G. Michel.** 2008. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the polysaccharide lyase RB5312 from the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **64**:224-227.
- Damste, J. S. S., M. Strous, W. I. C. Rijpstra, E. C. Hopmans, J. A. J. Geenevasen, A. C. T. van Duin, L. A. van Niftrik, and M. S. M. Jetten.** 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**:708-712.
- da Silva, V. S., C. S. Shida, F. B. Rodrigues, D. C. D. Ribeiro, A. A. de Souza, H. D. Coletta-Filho, M. A. Machado, L. R. Nunes, and R. C. de Oliveira.** 2007. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. *BMC Genomics* **8**:474.
- Dong, Q. J., Q. Wang, Y. N. Xin, N. Li, and S. Y. Xuan.** 2009. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* **15**:3984-3991.
- Dworkin M.** 2006. Prokaryotic life cycles. In: **Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt (eds)** *The prokaryote*, vol 1, 3rd edn. Springer, New York, pp 140–166.
- Eiler, A., S. Bertilsson.** 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* **6**: 1228–1243.

Literatur

- Fagerbakke K. M., Heldal M., Norland S.** 1996. Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquat Micro Ecol* **10**:15–27.
- Feit I. N., 1988.** Ammonia can stimulate or inhibit aggregate density in *Dictyostelium mucoroides*: A quantitative test of the hypothesis that ammonia is the aggregation-suppressing gas. *Developmental Genetics* **9**:639-652.
- Frank, C. S., P. Langhammer, B. M. Fuchs, and J. Harder.** 2011. Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*. *Archives of Microbiology* **193**:365-372.
- Fredrickson, H. L., T. E. Cappenberg, and J. W. Deleeuw.** 1986. Polar lipid ester-linked fatty acid composition of Lake Vechten seston - an ecological application of lipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **38**:381-396.
- Fuerst, J. A., H. G. Gwilliam, M. Lindsay, A. Lichanska, C. Belcher, J. E. Vickers, and P. Hugenholtz.** 1997. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:254-262.
- Fuerst, J. A.** 2005. Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annual Review of Microbiology* **59**:299-328.
- Fuerst, J. A., E. Sagulenko.** 2011. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat Rev Microbiol* **9**:403-13.
- Fukunaga, Y., M. Kurahashi, Y. Sakiyama, M. Ohuchi, A. Yokota, and S. Harayama.** 2009. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov and *Phycisphaerae* classis nov in the phylum *Planctomycetes*. *Journal of General and Applied Microbiology* **55**:267-275.
- Gade, D., H. Schlesner, F. O. Glockner, R. Amann, S. Pfeiffer, and A. Thomm.** 2004. Identification of planctomycetes with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. *Microbial Ecology* **47**:243-251.
- Gade, D., T. Stuhmann, R. Reinhardt, and R. Rabus.** 2005. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. *Environmental Microbiology* **7**:1074-1084.
- Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson, and J. Swings.** 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**:733-739.

- Gimesi, N.** 1924. Hydrobiological tanulmányok [hydrobiological studies]. *Planctomyces bekefii* Gim. nov. gen. et sp. [Hungarian with German translation]. Budapest: Kiadja a Magyar Cizterci:1-8.
- Glockner, F. O., M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, and R. Reinhardt.** 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp strain 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:8298-8303.
- Goldfine, H.** 1984. Bacterial membranes and lipid packing theory. Journal of Lipid Research **25**:1501-1507.
- Goldfine, H., and P. O. Hagen.** 1968. N-methyl groups in bacterial lipids .3. Phospholipids of *Hyphomicrobia*. Journal of Bacteriology **95**:367-375.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD.** 1985. Nile red - A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J. Cell Biol **100**: 965-973
- Guckert, J. B., D. B. Ringelberg, D. C. White, R. S. Hanson, and B. J. Bratina.** 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the *Proteobacteria*. Journal of General Microbiology **137**:2631-2641.
- Hall, P. O., and R. C. Aller.** 1992. Rapid, small-volume, flow-injection analysis for CO₂ and NH₄⁺ in marine and fresh-waters. Limnology and Oceanography **37**:1113-1119.
- Hayes, A., N. Zhang, J. Wu, P. R. Butler, N. C. Hauser, J. D. Hoheisel, F. L. Lim, A. D. Sharrocks and S. G. Oliver.** 2002. Hybridization array technology coupled with chemostat culture: tolls to interrogate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Methods **26**: 281-290.
- Hieu, C. X., B. Voigt, D. Albrecht, D. Becher, T. Lombardot, F. O. Glockner, R. Amann, M. Hecker, and T. Schweder.** 2008. Detailed proteome analysis of growing cells of the planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T. Proteomics **8**:1608-1623.
- Hirsch, P., and M. Müller.** 1985. *Planctomyces limnophilus* sp. nov., a stalked and budding bacterium from freshwater. Syst. Appl. Microbiol. **6**:276-280.
- Hoskisson, P. A. and G. Hobbs.** 2005. Continuous culture - making a comeback? Microbiology **151**: 3153-3159.

Literatur

- Hu, P., E. L. Brodie, Y. Suzuki, H. H. McAdams and G. L. Andersen.** 2005. "Wholegenome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*." J Bacteriol **187**: 8437-49.
- Hulsen, T., J. de Vlieg, and W. Alkema.** 2008. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. BMC Genomics **9**:488.
- Ihssen, J. and T. Egli.** 2004. Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli* Microbiology **150**: 1637-1648.
- Ivanova, A. O., Dedysh, S. N.** 2006. High abundance of *Planctomycetes* in anoxic layers of a *Sphagnum* peat bog. Microbiology (Engl. Transl. of Mikrobiologiya) **75**: 716-719.
- Kapuscinski J.** 1995 DAPI - A DNA-specific fluorescent probe. Biotech. Histochem **70**: 220-233
- Kaneda, T.** 1972. Positional reference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. Biochimica Et Biophysica Acta **280**:297-305.
- Kates, M.** 1964. Bacterial Lipids. Advances in Lipid Research **2**:17-90.
- Kohring, L. L., D. B. Ringelberg, R. Devereux, D. A. Stahl, M. W. Mittelman, and D. C. White.** 1994. Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiology Letters **119**:303-308.
- Koide, T., P. A. Zaini, L. M. Moreira, R. Z. N. Vencio, A. Y. Matsukuma, A. M. Durham, D. C. Teixeira, H. El-Dorry, P. B. Monteiro, A. C. R. da Silva, S. Verjovski-Almeida, A. M. da Silva, and S. L. Gomes.** 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. Journal of Bacteriology **186**:5442-5449.
- Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje.** 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**:2567-2572.
- Konstantinidis, K. T., and E. F. DeLong.** 2008. Genomic patterns of recombination, clonal divergence and environment in marine microbial populations. ISME J. **2**:1052- 1065.

- Kulichevskaya, I. S., O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, W. I. C. Rijpstra, J. S. S. Damste, and S. N. Dedysh.** 2009. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp nov., a novel stalked, *Gemmata*-like planctomycete from a Siberian peat bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:357-364.
- Kulichevskaya, I. S., A. O. Ivanova, O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, J. S. S. Damste, and S. N. Dedysh.** 2008. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:1186-1193.
- Kulichevskaya, I. S., A. O. Ivanova, S. E. Belova, O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, W. I. C. Rijpstra, J. S. S. Damste, G. A. Zavarzin, and S. N. Dedysh.** 2007. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:2680-2687.
- Lambert, M. A., and C. W. Moss.** 1983. Comparison of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **18**:1370-1377.
- Langhammer, P. A.,** 2007. Untersuchung der Physiologie von *Rhodopirellula baltica* SH1 im Chemostaten. Diplomarbeit, Fachhochschule Flensburg.
- Laub, M. T., H. H. McAdams, T. Feldblyum, C. M. Fraser, and L. Shapiro.** 2000. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**:2144–2148.
- Lee, P. K. H., D. Cheng, P. Hu, K. A. West, G. J. Dick, E. L. Brodie, G. L. Andersen, S. H. Zinder, J. He, and L. Alvarez-Cohen.** 2011. Comparative genomics of two newly isolated *Dehalococcoides* strains and an enrichment using a genus microarray. *The ISME Journal* **5**:1014-1024.
- Letowski, J., R. Brousseau, and L. Masson.** 2004. Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *Journal of Microbiological Methods* **57**:269-278.
- Liesack, W., H. König, H. Schlesner, and P. Hirsch.** 1986. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. *Archives of Microbiology* **145**:361-366.

Literatur

- Liesack, W., R. Soller, T. Stewart, H. Haas, S. Giovannoni, and E. Stackebrandt.** 1992. The influence of tachytelically (rapidly) evolving sequences on the topology of phylogenetic trees - intrafamily relationships and the phylogenetic position of *Planctomycetaceae* as revealed by comparative-analysis of 16S ribosomal RNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology* **15**:357-362.
- Lindsay, M. R., R. I. Webb, M. Strous, M. S. Jetten, M. K. Butler, R. J. Forde, and J. A. Fuerst.** 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology* **175**:413-429.
- Lopez-Garcia, P., A. Lopez-Lopez, D. Moreira, and F. Rodriguez-Valera.** 2001. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:193-202.
- Lopez-Lara, I. M., C. Sohlenkamp, and O. Geiger.** 2003. Membrane lipids in plant-associated bacteria: Their biosyntheses and possible functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:567-579.
- Madsen, M. L., M. J. Oneal, S. W. Gardner, E. L. Strait, D. Nettleton, E. L. Thacker, and F. C. Minion.** 2007. Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **189**:7977-7982.
- Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing - a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:3140-3145.
- Marshall K. C.** 2006. Planktonic versus sessile life of prokaryotes. In: **Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt (eds).** *The prokaryotes*, vol 2, 3rd edn. Springer, New York, pp 3–15.
- Martens, M., M. Delaere, R. Coopman, P. De Vos, M. Gillis, and A. Willems.** 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:489-503.
- Martinez-Morales, F., M. Schobert, I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger.** 2003. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology-SGM* **149**:3461-3471.

- Matthew D., W. Piper, P. Daran-Lapujade, C. Bro, B. Regenberg, S. Knudsen, J. Nielsen and J. T. Pronk.** 2002. Reproducibility of Oligonucleotide Microarray Transcriptome Analyses. *J. Biol. Chem* **277**: 37001-37008.
- Mesbah, M., U. Premachandran, and W. B. Whitman.** 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**:159-167.
- Monod, J.** 1950. La technique de culture continue. *Ann Inst Pasteur* **79**: 390-410.
- Morris, R. M., K. Longnecker, and S. J. Giovannoni.** 2006. *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environmental Microbiology* **8**:1361-1370.
- Mulkijanian, A. Y., E. V. Koonin, K. S. Makarova, S. L. Mekhedov, A. Sorokin, Y. I. Wolf, A. Dufresne, F. Partensky, H. Burd, D. Kaznadzey, R. Haselkorn and M. Y. Galperin.** 2006. The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *PNAS* **103**: 13126-13131.
- Musat, N., U. Werner, K. Knittel, S. Kolb, T. Dodenhof, J. E. E. van Beusekom, D. de Beer, N. Dubilier, and R. Amann.** 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **29**:333-348.
- Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. H. Schleifer.** 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology-Uk* **144**:3257-3266.
- Niepel, T.** 1999. Chemotaxonomie ausgewählter gram-positiver Bakterien anhand ihrer polaren Lipide, Sequenzierung ihrer 16S rDNAs und Vergleich beider Methoden. Dissertation, Universität Braunschweig.
- Ng F. M.W., E. A. Dawes.** 1973. Chemostat studies on regulation of glucose-metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem J* **132**:129-140
- Nunes, O. C., M. M. Donato, C. M. Manaia, and M. S. Dacosta.** 1992. The polar lipid and fatty acid composition of *Rhodothermus* strains. *Systematic and Applied Microbiology* **15**:59-62.
- Parro, V., M. Moreno-Paz and E. Gonzalez-Toril** (2007). "Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays." *Environ Microbiol* **9**: 453-464.
- Pelz, O., C. Hesse, M. Tesar, R. B. Coffin, and W. R. Abraham.** 1997. Development of methods to measure carbon isotope ratios of bacterial

Literatur

- biomarkers in the environment. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **33**:131-144.
- Pimentel-Elardo, S., M. Wehrl, A. B. Friedrich, P. R. Jensen, and U. Hentschel.** 2003. Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquatic Microbial Ecology* **33**:239-245.
- Poly, F., D. Threadgill, and A. Stintzi.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *Journal of Bacteriology* **186**:4781-4795.
- Prakash, O., M. Verma, P. Sharma, M. Kumar, K. Kumari, A. Singh, H. Kumari, S. Jit, S. K. Gupta, and R. Lal.** 2007. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian Journal for Microbiology* **47**:98-108.
- Raven, J. A.** 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *The Royal Society* **11**: 1-51.
- Redfield A. C.** 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* **46**:205-222.
- Richter, M., T. Lombardot, I. Kostadinov, R. Kottmann, M. B. Duhaime, J. Peplies, and F. O. Glockner.** 2008. JCoast - A biologist-centric software tool for data mining and comparison of prokaryotic (meta) genomes. *BMC Bioinformatics* **9**:177.
- Richter, M., and R. Rossello-Mora.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:19126-19131.
- Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* **25**:39-67.
- Salama, N., K. Guillemin, T. K. McDaniel, G. Sherlock, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:14668-14673.
- Schleifer, K. H.** 2009. Classification of bacteria and archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* **32**:533-542.
- Schlesner, H.** 1994. The Development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other

- Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. Systematic and Applied Microbiology **17**:135-145.
- Schlesner, H.** 1986. *Pirella marina* sp. nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water. Systematic and Applied Microbiology **8**:177-180.
- Schlesner, H., C. Rensmann, B. J. Tindall, D. Gade, R. Rabus, S. Pfeiffer, and P. Hirsch.** 2004. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**:1567-1580.
- Schlesner, H., and E. Stackebrandt.** 1986. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. Systematic and Applied Microbiology **8**:174-176.
- Schmid, M., K. Walsh, R. Webb, W. I. C. Rijpstra, K. van de Pas-Schoonen, M. J. Verbruggen, T. Hill, B. Moffett, J. Fuerst, S. Schouten, J. S. S. Damste, J. Harris, P. Shaw, M. S. M. Jetten, M. Strous.** 2003. Candidatus "*Scalindua brodae*", sp. nov., candidatus "*Scalindua wagneri*", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **26**: 529-538.
- Schmidt, J. M., and M. P. Starr.** 1980. Some ultrastructural features of *Planctomyces bekefii*, morphotype I of the *Blastocaulis-Planctomyces* group of budding and appendaged bacteria. Curr. Microbiol. **4**:189-194.
- Schüler, D.,** 2008. Genetic and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria, FEMS Microbiol. Rev. **32**: 654-672
- Sittig, M., and H. Schlesner.** 1993. Chemotaxonomic Investigation of various prosthecate and/or budding bacteria. Systematic and Applied Microbiology **16**:92-103.
- Sohlenkamp, C., I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger.** 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. Progress in Lipid Research **42**:115-162.
- Sougakoff, W., M. Rodrigue, C. Truffot-Pernot, M. Renard, N. Durin, M. Szpytma, R. Vachon, A. Troesch, and V. Jarlier.** 2004. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology and Infection **10**:289-294.

Literatur

- Stackebrandt, E., A. Fischer, P. Hirsch, T. Roggentin, H. Schlesner.** 1986. The phylogeny of an ancient group of budding peptidoglycan-less eubacteria: the genera *Planctomyces* and *Pirella*. *Endocyt. Cell. Res.* **3**: 29-40.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampf, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, and W. B. Whitman.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1043-1047.
- Stackebrandt, E., and J. Ebers.** 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* **33**: 152-155
- Stal L. J.** 2009. Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environ Microbiol* **11**:1632–1645
- Staley, J. T.,** 1973. Budding bacteria of the *Pasteuria-Blastobacter* group. *Can. J. Microbiol.* **19**: 609-614.
- Staley, J. T., J. A. Fuerst, S. Giovannoni, and H. Schlesner.** 1992. The order *Planctomycetales* and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera*. *The Prokaryotes* **4**:3710-3731.
- Stanier R.Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, P. R. Painter.** 1986. *General Microbiology*, 5th edn. Macmillan, London, UK.
- Steglich, C., M. Futschik, M. Rector, R. Steen and S. Chrisholm.** 2006. "Genome-wide analysis of light sensing in *Prochlorococcus*." *J Bacteriol* **188**: 7796-7806.
- Stevenson, F. J., M. A. Cole.** 1999. *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*, 2nd edn. John Wiley and Sons, Hoboken, USA.
- Stürmeyer H, J. Overmann, H. D. Babenzien, H. Cypionka.** 1998. Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Appl Environ Microbiol* **64**:1890–1894.
- Suzuki, K., M. Goodfellow, and A. G. O'Donnell.** 1993. *Cell envelopes classification*. Academic Press, London, UK.
- Tadonleke, R.D.,** 2007. Strong coupling between natural *Planctomycetes* and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 543–555.
- Tang, T., N. Francois, A. Glatigny, N. Agier, M. H. Mucchielli, L. Aggerbeck, and H. Delacroix.** 2007. Expression ratio evaluation in two-colour microarray

- experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics* **23**:2686-2691.
- Teeling, H., T. Lombardot, M. Bauer, W. Ludwig, F. O. Glöckner.** 2004. Evaluation of the phylogenetic position of the planctomycete '*Rhodopirellula baltica*' SH1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome tree. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 791-801.
- Tempest, D. W.** 1969. The continuous cultivation of microorganisms. Theory of a chemostat. *Methods Microbiology* **2**: 260-276.
- Tezuka Y.** 1990. Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon—nitrogen—phosphorus ratio of organic substrates. *Microb Ecol* **19**:227–238.
- Tillib, S. V., and A. Mirzabekov.** 2001. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:53-58.
- Tiquia, S. M., L. Y. Wu, S. C. Chong, S. Passovets, D. Xu, Y. Xu, and J. Z. Zhou.** 2004. Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* **36**:664-675.
- Tremblay P. L., P. C. Hallenbeck.** 2009. Of blood, brains and bacteria, the Amt/Rh transporter family: emerging role of Amt as a unique microbial sensor. *Mol Microbiol* **71**:12–22.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. DeVos, K. Kersters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**:407-438.
- van Niftrik, L. A., J. A. Fuerst, J. S. S. Damste, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten, and M. Strous.** 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **233**:7-13.
- Vauterin, L., P. Yang, and J. Swings.** 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:298-304.
- Wada, H., and N. Murata.** 1990. Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* Pcc6803. *Plant Physiology* **92**:1062-1069.

Literatur

- Wagner, M., and M. Horn.** 2006. The *Planctomyces*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology* **17**:241-249.
- Wallner, S. R., M. Batter, C. Wurdemann, P. Wecker, F. O. Glockner, and K. Faber.** 2005. Highly enantioselective sec-alkyl sulfatase activity of the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica* shows retention of configuration. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**:6381-6384.
- Wang, J., C. Jenkins, R. I. Webb, and J. A. Fuerst.** 2002. Isolation of *Gemmata*-like and *Isosphaera*-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:417-422.
- Ward, N., J. T. Staley, J. A. Fuerst, S. Giovannoni, H. Schlesner, and E. Stackebrandt.** 2006. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenernia* and *Scalindua*. *Prokaryotes* **7**:757-793.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper.** 1987. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:463-464.
- Wecker, P., C. Klockow, A. Ellrott, C. Quast, P. Langhammer, J. Harder, and F. O. Glockner.** 2009. Transcriptional response of the model planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T to changing environmental conditions. *BMC Genomics* **10**:410.
- Wegner, C.,** 2011. The visualisation of compartmentation in *Planctomyces* phyl. nov.-a fluorescent-based approach. Masterarbeit, Universität Oldenburg.
- Winkelmann, N.,** 2009. Isolierung und genetische Charakterisierung von Stämmen des Planctomycetengenus *Rhodopirellula* und die Biogeographie in europäischen Gewässern. Dissertation, Universität Bremen.
- Winkelmann, N., and J. Harder.** 2009. An improved isolation method for attached-living *Planctomyces* of the genus *Rhodopirellula*. *Journal of Microbiological Methods* **77**:276-284.
- Winkelmann, N., U. Jaekel, C. Meyer, W. Serrano, R. Rachel, R. Rossello-Mora, and J. Harder.** 2010. Determination of the diversity of *Rhodopirellula* isolates

- from european seas by multilocus sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology **76**:776-785.
- Witney, A. A., M. Marsden, T. G. Holden, R. A. Stabler, S. E. Husain, J. K. Vass, P. D. Butcher, J. Hinds, and J. A. Lindsay.** 2005. Design, validation, and application of a seven-strain *Staphylococcus aureus* PCR product microarray for comparative genomics. Applied and Environmental Microbiology **71**:7504-7514.
- Wobken, D., H. Teeling, P. Wecker, A. Dumitriu, I. Kostadinov, E. F. DeLong, R. Amann, and F. O. Glöckner.** 2007. From the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes. ISME Journal **1**:419-435.
- Woese, C. R., G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5088-5090.
- Wolfe-Simon, F., J. Switzer Blum, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoefft, J. Pett-Ridge, J. F. Stolz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. W. Davies, a. D. Anbar, and R. S. Oremland.** 2010. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. Science Express **10**:1-9.
- Wu, L. Y., D. K. Thompson, X. D. Liu, M. W. Fields, C. E. Bagwell, J. M. Tiedje, and J. Z. Zhou.** 2004. Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. Environmental Science & Technology **38**:6775-6782.
- Yarza, P., M. Richter, J. Peplies, J. Euzeby, R. Amann, K. H. Schleifer, W. Ludwig, F. O. Glöckner, R. Rossello-Mora.** 2008. The all-species living tree project: A 16S RNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Syst. Appl. Microbiol. **31**: 241-250.
- Yoshino R., T. Morio, Y. Yamada, H. Kuwayama, M. Sameshima, Y. Tanaka, H. Sesaki, and M. Iijima.** 2007. Regulation of Ammonia Homeostasis by the Ammonium Transporter AmtA in *Dictyostelium discoideu*. Eukaryotic Cell **6** (12): 2419–2428
- Zhou, J. ,** 2003. "Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis." Curr Biol **6**(3): 288-294.

Teil II: Publikationen

A. Publikationsliste mit Erläuterungen

1. Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*

Carsten S. Frank, Philipp Langhammer, Bernhard Maximilian Fuchs and Jens Harder

Entwicklung der Chemostatkultur und initiale Beobachtungen durch P.L. und J.H.. Konzeptentwicklung durch C.S.F. und J.H.. Durchführung der Experimente durch C.S.F., dabei die Durchflusszytometrie unter Beratung von B.M.F.. Auswertung und Erstellung des Manuskripts durch C.S.F. und J.H. unter Beteiligung von P.L. und B.M.F.

2. Polyphasic taxonomy of *Rhodopirellula*-related strains: Emended description of the genus *Rhodopirellula* and the species *Rhodopirellula baltica*, and the description of *Rhodopirellula europaea* sp. nov., *Rhodopirellula sallentina* sp. nov., *Rhodopirellula maiorica* sp. nov., *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov., *Rhodopirellula gimesia* sp. nov., *Rhodopirellula syltensis* sp. nov., *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov., *Rhodopirellula clava* sp. nov., *Rhodopirellula magna* sp. nov. and *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov. and the description of the *Rhodopilula* gen. nov. with *Rhodopilula apulia* sp. nov..

Carsten S. Frank, Nadine Winkelmann, Marcus Elvert, Dietmar Riedel, and Jens Harder

Manuskript in Vorbereitung

Entwicklung des Konzepts durch C.S.F. und J.H.. Anzucht der verwendeten Stämme und experimentielle Durchführung der Charakterisierungen durch C.S.F.. Durchführung der Phospholipidexperimente und Auswertung durch C.S.F. in Zusammenarbeit mit M.E.. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von N.W. und D.R.. Erstellung des Manuskripts durch C.S.F. und J.H., mit Kommentaren von M.E..

3. The core genome of *Rhodopirellula baltica*

Carsten S. Frank, Christine Klockow, Michael Richter, Jens Harder and Frank Oliver Glöckner

Manuskript in Vorbereitung

Entwicklung des Konzepts durch C.S.F., J.H. und F.O.G. Experimentelle Durchführung durch C.S.F.. Anleitung der Microarrayexperimente durch C.K.. Analyse der Genome durch C.S.F. und M.R.. Erstellung des Manuskripts durch C.S.F., unterstützt von J.H. und M.R.. Das Manuskript haben C.K. und F.O. G. noch nicht gelesen.

B. Publikationen

Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*

Carsten S. Frank (1), Philipp Langhammer (1), Bernhard Maximilian Fuchs (2) and Jens Harder (1)*

(1) Dept. of Microbiology and (2) Dept. of Molecular Ecology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Running title: Free-living and sessile *R. baltica*

*corresponding author:

Jens Harder, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany. Phone: ++49-421-2028-750, Fax: ++49-421-2028-580, E-mail: jharder@mpi-bremen.de

Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*

Carsten S. Frank · Philipp Langhammer ·
Bernhard Maximilian Fuchs · Jens Harder

Received: 21 September 2010 / Revised: 12 January 2011 / Accepted: 25 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract A dimorphic life cycle has been described for the planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T, with juvenile motile, free-swimming cells and adult sessile, attached-living cells. However, attachment as a response to environmental factors was not investigated. We studied the response of *R. baltica* to nitrogen limitation. In batch cultures, ammonium limitation coincided with a dominance of free-swimming cells and a low number of aggregates. Flow cytometry revealed a quantitative shift with increasing ammonium availability, from single cells towards attached cells in large aggregates. During growth of *R. baltica* on glucose and ammonium in chemostats, an ammonium addition caused a macroscopic change of the growth behaviour, from homogeneous growth in the liquid phase to a biofilm on the borosilicate glass wall of the chemostat vessel. Thus, an ammonium limitation—a carbon to nitrogen supply ratio of 30:1—sustained free-living growth without aggregate formation. A sudden increase in ammonium supply induced sessile growth of *R. baltica*. These observations reveal a response of *Rhodopirellula baltica* cells to ammonium: they abandon the free-swimming life, attach to particles and form biofilms.

Keywords Ammonium · Planctomycetales · Biofilm · *Rhodopirellula* · Carbon/nitrogen ratio · Flow cytometry

Communicated by Erko Stackebrandt.

C. S. Frank · P. Langhammer · J. Harder (✉)
Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine
Microbiology, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany
e-mail: jharder@mpi-bremen.de

B. M. Fuchs
Department of Molecular Ecology, Max Planck Institute for
Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany

Published online: 22 February 2011

Introduction

Nitrogen is an essential element for microorganisms, and it is incorporated in e.g. proteins and nucleic acids. The availability of nitrogenous compounds—including nitrate, nitrite, urea, ammonium, or organic molecules, e.g. free amino acids—is comparatively low in nature, thus a factor for limiting primary and secondary production in the oceans (Stal 2009). One evolutionary solution is the biological fixation of nitrogen gas in the form of ammonium. Another strategy is exemplified by *Nevskia ramosa*, a motile fresh-water bacterium that accumulates exopolysaccharide under nitrogen limitation. These polymers provide a buoyant force and place the microorganism in the epineuston where gaseous ammonia from the atmosphere is available (Stürmeyer et al. 1998). A chemoreceptor for ammonium is not known (Armitage 2006), but nitrogenous compounds, e.g. amino acids, are attractants for many motile bacteria. Only one habitat type has usually an ammonium supply adequate for microbial growth: in anoxic habitats, e.g. marine sediments, the fermentation and mineralization of proteins and other organic matter release ammonium, which accumulates transiently and diffuses to the suboxic zone where it is oxidized or incorporated into biomass.

The nitrogen demand for biomass can be expressed in relation to the carbon content. Redfield showed that marine phytoplankton has a C:N:P ratio of 106:16:1 (Redfield 1958), thus a C:N ratio of 6.6:1. Environmental bacteria have a C:N ratio of 5:1 (Fagerbakke et al. 1996), whereas the C:N ratio in bacterial cultures ranges from 4.5:1 to 12:1 (Tezuka 1990). The C:N ratio can be constant at different growth rates: ammonium-limited chemostat experiments revealed that faster growth of *Pseudomonas aeruginosa* was accompanied by a constant cellular N pool and

a doubling of the RNA content (Ng and Dawes 1973). Aerobic, chemoorganotrophic microorganisms are capable of assimilating every second carbon atom, e.g. during growth on sugars (Stanier et al. 1986). This suggests a C:N ratio of 15–10:1 as balanced nutrient supply in microbial media for cultivation. In fact, microbial growth on dissolved nitrogen-containing organic compounds with a C:N ratio of below 10:1 was accompanied by ammonium release (Tezuka 1990). We studied the response of the planctomycete *Rhodopirellula baltica* to variable ammonium concentrations as one environmental factor.

Rhodopirellula baltica was described as a sessile, attached-living marine heterotrophic bacterium that proliferates via budding (Glöckner et al. 2003; Schlesner et al. 2004). In the life cycle model, monotrichous flagellated juvenile cells disperse from the reproductive pole of adult, sessile cells. During biomass increase, the swarmer cells lose their flagellum, produce a sticky substance at their vegetative pole—called the holdfast substance—and attach in nature to surfaces, e.g. phytoplankton, marine snow and sediment particles (Morris et al. 2006; Musat et al. 2006), in culture to each other (Gade et al. 2005). The latter aggregates are visible in the microscopic view as rosettes. In general, the regulatory processes governing the switch from a free-swimming juvenile cell into an attached-living adult cell have so far not been investigated intensively (Dworkin 2006). However, nutrient gradients have been suggested to play an important role in attachment (Marshall 2006). In this study, we provide evidence for an influence of ammonium and the C:N ratio in the nutrient supply on the life style of *R. baltica*.

Materials and methods

Cultivation

Strains were grown on Pla-NACGI medium (Winkelmann and Harder 2009). Batch and chemostat cultivations with varying ammonium and glucose concentrations were performed in modified M13 medium (Schlesner 1994). Thousand millilitres of medium included 250 ml artificial sea water (Lyman and Fleming 1940), 20 ml Hutner's basal salts (Cohen-Bazire et al. 1957) and 0.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The pH value was adjusted to 7.5 with 1 M Tris/HCl. After autoclavation, 10 ml vitamin solution no. 6 (Staley 1968), 4 ml cycloheximide (50 g/l) and 4 ml ampicillin (50 g/l) were added. Liquid batch cultures were inoculated with several pure colonies into a 250-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml medium and incubated at 24°C in the dark on a rotary shaker (75 rpm). Samples of 5 ml culture were collected under a sterile hood for purity control, optical density and glucose and ammonium analyses.

Continuous culture experiments were conducted in a 1-l DURAN borosilicate 3.3 glass reactor (\varnothing 13.5 cm \times 25 cm, Ochs, Bovenden, Germany) at a constant temperature of 28°C. The pH value was controlled with an autoclaved pH electrode (Mettler Toledo, Gießen, Germany) and maintained at $\text{pH } 7.45 \pm 0.25$ with 1 M HCl or 1 M NaOH. The oxygen partial pressure for dissolved oxygen was determined with an autoclaved pO_2 electrode (Mettler Toledo). The aeration rate was 250 ± 100 ml/min. Sterile feed medium was added with a flexible-tube pump through a tube with an inner diameter of 1.51 mm (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany). Two sterile filters (0.2 μm , Whatman, Schleicher Schuell, Dassel) were installed in front of the pump and in front of the inflow into the fermenter to prevent contamination. The exact flow rate was determined by measuring the weight loss of the feed reservoir. The culture was stirred with an 8-cm-long magnetic bar at 200 rotations per minute. Cultivation started with 20 ml liquid inoculum and a single-fed batch stage until an OD_{600} of 0.3 till 0.5. The continuous cultivation was stabilized for at least five residence times to reach the steady state (Ihssen and Egli 2004), before the dilution rate was changed or ammonium was added.

Analyses

Cell numbers were determined with a 40 μl sample in a hemocytometer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). For OD determinations, samples were mixed and measured at 600 nm with a UV-1203 photometer (Shimadzu, Duisburg, Germany). At optical densities higher than 0.7, the samples were diluted before determination. Dry weight determinations were performed on 40 ml samples which were centrifuged and dried until a constant weight at 80°C. An OD_{600} of 1.0 corresponded to a dry weight of 1.23 g/l. Glucose and possible fermentation products were determined as described (Zhilina et al. 2004) with an anion exchange column (Animex HPX-87H, 300 \times 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Ammonium was measured with a flow injection analysis (Hall and Aller 1992). Single cells and aggregates were counted after 1 h fixation with 1% formaldehyde and overnight staining with SYBR-Green I (Marie et al. 1997) at room temperature with a FACS Calibur flow cytometer (Beckton Dickinson, San Jose, California, USA) equipped with an air-cooled argon laser at 488 nm. Forward and side scatter were detected with a 488 nm band-pass filter. The DNA content was detected as SYBR-Green fluorescence with a 530 nm band-pass filter. For each sample, 100,000 events were counted. All parameters were collected in logarithmic mode. The sample counts were analysed with the programme BD CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Cell populations were sorted applying a MoFlo flow cytometer (Beckman

Table 1 Batch cultivation of *R. baltica* SH1^T and the strains 6C, CS96 and SM1 on varying ammonium concentrations

Strain	Ammonium (mmol/l)	Microbial growth (OD ₆₀₀)	Δ Glucose (mM)	Δ Ammonium (mM)	Single cell particles (%)	Aggregated particles (%)
SH1 ^T	1	1.07	7.06	0.94	36.89	63.11
	2	1.73	6.14	1.97	39.26	60.74
	4	1.29	5.23	2.39	37.27	62.73
	8	1.04	5.69	2.04	18.83	81.17
6C	1	0.89	3.79	0.91	29.23	70.77
	2	0.74	2.77	1.24	47.74	52.26
	4	0.70	3.71	1.06	37.99	62.01
	8	0.70	3.56	0.73	40.44	59.56
CS96	1	1.12	5.17	1.07	80.41	19.59
	2	1.42	5.33	1.86	67.32	32.69
	4	1.36	6.25	1.78	60.07	33.93
	8	1.38	6.10	1.90	64.64	35.37
SM1	1	0.82	6.90	0.97	38.06	61.94
	2	0.83	4.63	1.53	25.97	74.04
	4	0.88	4.91	1.15	25.41	74.59
	8	1.14	5.36	0.91	19.84	80.16

The number of single cells and aggregates and the consumption of glucose and ammonium were determined after 42 days of incubation

Coulter, Krefeld, Germany). For excitation, an Argon ion laser (Innova-A300) was tuned to 488 nm. Side scatter was analysed through a 488 ± 10 nm band-pass filter, and the green fluorescence of SYBR Green-stained cells was detected through a 530 ± 20 nm band-pass filter. Bivariate dot plot diagrams were generated with the Summit software (Beckman Coulter), and sorting gates were defined. Particle-free (<0.2 μm) 0.1% NaCl (w/v) solution was used as a sheath fluid pressurized at 414 kPa. The drop drive was set to 106 770 Hz at an amplitude of 11 V resulting in a drop delay of 46 drops. The sort mode ‘single one drop’ was selected to get the highest sorting purity. Fixed samples were sorted and afterwards blotted and concentrated on an isopore membrane filter (0.2 μm, Millipore, Schwalbach, Germany) and stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1 μg/ml working solution). Filters were covered with Citifluor/Vectashield before fluorescence microscopy (4:1; Citifluor, Leicester, Great Britain; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Phase contrast microphotographs were taken from agar-slide preparations using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) (Pfennig and Wagener 1986).

Results

Rhodopirellula in batch experiments

We investigated the response of *R. baltica* in batch and chemostat cultures. In batch cultures with 10 mM glucose and ammonium concentrations ranging from 1 to 8 mM

(C:N ratios of 60:1 to 7.5:1), *R. baltica* SH1^T biomass formation correlated for supplies of 1 and 2 mM ammonium with the provided ammonium (Table 1). Maximum OD₆₀₀ were 1.07 and 1.73 for 1 and 2 mM ammonium, respectively. In both cases, with C:N ratios of 60:1 and 30:1, ammonium was completely consumed. But cultures with 4 and 8 mM ammonium showed a toxic effect. A lower maximum OD₆₀₀ was observed, and ammonium and glucose were not completely consumed. We applied microscopy and flow cytometry to identify and quantify single cells and aggregates. The interpretation of flow cytometry observations was established by sorting individual fractions and microscopic analyses (data not shown). Both techniques showed consistently a dominance of single cells in nitrogen-limited cultures (Figs. 1a, b, 2a, b), whereas a high ammonium concentration induced a dominance of aggregated cells (Figs. 1c, d, 2c, d). The size of the aggregates varied from three or four cells in the ammonium-limited cultures to large aggregates of over ten cells in cultures with 4 or 8 mM ammonium.

Rhodopirellula in chemostat culture

We started the continuous cultivation of *R. baltica* SH1^T in chemostats with 10 and 100 mM glucose in the presence of 1 mM ammonium, corresponding to C:N ratios in the feed medium of 60:1 and 600:1. The cultures contained only free-living cells, single cells and budding cells, but no aggregates. Glucose was incompletely used and ammonium was not detectable, and this means it was less than 1 μM.

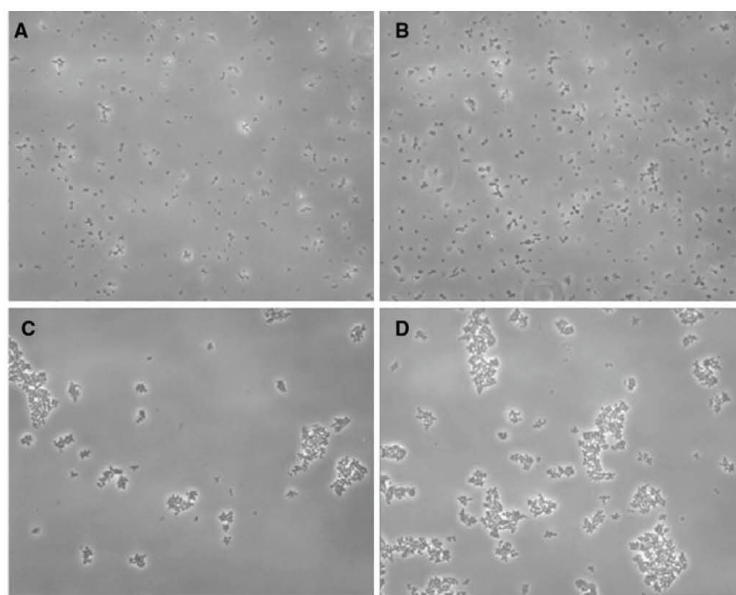


Fig. 1 Light microscopy of *R. baltica* SH1^T. A culture with 1 mM ammonium showed a small portion of particles larger than one cell (a, b). Large particles were found in a culture with 4 mM ammonium (c, d). Samples of incubation day 8 (a, c) and 42 (b, d) are shown. Scale 50 μ m

To test the response to ammonium, we increased the steady-state concentration in the chemostat suddenly from below 1 μ M to 4 mM and in the feed medium from 1 to 4 mM while maintaining 10 mM glucose. As reaction to this ammonium shock, the culture formed a dense, intensively pink biofilm on the glass wall of the chemostat vessel. This observation was highly reproducible with *R. baltica* SH1^T. It was also detected with 5 mM glucose and 1 mM ammonium, representing a C:N ratio of 30:1 (Figs. 3, 4). In this experiment, the chemostat cultivation started with a single-fed batch phase (Fig. 3a). Ammonium and glucose started to disappear, the optical density increased to 0.3. Then, the chemostat cultivation was started and maintained for over 200 h with a dilution rate of 0.03 h⁻¹ (a doubling time of 23 h) (Fig. 3b). After 216 h in steady state, the ammonium concentration was increased to 3 mM in the chemostat and 4 mM in the feed medium which also contained 5 mM glucose and thus a C:N ratio of 7.5:1. This addition established a transient ammonium concentration of 3 mM in the chemostat (Fig. 3c). The culture responded with an increased growth. The cells started to attach to the wall, and the optical density measurements detected only a part of the total biomass. The ammonium concentration decreased as the cells grew, and the glucose concentration decreased in comparison with the steady-state

concentration in the phase B. The flow cytometry analyses detected during the chemostat phase (Fig. 3b) a stable portion of single cells (60% of all particles). The fraction of larger particles consisted of budding cells and a few small aggregates of attached cells. Ammonium addition caused initially an increase in the portion of larger particles. Later, the biofilm formation coincided with a decrease in the portion of large particles in solution. The fermentation analyses for glucose revealed the absence of short chain fatty acids and alcohols, suggesting a complete mineralization of glucose to carbon dioxide as catabolic process. A control chemostat without ammonium shock maintained a population in the free-living stage for 430 h in steady state, before the chemostat was stopped.

We explored the physiology of the type strain SH1 of *R. baltica* under different ammonium-limited chemostat conditions. The strain grew apparently homogeneously on glucose and ammonium feed concentrations of 5 and 1, 100 and 1, and 100 and 4 mM (C:N ratios of 30:1, 600:1 and 150:1, respectively). Doubling times ranged from 12.5 to 83 h. The chemostat cultures were stable at a dilution rate of up to 0.078 h⁻¹, but a rate of 0.081 h⁻¹ caused a wash-out of the biomass, accompanied by increasing ammonium and glucose concentrations. Thus, the lowest observed doubling time was 8 h 53 min. Cell densities (OD₆₀₀) were

Fig. 2 Flow cytometric analysis of *R. baltica* SH1^T. The density plot has a normalized log₂ scale from green (low density) to light blue and red (high density). A culture with 1 mM ammonium showed a small portion of particles larger than one cell (a, b). Large particles were found in a culture with 4 mM ammonium (c, d). Samples of incubation day 8 (a, c) and 42 (b, d) are shown

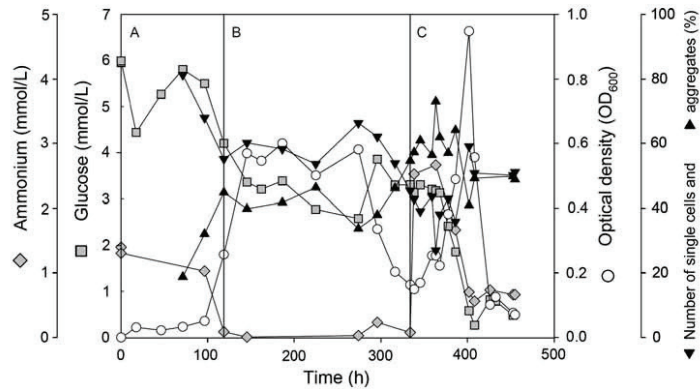
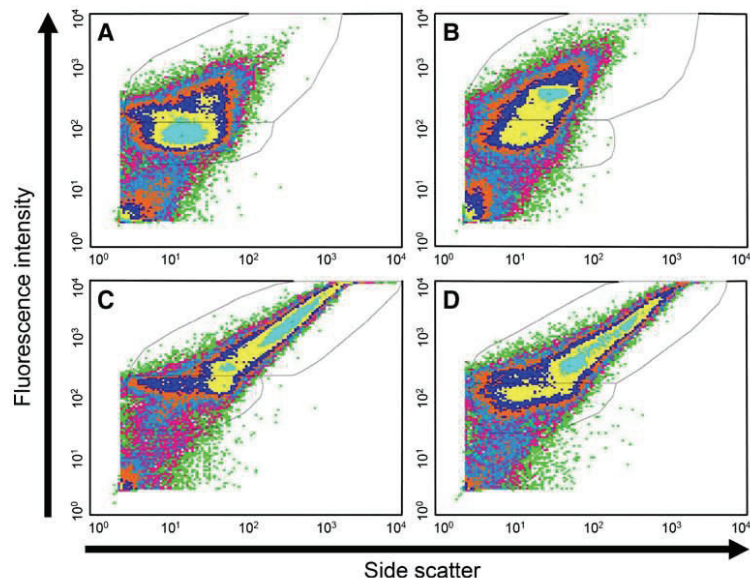


Fig. 3 Growth of *R. baltica* strain SH1^T in chemostat culture. **a** Growth in batch on 5 mM glucose and 1 mM ammonium, **b** continuous cultivation with a dilution rate of 0.03 h⁻¹ on 5 mM glucose and 1 mM ammonium in the feed medium, **c** a shift to 5 mM glucose and 4 mM ammonium which induced attachment on the glass wall of

the chemostat. In phase **b**, the decrease in optical density after 250 h resulted from a 24-h blockage of a sterile filter in the supply line (225–250 h). The attachment to the wall was observed in all ammonium-shock chemostat experiments conducted by two experimentators at different times (data not shown)

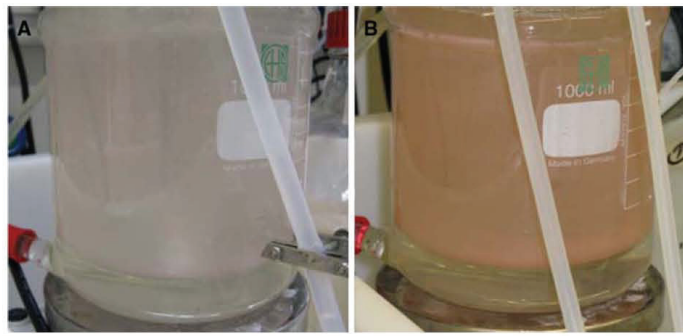
0.4–0.65 and 1.3–1.7 for 1 and 4 mM ammonium in the feed, respectively, independent of the glucose concentration. In both chemostat cultures, the steady-state concentration of ammonium was not detectable. Ammonium assimilation and biomass formation rates indicated an ammonium content of 4% (w/w) in the dry biomass. Single cells and budding cells dominated the microscopic picture,

and aggregates, the typical rosettes of *R. baltica*, were absent.

The response of other *Rhodospirillum* sp. to ammonium

To identify the response of *R. baltica* SH1^T as species- or genus-specific effect, we tested three recently isolated

Fig. 4 Chemostats of *R. baltica* strain SH1^T. The pictures were taken at incubation hour 495 (Fig. 3). The control chemostat (a) was continuously on 1 mM ammonium in the feed and contained a free-living population. The ammonium shock to 4 mM at incubation hour 334 caused a red biofilm on the surface on the vessel (b)



strains which represent on the genetic level closely related *Rhodopirellula* species (Winkelmann and Harder 2009; Winkelmann et al. 2010). In batch cultures, the strains 6C, CS96 and SM1 showed a strain-specific growth resembling largely the behaviour of *R. baltica* SH1^T (Table 1). None of the strains assimilated more than 2 mM ammonium. At high ammonium concentrations (4 and 8 mM), glucose and ammonium were both not completely consumed.

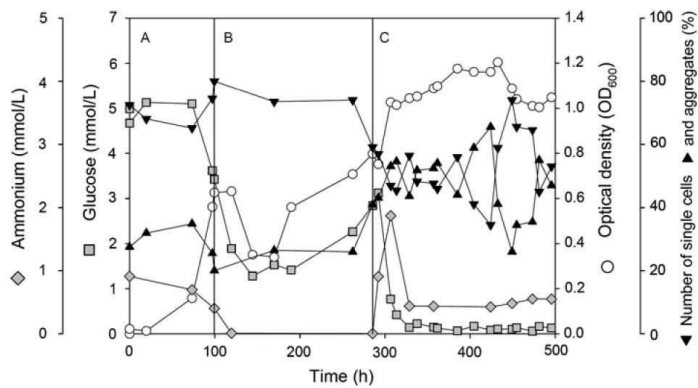
In continuous cultivation, all three strains responded in the presence of 5 mM glucose to an increase in ammonium from 1 mM to 4 mM in the feed and 4 mM in the chemostat. An increase in glucose consumption and in biomass formation was accompanied by a shift towards more aggregated cells, e.g. Fig. 5 shows the behaviour of strain CS96. In contrast to the type strain of *R. baltica*, none of the strains 6C, CS96, SM41 and SM1 formed a biofilm on the wall of the chemostat vessel. Only strain SM1 formed a few tiny patches, less than 3 mm in diameter, of a red biofilm in the ‘epineuston’, the fermenter wall and the metal surface of the oxygen electrode near the medium surface. The liquid phase of this strain did not change its slightly rosy colour after ammonium shock. In contrast, all

other strains—6C, CS96 and SM41—intensified the red colour after the ammonium shock.

Discussion

Bacterial growth on glucose requires ammonium for biomass synthesis. Balanced growth under optimal conditions is characterized by a carbon to nitrogen ratios in the consumption of glucose and ammonium in the range of 15:1–10:1. We observed C:N ratios of glucose and ammonium consumption between 45:1 and 13:1 in batch cultures (Table 1), 12:1 in ammonium-limited chemostats (Figs. 3b, 5b) and 8:1 in ammonium-saturated, glucose-limited chemostats (Figs. 3c, 5c). The extreme C:N ratios may present the synthesis of carbon storage compounds under low ammonium availability and the formation of nitrogen-containing reserve material after the shock with 4 mM ammonium. These observations showed that *Rhodopirellula baltica* is with respect to the physiological turnover of glucose and ammonium an ordinary bacterium.

Fig. 5 Growth of *R. baltica* strain CS96 in chemostat cultures. After a batch cultivation on 5 mM glucose and 1 mM ammonium (a), the continuous cultivation started with a dilution rate of 0.03 h⁻¹ (b). Four millimolars of ammonium was added to the chemostat, and a feed medium containing 4 mM ammonium was connected to the fermenter (c)



An unexpected finding in our study was the dominance of free-living motile cells in ammonium-limited cultures. Previous studies had described *R. baltica* as an attached-living bacterium. But these studies had applied media without a limitation of ammonium or other nitrogen sources. Recently, a proteomic study on *R. baltica* grown on N-acetylglucosamine as single carbon and nitrogen source—representing a C:N ratio of 8:1—revealed no hint on a nitrogen demand (Gade et al. 2005). These observations are in accord with a link between a satisfactory nitrogen supply and aggregation of *R. baltica* cells.

A first hint on the signal transduction pathway for the response to non-limiting ammonium concentrations in the environment originates from the analyses of the genes potentially involved in the nitrogen metabolism in *R. baltica*. Ammonium is a cation (NH_4^+) and in equilibrium with ammonia (NH_3) at a pK_a of 9.25. The gas can diffuse through membranes, similar to water, but represents only a small portion, less than 1% of the combined concentrations of ammonia and ammonium, at physiological pH values (Andrade and Einsle 2007). The active transport of ammonium into cells is mediated by transporters of the Amt/Mep/Rh family. Recent studies revealed the transport of an ammonia molecule with a concomitant proton uptake (Andrade and Einsle 2007; Tremblay and Hallenbeck 2009). Ammonium shock induces in bacteria the expression of the PII protein. It seems to bind as trimer to the cytosolic side of the active AmtB trimer and inhibits the transport activity (Tremblay and Hallenbeck 2009). The genome of *R. baltica* contains two genes for Amt transporter and four genes for PII proteins (RB5003 and RB297, and RB1065, RB2975, RB5005 and RB9794, respectively). The ammonium assimilation is regulated by a sensor protein (NtrB) and a response protein (NtrC) of a two-component regulator and a sigma-54 factor for the DNA-binding of the RNA polymerase. In *R. baltica*, RB6491 codes a sigma-54 factor and RB11036 and RB11037 the NtrCB proteins. RB4487 and RB13118 are also NtrC response proteins. Still, this regulatory network may cover only the response to an ammonium limitation. The signal transduction pathway for elevated environmental ammonium concentrations may involve a fusion protein of an Amt transporter and a sensory histidine kinase that is present in the genome (RB10892). The later has all functional sites of a sensory histidine kinase: the ATPase site including the magnesium ion and ATP binding sites and the G-X-G motif and the phosphorylation site with the dimer interface. Such a candidate gene for an ammonium sensor kinase as entrance for a regulatory pathway is also present in the genomes of other planctomycetes (*Planctomyces limnophilus*, *Pirellula staleyi*, *Blastopirellula marina*, *Planctomyces brasiliensis*, *Planctomyces maris*), but can be found *in silico* by BlastP only in a few

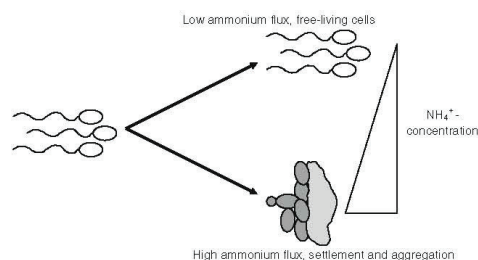


Fig. 6 *R. baltica* settles in response to high ammonium concentrations

other bacteria: *Lyngbya* sp. PCC8106, *Acarychloris marina*, *Spirochaeta thermophila*, *Vibrio corallilyticus*, *Shewanella violacea* and the alphaproteobacterium BAL199. An ammonium concentration above a threshold concentration may induce via this sensor-response pathway a 'settlement program' and the synthesis of the hold-fast substance (Fig. 6). Future research will prove the physiological function and identify the global regulatory network.

The ecological interpretation of the aggregation process is in first sight simple. Aggregation includes a surface reduction to surrounding waters. This decreases the diffusive influx of nutrients and toxic compounds, e.g. ammonium, into the cell resulting in slower growth and higher resistance to toxic compounds. Thus, cells in aggregates and biofilms are less sensitive to toxic compounds. A second view assesses the ecological advantage to settle where ammonium is present. The ammonium concentrations in sediment surface layers indicate the degradation of organic material and the availability of fermentation products in oxygen minimum zones. The genome suggests for *R. baltica* a microaerophilic lifestyle: the respiratory chain has a high-affinity alternative quinone oxidase of the cbb3-type, but no bc1-complex and cytochrome c oxidase of the aerobic bacteria. This physiological character suggests a microaerophilic niche, for which an increased ammonium concentration is an environmental proxy. Indeed, highest abundances of planctomycetes were detected in the oxic and microoxic surface layers of Wadden Sea sediments (Musat et al. 2006), demonstrating a settlement of the motile cells onto sand grains. Other natural targets for settlement are plankton and marine snow particles where exudates may initiate the settlement (Morris et al. 2006). For the algae, one ecological advantage for an epibiotic population is an increased resistance to photoinhibition by inactivation of reactive oxygen species by the epibionts (Hünken et al. 2008).

In summary, we showed that under ammonium limitation *R. baltica* has a free-living lifestyle. The presence of ammonium initiates the aggregation of cells. The process

may require a global response network to several environmental stimuli, including a sensor for ammonium.

Acknowledgments We thank Daniel Blessing and Jörg Wulf for technical assistance. This study was funded by the Max Planck Society.

References

Andrade SLA, Einsle O (2007) The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol Membr Biol* 24:357–365

Armitage J (2006) Bacterial behavior. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*, vol 1, 3rd edn. Springer, New York, pp 102–139

Cohen-Bazire G, Siström WR, Stanier RY (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* 49:25–68

Dworkin M (2006) Prokaryotic life cycles. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The prokaryote*, vol 1, 3rd edn. Springer, New York, pp 140–166

Fagerbakke KM, Hørdal M, Norland S (1996) Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquat Micro Ecol* 10:15–27

Gade D, Stühmann T, Reinhardt R, Rabus R (2005) Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. *Environ Microbiol* 7:1074–1084

Glöckner FO, Kube M, Bauer M, Teeling H, Lombardot T, Ludwig W, Gade D, Beck A, Borzym K, Heitmann K, Rabus R, Schlesner H, Amann R, Reinhardt R (2003) Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8298–8303

Hall PO, Aller RC (1992) Rapid, small-volume, flow-injection analysis for CO₂ and NH₄⁺ in marine and fresh-waters. *Limnol Ocean* 37:1113–1119

Hünken M, Harder J, Kirst GO (2008) Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom *Amphiprora kufferathii* Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. *Plant Biol* 10:519–526

Ihssen J, Egli T (2004) Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150:1637–1648

Lyman J, Fleming RH (1940) Composition of sea water. *J Mar Res* 3:134–146

Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63:186–193

Marshall KC (2006) Planktonic versus sessile life of prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*, vol 2, 3rd edn. Springer, New York, pp 3–15

Morris RM, Longnecker K, Giovannoni SJ (2006) *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environ Microbiol* 8:1361–1370

Musat N, Werner U, Knittel K, Kolb S, Dödenhof T, van Beusekom JEE, de Beer D, Dubilier N, Amann R (2006) Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. *Syst Appl Microbiol* 29:333–348

Ng FMW, Dawes EA (1973) Chemostat studies on regulation of glucose-metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem J* 132:129–140

Pfennig N, Wagener S (1986) An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J Microbiol Meth* 4:303–306

Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* 46:205–222

Schlesner H (1994) The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp. *Pirellula* spp. and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. *Syst Appl Microbiol* 17:135–145

Schlesner H, Rensmann C, Tindall BJ, Gade D, Rabus R, Pfeiffer S, Hirsch P (2004) Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov as *Blastopirellula marina* comb. nov and emended description of the genus *Pirellula*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1567–1580

Stal LJ (2009) Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environ Microbiol* 11:1632–1645

Staley JT (1968) *Prostecocomicrobium* and *Ancalomicrobium*—new prostatic freshwater bacteria. *J Bacteriol* 95:1921–1942

Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR (1986) *General Microbiology*, 5th edn. Macmillan, London

Stütmeyer H, Overmann J, Babenzien HD, Cypionka H (1998) Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Appl Environ Microbiol* 64:1890–1894

Tezuka Y (1990) Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon—nitrogen—phosphorus ratio of organic substrates. *Microb Ecol* 19:227–238

Tremblay PL, Hallenbeck PC (2009) Of blood, brains and bacteria, the Amt/Rh transporter family: emerging role of Amt as a unique microbial sensor. *Mol Microbiol* 71:12–22

Winkelmann N, Harder J (2009) An improved isolation method for attached-living *Planctomycetes* of the genus *Rhodopirellula*. *J Microb Meth* 77:276–284

Winkelmann N, Jaekel U, Meyer C, Serrano W, Rachel R, Rosselló-Mora R, Harder J (2010) Determination of the diversity of *Rhodopirellula* isolates from European Seas applying a multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 76:776–785

Zhilina TN, Appel R, Probian C, Brossa EL, Harder J, Widdel F, Zavarzin GA (2004) *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov sp nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. *Arch Microbiol* 182:244–253

2

Polyphasic taxonomy of *Rhodopirellula*-related strains: Emended description of the genus *Rhodopirellula* and the species *Rhodopirellula baltica*, and the description of *Rhodopirellula europaea* sp. nov., *Rhodopirellula sallentina* sp. nov., *Rhodopirellula maiorica* sp. nov., *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov., *Rhodopirellula gimesia* sp. nov., *Rhodopirellula syltensis* sp. nov., *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov., *Rhodopirellula clava* sp. nov., *Rhodopirellula magna* sp. nov. and *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov. and the description of the *Rhodopilula* gen. nov. with *Rhodopilula apulia* sp. nov..

Carsten S. Frank (1), Nadine Winkelmann (1), Marcus Elvert (2), Dietmar Riedel (3), and Jens Harder (1)

(1) Dept. of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

(2) MARUM – Center for Marine Environmental Science, University of Bremen, Bremen, Germany

(3) Department for Neurobiology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany

Manuscript in preparation

Address correspondence to: Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359 Bremen, Germany, phone: +49 421 2028-750, fax: +49 421 2028-580, e-mail: jharder@mpi-bremen.de

Keywords: *Rhodopirellula baltica*, Polyphasic Taxonomy, Chemotaxonomy, *Planctomycetales*

Abstract

The genus *Rhodopirellula* includes attached-living planctomycetes present mainly in coastal seas. We have recently isolated novel strains representing at least twelve operational taxonomic units according to the genetic characterization. The morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics were now investigated. The DNA had a G+C content between 53 and 60 mol%. Phospholipids comprised phosphoglycerol, phosphocholine, phosphoethanolamine and methylated phosphoethanolamines, with phosphodimethylethanolamine dominating. The major fatty acids C16:0 and C18:1 Δ 9c were accompanied by several minor fatty acids. The composition of both lipid moieties varied strongly between all analyzed *Rhodopirellula* strains. MK-6 was the major respiratory lipoquinone. The color of the strains varied between light rosy and strong red, but two strains were unpigmented. Vitamin B₁₂ was for some strains essential for growth. Integration of morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics confirmed the genetic diversity. The descriptions of the genus *Rhodopirellula* and the species *Rhodopirellula baltica* were emended on the basis of the physiology of several strains. We propose the species *Rhodopirellula europaea* sp. nov., *Rhodopirellula sallentina* sp. nov., *Rhodopirellula maiorica* sp. nov., *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov., *Rhodopirellula gimesia* sp. nov., *Rhodopirellula syltensis* sp. nov., *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov., *Rhodopirellula clava* sp. nov., *Rhodopirellula magna* sp. nov. and *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov.. In addition, we described the novel genus *Rhodopilula* gen. nov. with *Rhodopilula apulia* sp. nov..

Introduction

Describing species is critical for understanding and comparing biological diversity of different ecological niches (55). Bacterial classification is the construction of groups of strains that are highly homogeneous and thus reveal that they consist of descendents of the nearest common ancestor. Polyphasic taxonomic approaches were first introduced by Colwell (7) and are used to distinguish bacterial species based on morphological and biochemical data obtained from molecular techniques in addition to phylogenetic analysis. These studies enable the description and differentiation of any taxa (60). In this context, molecular fingerprint methods such as 16S rRNA analysis and DNA-DNA hybridization (DDH) plus sequences of molecular markers are used to draw a picture based on genotypic features. Other characteristics are morphologic, chemotypic and phenotypic features (74). Species and genus benchmarks according to 16S rRNA analysis are 98.7 and 96.4% similarity (69). At values above 98.7% similarity DDH is recommended to test the genomic uniqueness of novel isolates. For DNA-DNA hybridization the species benchmark is 70% similarity (79). In whole genome comparisons, the species benchmark was determined to be 94% average nucleotide identity (ANI) in the common part of the genomes (31).

Bacteria of the phylum *Planctomycetes* were first observed in a lake near Budapest (18). Together with the eponymous groups *Verrucomicrobia* and *Chlamydia* the *Planctomycetes* form the PVC superphylum (77). The phylum comprises of two orders. The order *Planctomycetales* includes the family *Planctomycetaceae* (64) with the ten genera *Aquisphaera*, *Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Isophaera*, *Schlesneria*, *Singularisphaera* and *Zarvazinella*, the family *Phycisphaeraceae* includes the genus *Phycisphaera* and the order *Brocadiales* includes the anammox bacteria (71, 63, 34, 32, 33, 14, 4). *Planctomycetes* are ubiquitous in terrestrial and aquatic habitats and can be observed in a variety of different soil, freshwater and marine habitats (38, 78), in the deep-sea (40), in crustacean larvae, in marine sponges (54), in post larvae of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* (13) and the Mediterranean sponge *Aplysina aerophobia* (16). Recently, planctomycetes closely related to *R. baltica* were found in biofilms on the surface of the kelp *Laminaria hyperborean* (3). This suggests that association with eukaryotes is of great importance for planctomycete life.

Publikationen

In 2004 Schlesner (63) divided the genus *Pirellula* into the unpigmented genera *Pirellula* and *Blastopirellula* and the pink to red pigmented genus *Rhodopirellula*. In addition strains belonging to all three genera from a variety of different aquatic habitats were isolated and described (61).

In addition to taxonomical studies the physiology of *R. baltica* was investigated in numerous studies. *R. baltica* has been described as a sessile, attached-living marine heterotrophic bacterium. *R. baltica* is strictly aerobic and chemoorganotroph, the cells are pink and pear-shaped containing a reproductive and a vegetative pole (62). The intracellular colorant responsible for the red color is unknown to date. It presumably protects the cells from photooxidation in the upper water layers where *R. baltica* can be found in addition to the surface of sediments of the sea bottom (19). It proliferates via budding and attaches in nature to surfaces, e.g. phytoplankton, marine snow and sediment particles (45), (46), and in culture to each other (17, 24). A dimorphic life cycle was closely investigated in proteome studies via 2D DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (17) verifying flagella containing juvenile motile and adult sessile cells. Further proteome and gene expression studies were carried out by Wecker and Hieu (80, 26). Recent observations using chemostat cultures revealed a response of *Rhodopirellula baltica* cells to ammonium. Sudden increase in ammonium supply induced sessile growth of *R. baltica*, the cells abandon the free-swimming life, attach to particles and form biofilms (10).

Members of the planctomycetes were mainly recognized and isolated due to their special morphological properties. As a typical member of this group, *R. baltica* is surrounded by a cell-wall that lacks peptidoglycan but is composed of a layer of cross-linked proteins (37). This composition causes resistances against many different antibiotics. Furthermore, the bacterium possesses an intracellular compartmentation through intracytoplasmic membranes (ICM). Inside the cells a fibrillous nucleoid can be seen that is surrounded by a protein membrane. This ribosome containing structure is called the pirellulosome in contrast to the ribosome free paryoplasm (12, 39).

Building on this and the finding that genes closely related to *Rhodopirellula baltica* were detected in different habitats (47, 54, 83) new *Rhodopirellula* strains were isolated from a variety of sample sides all over the world with a focus on European Seas (81). Strains were selected with PCR screening, 16S rRNA sequencing as well as similar color and cell shape, the resistance to the selective antibiotics cycloserine

and streptomycin and the growth with N-acetylglucosamine as single nitrogen and carbon source.

The genetic diversity of the isolates was studied with respect to the biogeography (82). The isolates had been arranged into different operational taxonomic units (OTU) based on multi locus sequence analysis (MLSA) and 16S rRNA sequences as well as DNA-DNA hybridization studies. Based on the results obtained by Winkelmann, in this study, we report a polyphasic taxonomical study on 17 isolates belonging to 12 different genetic groups. 15 of the studied isolates have its origin in Europe (Mediterranean Sea, Atlantic Ocean, North Sea, Skagerrak and Baltic Sea). In addition, two strains from the Philippines were investigated.

Materials and methods

Cultivation

Strains were maintained since isolation in the laboratory collection and grown on PlaNAcGI medium (81). For the chemotaxonomic characteristics (pigments, quinones and membrane lipids), modified M13 medium was used in batch or chemostat cultures as described (10, 63). The carbon sources and the vitamin requirement were tested in M40 medium (64). The medium M13a was applied for determination of pH and temperature optima (61). Cells were generally incubated in the dark on a rotary shaker (75 rpm) at 24°C.

Physiological characteristics

To identify carbon sources and the pH and temperature ranges, bacteria were incubated in glass tubes containing 8 ml medium for three weeks. The inoculum was 80 µl preculture (1% v/v) grown on M13 medium. The OD was measured at 600 nm every week. The tested carbon sources were cellobiose, fucose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, glycerol, mannitol, aesculin, amygdalin, L-lactate, gluconate, glucuronate, glutamine, salicin and chondroitin sulfate. The temperature range was tested at 4, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 37 and 42°C. The pH ranges were tested in a range from pH 4 to 11 with the following biological buffers (finale concentration 10 mM): acetate (pH 4.0), MES (pH 5.0, 5.5 and 6.0), PIPES (pH 6.5 and 7.0), TRIS (pH 7.5), TAPS (pH 8.0 and 8.5), CHES (pH 9.0) and CAPS (pH 10.0 and 11.0). The pH was adjusted with 1 M NaOH or 1 M HCl before and after autoclaving. For growth at pH 10 and 11, no MgCl₂ was added to the medium. The test for vitamin requirement was performed using 1 g/l glucose and 1 g/l vitamin free casamino acids. The medium contained either no vitamins, only vitamin B₁₂ (10 µg/l) or vitamin solution No 6 (5 ml/l; (70)). Cultivation was performed in 100ml-Duran bottles containing 50 ml medium and 1% v/v inoculum. The bacteria were incubated for 10 to 14 days. When growth was observed, the next passage was started. After four passages the experiment was stopped. The *R. baltica* SH1^T as positive control deceased growth due to B₁₂ limitation in the first passage.

Salinity tolerance was studied on solid media containing increasing proportions of artificial sea water (ASW; 42) to give final concentrations of 0, 6.25, 12.5, 50, 100, 200 and 300% ASW (100% ASW corresponds to a salinity concentration of 34.5 ‰). Hydrolysis of aesculin, casein, starch, RNA and DNA as well as the activities of catalase, cytochrome-c-oxidase, lipase and H₂S synthase were tested with solid media according to standard procedures (67).

For optical density (OD) determinations, samples were mixed and measured at 600 nm with a UV-1203 photometer (Shimadzu, Duisburg, Germany). At optical densities higher than 0.7, the samples were diluted before determination.

Morphology

Phase contrast microphotographs were taken from agar-slide preparations using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany; (53). To determine the cell sizes 20 cells of each strain were measured.

Electron microscopy

The method description will be provided by Winkelmann and Riedel.

DNA base ratio

G+C content determination was performed as described previously (method 2 in 44). Biomass from one plate (90 mm diameter) was resuspended and DNA was extracted. In the final step, the DNA was obtained in 60 µl 0.01x SSC buffer and transferred into a 0.2ml-reaction tube. The DNA was melted for 2 min at 95°C in a PCR-cycler and rapidly cooled to 4°C (ramp 3°C/s). 2.6 µl 5x reaction buffer (200 mM sodium acetate pH 4.5, at 25°C, 1.5 M NaCl and 10 mM ZnSO₄) and 0.5 µl S1 nuclease (final concentration 50 U) were added. The solution was incubated for 1 h at 37°C. Thereafter, 5 µl 10x antarctic phosphatase reaction buffer (pH 6.0), 30 µl water (molecular biology grade) und 2 µl antarctic phosphatase (NEB) were added. After 7 h incubation at 37°C, the enzyme was inactivated for 5 min at 65°C and the solution was centrifuged for 4 min at 10000x g. The sample was stored at -20°C until chromatography.

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a Grom Sil 100 ODS 2 Fe C18-column (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size) and a Grom Sil 100 ODS-2 Fe pre-column (20 x 4 mm, 5 µm particle size). The samples were isocratically separated at 35°C at a flow rate of 1 ml/min with 10% (v/v)

Publikationen

methanol and 20 mM ammonium acetate as eluent. The nucleosides were detected at 260 nm. Nucleoside solutions (0.05 mM) served as reference.

Pigmentation

Biomass obtained from a 1 l chemostat culture (between 1 g and 2.7 g wet weight of cells; 10) was resuspended in 8 ml ethanol. Cells were sonified five times for 30 s at 40 W and pigments were extracted overnight in the dark. Thereafter, extracts were filtrated through a 0.45 µm Acrodiscs CR 4-mm syringe filter (Pall Gelman laboratory, Dreieich, Germany) and the filtrates were injected into a reverse-phase HPLC consisting of a Waters 996 photo diode array detector (PDA) and a Waters 2695 separation module (Waters, MA). Pigments were separated using a 125 × 4.6 mm vertex column packed with a Eurospher-100 C18 particles of 5-mm in size (Knauer GmbH, Berlin, Germany) as described previously (84). For quantification, the absorption at 430 nm was recorded. Spectra were recorded from 200 to 800 nm. The samples were kept on ice and under dim light during the procedure.

Phospholipids and fatty acids

Phospholipids were extracted from at least 30 mg dry weight of cells grown in batch cultures and analyzed via coupled high performance liquid chromatography – mass spectrometry (HPLC-MS) as described previously (72). Briefly, an aliquot of the lipid extract was injected into a ThermoFinnigan Surveyor HPLC system equipped with a LiChrosphere Diol-100 column (2.1 x 150 mm, 5 µm particle size; Alltech, Germany) coupled to a ThermoFinnigan LCQ Deca XP Plus ion trap mass spectrometer using electrospray ionization in positive mode. Identification of phospholipids was based on mass spectral information according to Sturt (72). Phospholipid compositions were determined relatively to a known amount of an internal standard (1-*O*-hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; PAF) added prior to extraction.

Fatty acids were extracted and analyzed as methyl esters as described by Foss (8). Fatty acid analysis was performed with 200 mg wet weight of cells. When phase separation was poor, the extraction was repeated with 0.5 ml sodium chloride solution (20% w/w). Gas-chromatographic separation was performed on an Optima-5-MS-column 0.25 µm, 30 m x 0.25 mm ID, Macherey-Nagel, Düren).

Quinones

Extraction of quinones was performed using pellets from 500 ml cultures with at least a density of $OD_{600} = 1.0$ with 8 ml of chloroform:methanol (= 2:1 v/v) in glass reaction tubes overnight under dark conditions with an overhead shaker at room temperature. Cell debris was removed by filtration (0.2 μm filter). The solvent was evaporated by nitrogen gas and stored at -20°C . For thin layer chromatography (TLC) the extracts were dissolved in 100 – 200 μl acetone, spotted on a silica-gel TLC plate (Polygram Sil G/UV254, Merck, Darmstadt, Germany) and developed with benzene for 1 h. The bands were visualized under UV light (254nm), scratched from the plate, extracted with 1 ml acetone overnight and concentrated with nitrogen gas. The residual solids were dissolved in 300 μl acetone. Reverse phase HPLC was performed with a Grom Sil 100 ODS 2 Fe C18-column (250 x 4.6 mm, 5 μm particle size) and a Grom Sil 100 ODS-2 Fe pre-column (5 μm , 20 x 4 mm). Column temperature was constant at 40°C . The samples were separated at a flow rate of 1 ml/min with acetonitrile and isopropanol (65:35 v/v) as eluent and the quinones were detected at 254 nm. Spectra were recorded between 210 and 390 nm to verify the quinone chromophor (22).

Distance and similarity

Distance and similarity matrices and dendrogramms with Euclidean and Jaccard coefficients (36) were generated with the program Primer 6 (Version 6.1.11, Primer-E Ltd., Luton, UK).

Results and Discussion

The attached-living planctomycetes of the genus *Rhodopirellula* were recently studied with respect to the biogeography (82). The isolates had been arranged into different OTUs based on genetic information obtained from 16S rRNA sequences and a multi locus sequence analysis (MLSA) as well as DNA-DNA hybridization studies (DDH). Here, based on these results we report a polyphasic taxonomical study on 17 isolates belonging to 12 different genetic groups (OTUs A, B, C, D, E, F, G, H, J, M, N, O).

DNA base ratio

In addition to the already described genotypic approaches (82), the DNA base ratio was investigated. The strains had G+C values between 53 and 60 mol% (Table 1) indicating a genetic diversity broader than a single species. The strains belonging to OTU A showed values between the published 55 mol% for the *R. baltica* SH1^T and 58 mol% (SWK14). The values for OTU B varied from 55 to 56 mol%, the values for OTU H from 56 to 57 mol%. All other strains show divergences of no more than three percent to the *R. baltica* SH1^T except strain SM50^T (60 mol%). The DNA base ratio range within a species should not be more than 3 mol% and within a genus not more than 10 mol% (74). These results indicate that strain SM50^T does not belong to the species *R. baltica*. The next relatives of *R. baltica*, *B. marina* and *P. staleyi* have G+C-contents between 54 and 57 mol% and 57 and 60 mol%, respectively (63, 71).

Table 1: Strains investigated in this study. Nomenclature of the OTU derived from Winkelmann *et al.* (2010) was modified, +, positive; -, negative.

Strain	OTU	G+C content (mol%)	Cell size [µm]	Pigmentation	Pear shaped morphology	Formation of rosettes	Sample site	
SH1 ^T	A	55	1.7-2.3 x 1.1-1.7	Pink to red	+	+	Bay of Kiel	Germany
SWK14	A	58	1.6-2.2 x 1.0-1.6	Pink to red	+	+	Tjärnö	Sweden
WH47	A	55	1.7-2.1 x 1.1-1.5	Pink to red	+	+	Sylt	Germany
6C ^T	B	55	1.6-2.0 x 0.8-1.4	Red	+	+	Porto Cesareo	Italy
CS115	B	56	1.7-2.1 x 0.9-1.5	Pink to red	+	+	Piraeus Kavos	Greece
K1070	B	55	1.8-2.2 x 1.1-1.5	Pink to red	+	+	Helgoland Port	Germany
SM41 ^T	C	55	1.8-2.2 x 1.3-1.7	Pink to red	+	+	San Cataldo	Italy
SM1 ^T	D	57	1.2-1.6 x 1.0-1.4	Rosy	+	+	Pt Andratx Mallorca	Spain
K587 ^T	E	56	1.4-1.8 x 1.1-1.3	Rosy to pink	+	+	Oostende	Belgium
SWK7 ^T	F	53	2.2-2.6 x 1.3-1.7	Pink to red	+	+	Tjärnö	Sweden
WH49 ^T	G	56	1.4-2.0 x 1.4-2.0	Rosy to pink	-	+	Sylt	Germany
SM35 ^T	H	58	1.3-1.9 x 1.3-1.9	Unpigmented	-	+	Bohol Panglao Beach	Philippines
SM23	H	57	1.2-1.6 x 1.2-1.6	Unpigmented	-	+	Bohol Panglao Beach	Philippines
CS14 ^T	J	53	2.1-2.5 x 1.3-1.7	Rosy to pink	+	+	Brest	France
SM50 ^T	M	60	1.1-1.3 x 1.1-1.3	Pink to red	-	+	San Cataldo	Italy
SWK13 ^T	N	54	2.1-2.9 x 1.4-1.8	Pink to red	+	+	Tjärnö	Sweden
SWK21 ^T	O	55	1.7-2.1 x 1.2-1.6	Pink to red	+	+	Tjärnö	Sweden

Morphological characteristics

Light microscopy (Figure 1) revealed a large intracellular compartment in all strains at the reproductive pole, likely the pirellulosome. In addition, all strains showed reproduction through budding. Juvenile motile and adult sessile cells were observed. All strains formed multicellular rosette-like aggregates during growth on M13, M13a and M40 media in batch as well as in chemostat cultures (Figure 1). Most strains showed the characteristic pear shaped morphology, but the strains WH49^T, SM35^T, SM23 and SM50^T were round. The cell size of the strains ranged from 1.1-2.9 x 0.8-2.0 μm . The size of the *R. baltica* SH1^T was 1.7-2.3 x 1.1-1.7 μm . Therefore, the measured sizes were in the range previously reported by Schlesner for *R. baltica* (1.0-2.5 x 1.2-2.3 μm ; 62). Within the OTUs A, B, C and O, the sizes did not show significant differences. In contrast, the strains SM1^T, SM23 and SM50^T were substantially smaller and the strains SWK7^T and SWK13^T larger.

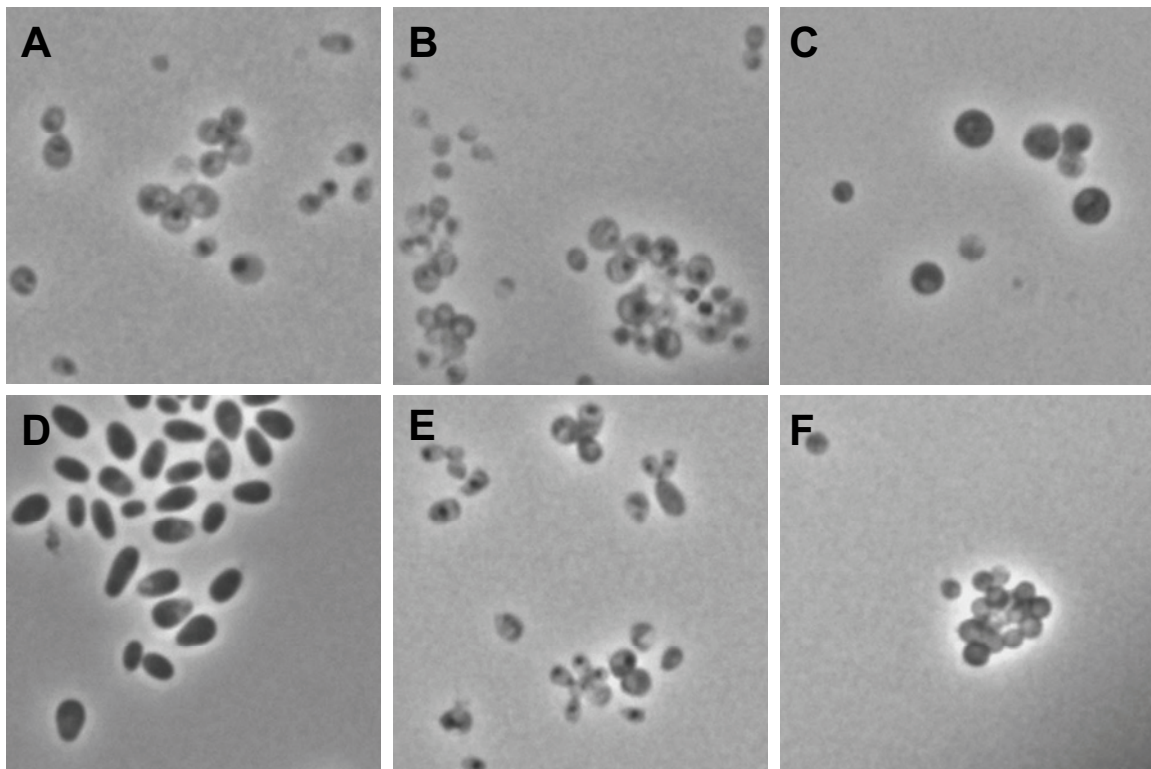


Figure 1: Light micrographs of *Rhodopirellula* strains SH1^T (A), SM1^T (B), WH49^T (C), CS14^T (D) and SWK21^T (E) and *Rhodopilula apulia* SM50^T (F). Scale 10 μm .

The description of the strains by electron microscopy will be written by Winkelmann and Riedel.

Pigmentation

Most strains in this study were pigmented, from light rosy to strong red. The strains belonging to OTU H were unpigmented under all growth conditions. Strain SM1^T was only very light rosy. Most intensively colored were the strains of OTU B, especially strain 6C^T. The pigments of the strains SH1^T, 6C^T, SM41^T, CS96 and SM1^T were characterized by ethanol extraction and HPLC-analysis (Figure 2). The chromatograms showed many compounds with an absorption in the visible range (Table 2). The abundant pigments in all five strains showed three major absorptions wavelengths between 460 and 470 nm, 499 and 501 nm (maximum) and 528 and 533 nm. Strain SM1^T had an additional major pigment with absorption maxima at 425 nm, 452 nm (maximum) and 480 nm. The extraction with ethanol resulted in comparison to extraction with methanol or acetone in extracts with a higher color intensity. The results for strain SH1^T agree with the observations by Schlesner (63). He reported absorption maxima for methanol extracts at 460, 495 and 520 nm. We also confirmed the insolubility in chloroform and petroleum ether and a negative test for polyene carotenoids which argues for the absence of carotenoids.

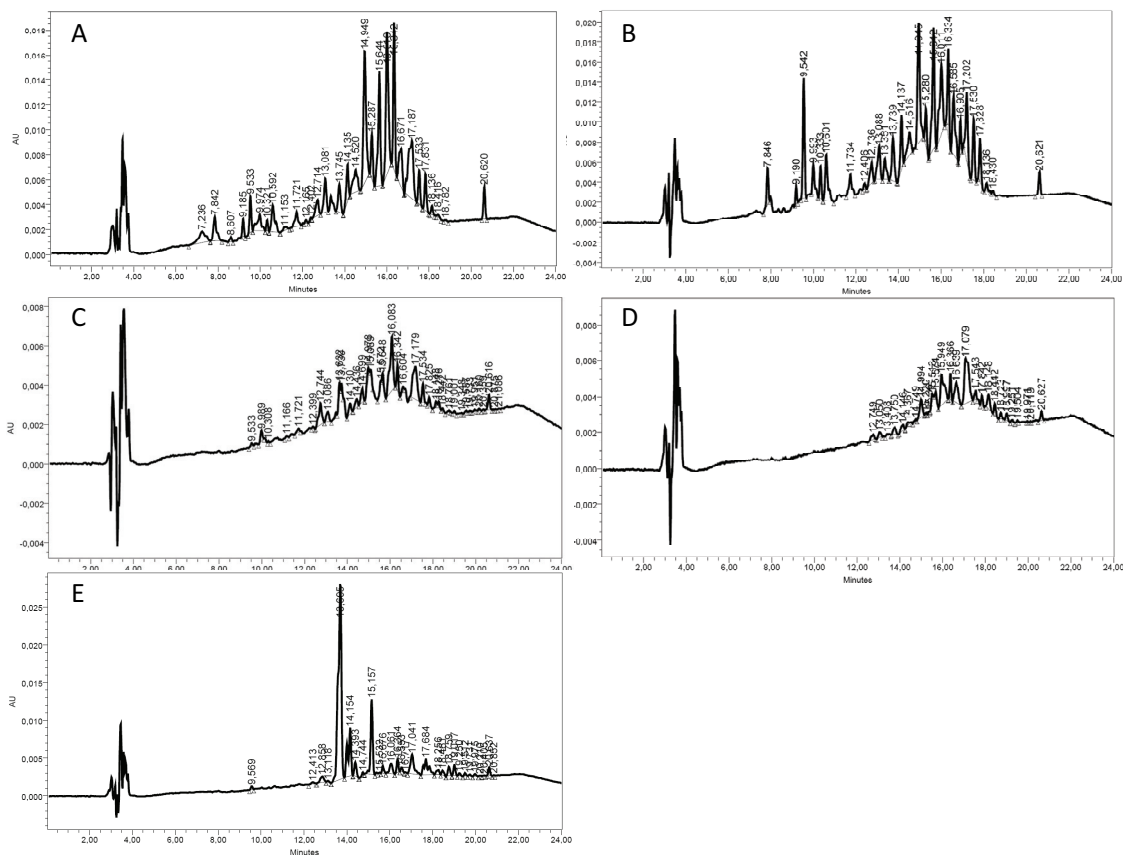


Figure 2: Pigmentation of the *Rhodopirellula* strains SH1^T (A), 6C^T (B), SM41^T (C), CS96 (D) and SM1^T (E), revealed by RP-HPLC of ethanol extracts. The absorption at 430 nm is shown in the y-axis.

Table 2: Dominant pigments in ethanol extracts from cells grown in chemostat cultures.

Strain	OTU	Peak	Retention time (min)	λ_{\max} (nm)
SH1 ^T	A	1	16.010	499, 530, 465
		2	14.949	499, 530, 465
		3	17.187	495, 527, 461
		4	15.644	502, 531, 467
		5	16.342	502, 533, 467
6C ^T	B	1	14.945	501, 531, 466,
		2	9.542	486, 515, 455
		3	15.642	501, 532, 470
		4	16.011	499, 530, 465
		5	16.334	502, 532, 467
SM41 ^I	C	1	16.083	495, 527, 460
		2	13.632	507, 540, 470
		3	17.179	496, 526, 565
		4	12.744	492, 518, 460
		5	14.978	498, 533, 465
CS96	C	1	17.079	498, 531, 465
		2	15.949	501, 531, 466
		3	16.639	497, 529, 460
		4	14.994	497, 525, 460
		5	16.366	502, 532, 466
SM1 ^T	D	1	13.695	452, 480, 425
		2	15.157	390
		3	14.154	447, 474, 420
		4	17.041	501, 532, 465
		5	17.684	502, 532, 470

Physiological properties

The salinity tolerance was tested in solid media containing eight different ASW concentrations between 0 and 300%, with 100% ASW corresponding to a salinity concentration of 34.5 ‰ (Table 3). All strains grew at concentrations from 12.5 to 100% and none at 0 and 300% ASW. In addition, all but one strain (WH49^T) grew in the presence of 200% ASW. Only the strains 6C^T, SM41^T, SWK13^T and SWK21^T did not grow with 6.25% ASW revealing a difference within OTU B. In comparison to the other strains, the OTU A strains uniformly showed the highest biomass formation with 12.5% ASW. These results confirmed that *Rhodopirellula* strains are marine bacteria that cannot grow in fresh water or with extreme salinity concentrations. In prior studies a salt tolerance from 12-200% ASW for the *R. baltica* SH1^T was described (63). Strains isolated from the Baltic Sea (4-35 g/kg, 1.5% salinity in the Bay of Kiel) and the Skagerrak with low salt concentrations did not show any differences concerning their salinity tolerance from strains isolated from the North Sea (3.2-5.5% salinity), the Mediterranean Sea (38 g/kg, 3.74% salinity) and the Pacific Ocean (3.4-3.8% salinity) where the salt concentrations are higher. The fact that the bacteria

Publikationen

tolerate different salt concentrations without showing discrepancies in growth performance indicates a high adaptability to changing environmental conditions and enables them to colonize many different habitats world wide.

Temperature tolerance and optimum temperature

Different growth temperatures are expected for strains isolated from different climate zones. Growth curves were performed for all 17 strains at 4, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 37 and 42°C (Table 3). While all bacteria grew between 20 and 28°C, none of them grew at 42°C and all of them revealed only small growth rates at 4, 12 and 37°C. Strains belonging to OTU A showed the highest temperature tolerance (4-37°C). In contrast, the optimum temperature ranges revealed differences. Strains from the Baltic Sea, the Skagerrak and Sylt grew best at temperatures between 16 and 28°C whereas strains from the Mediterranean Sea and the Pacific Ocean grew best between 28 and 32°C. On the one hand the studied bacteria thus showed a high temperature tolerance. On the other hand the optimum temperatures revealed a specific adaption to the temperatures in the environment. Of special interest is the comparison of the optimum temperatures of the strains within the OTUs A and B. While strain WH47 (Sylt) grew best between 28 and 32°C the strains SH1^T and SWK14 grew best between 16 and 20°C and at 20°C, respectively. The strains belonging to OTU B did not reveal any significant differences although they were isolated from complete different habitats.

Table 3: Physiological traits of the strains. - no vitamin required.

Strain	OTU	Vitamin requirement	ASW (%)	Temperature	Optimum temperature	pH range
SH1 ^T	A	B12	6.25-200	4-37°C	16-20°C	6-10
SWK14	A	B12	6.25-200	4-37°C	20°C	6-10
WH47	A	B12	6.25-200	4-37°C	28-32°C	5.5-10
6C ^T	B	B12	12.5-200	12-37°C	24-32°C	6.5-10
CS115	B	B12	6.25-200	12-32°C	32°C	6.5-10
K1070	B	B12	6.25-200	12-32°C	28-32°C	6.5-10
SM41 ^T	C	B12	12.5-200	12-37°C	28-37°C	6.5-10
SM1 ^T	D	-	6.25-200	16-37°C	28-32°C	6.5-10
K587 ^T	E	-	6.25-200	12-37°C	24-32°C	6.5-10
SWK7 ^T	F	B12	6.25-200	12-32°C	28°C	5.5-10
WH49 ^T	G	-	12.5-200	12-28°C	28°C	6.5-10
SM35 ^T	H	B12	6.25-200	12-32°C	32°C	6.5-9
SM23	H	B12	6.25-200	12-37°C	28-32°C	6.5-9
CS14 ^T	J	-	6.25-200	20-32°C	28-32°C	6.5-10
SM50 ^T	M	B12	6.25-200	16-37°C	32°C	6.5-10
SWK13 ^T	N	B12	12.5-200	12-32°C	28°C	5.5-10
SWK21 ^T	O	B12	12.5-200	16-28°C	20-28°C	6.5-10

pH range

The pH range (Table 3) was analyzed in liquid cultures with pH values between 4 and 11. All strains grew at pH 6.5, 7, 7.5, 8 and 8.5, none at pH 4, 5 and 11, at pH 10 only the strains belonging to OTU H did not grow. At pH 6 only strains belonging to OTU A as well as the strains SWK7^T and SWK13^T showed significant growth. At pH 5.5 only growth of WH47, SWK7^T and SWK13^T could be detected. According to our observations the pH stabilized during incubation at pH 6.0 to 11.0, 4.0, 5.0 and 5.5 at pH 6.11-6.5, 4.21, 5.18 and 5.73, respectively. Thus, bacteria from the Baltic Sea, Skagerrak and Sylt tend to have a wider pH range, whereas the strains from the Philippines have the lowest. Several problems can arise during the investigation of the pH tolerance. The dissociation of H₂CO₃ to a proton and bicarbonate can lead to a reduction of the pH value. Bacteria can adapt pH to favorable conditions by the expulsion of metabolites. Today the pH in the oceans varies between values of 7.9 and 8.25 (57), values at which all strains grew well.

Vitamin requirement

Most strains required addition of vitamin B₁₂ as only vitamin to the growth media in agreement to prior studies with the *R. baltica* SH1^T (Table 3). In contrast, the strains SM1^T, K587^T, WH49^T and CS14^T did not show any vitamin dependence alike the next *Rhodopirellula* relatives *B. marina* and *P. staleyi*.

Carbon sources

The ability to utilize different carbon sources (Table 4) was tested in liquid cultures. All strains were able to grow on cellobiose, galactose, glucose, lactose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, xylose, N-acetylglucosamine, glucuronate, and salicin as only carbon source. None grew with fucose and glutamine. Fructose, lyxose, rhamnose, ribose, trehalose, dextrin, glycerol, mannitol, aesculin, amygdalin, L-lactate, gluconate and chondroitin sulfate can be used for differentiation of the strains. No carbon source can be used to distinguish the OTUs A and B from the other strains, and there was no carbon source that only one strain was able to utilize. Nevertheless, SM35^T and SM23 of OTU H were the only strains that were able to grow with glycerol, strain CS14^T was the only one that could not use chondroitin sulfate and K587^T the only one that could not use trehalose. By far the fewest carbon sources could be utilized by strain SM50^T (only 16 of 29). K587^T, SM41^T and WH47 can use most carbon sources.

Some carbon sources could be used to distinguish within certain OTUs. Mannitol (SH1^T and WH47 only) and L-lactate (WH47 only) were useful to distinguish within OTU A, lyxose (6C^T and CS115 only), mannitol (CS115 only), rhamnose (CS115 and K1070 only) and amygdalin (6C^T and CS115) within OTU B and rhamnose (SM35^T only), amygdalin (SM23 only), L-lactate (SM23 only) and aesculin (SM35^T only) within OTU H. Very high similarities were observed for the strains belonging to OTU A and B and the strains from Tjärnö. The growth time varied strongly. The results of strain SH1^T corresponded to the results obtained by Schlesner (63).

Table 4: Carbon sources for growth and enzyme activities used in the differentiation of strains. +, positive; -, negative.

Strain	OTU	Hydrolysis of				Lipase	Carbon sources											
		Aesculin	Starch	Gelatin			Chondroitin sulfate	Fructose	Trehalose	Lyxose	Dextrin	Mannitol	Rhamnose	Amygdalin	L-Lactat	Gluconate	Ribose	Aesculin
SH1 ^T	A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SWK14	A	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WH47	A	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C ^T	B	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CS115	B	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
K1070	B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SM41 ^T	C	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SM1 ^T	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
K587 ^T	E	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SWK7 ^T	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
WH49 ^T	G	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SM35 ^T	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SM23	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CS14 ^T	J	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SM50 ^T	M	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SWK13 ^T	N	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SWK21 ^T	O	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Enzyme activity

Enzyme activity (Table 4) was tested in solid cultures. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive for all strains, whereas none of the strains were able to hydrolyze casein, DNA and RNA. Aesculin, starch, gelatin and lipase were used to differentiate the strains. All strains but SWK13^T and all but SM41^T and CS14^T were able to hydrolyze aesculin and starch, respectively. Gelatin could be used to differentiate the OTUs A and B since only the strains SH1^T and K1070 were able to hydrolyze it. For lipase no special pattern could be observed. The strains belonging to OTU H did not show any differences. This is a hint that the strains have a very similar metabolism. Except of the DNA hydrolysis, the results of strain SH1^T corresponds to the results obtained by Schlesner (63).

Chemotaxonomic characteristics

The chemotaxonomy of *Rhodopirellula* strains was studied with chromatographic and mass spectroscopic methods. Chemotaxonomic markers like fatty acids, respiratory quinones and phospholipids as well as the pigmentation proved to be powerful tools for the differentiation of different species. The respiratory quinones were not useful to distinct the analyzed strains since all strains possessed menaquinone MK-6 as the only quinone. This result matches very well with prior studies where MK-6 is the dominating menaquinone in all planctomycetes studied so far (65). This knowledge makes the respiratory quinone profile very useful to distinguish the planctomycetes from menaquinone-producing bacteria that possess longer isoprenoid side chains, e.g. MK-8 or MK-12.

Table 5: Relative phospholipid composition (in %) of the strains, separated according to headgroups.

Strain	OTU	PG	PE	PME	PDME	PC	PS
SH1 ^T	A	6.9	0.1	6.3	60.0	26.4	0.0
SWK14	A	13.8	0.0	7.4	55.9	22.9	0.1
WH47	A	11.3	0.0	6.9	53.4	28.4	0.0
6C ^T	B	10.0	17.2	8.4	19.0	45.3	0.0
CS115	B	5.8	0.1	7.5	46.3	40.3	0.0
K1070	B	7.2	1.0	7.4	47.0	37.5	0.0
SM41 ^T	C	4.3	0.0	5.6	78.8	11.0	0.3
SM1 ^T	D	3.7	0.0	7.1	78.2	10.9	0.0
K587 ^T	E	6.3	0.0	12.9	49.7	31.1	0.0
SWK7 ^T	F	7.5	6.5	1.4	51.9	32.7	0.0
WH49 ^T	G	10.9	0.0	11.5	59.7	17.8	0.1
SM35 ^T	H	3.6	0.0	8.7	81.2	6.5	0.0
SM23	H	3.2	0.0	10.9	78.1	7.8	0.0
CS14 ^T	J	8.1	0.0	7.8	66.2	17.9	0.1
SM50 ^T	M	6.1	1.8	6.9	71.0	12.8	1.6
SWK13 ^T	N	10.7	0.0	6.2	55.2	27.9	0.0
SWK21 ^T	O	7.3	8.4	4.3	48.8	31.1	0.1

In contrast, the relative composition ratio of different phospholipids with various headgroups (Table 5) and fatty acids (Table 6) varied strongly between *Rhodopirellula* strains and seem to be robust markers for their distinction. The phospholipids comprised phosphoglycerol (PG), phosphocholine (PC) and derivatives with phosphoethanolamine (PE) headgroups. Phosphatidyl dimethylethanolamine (PDME) was the most dominating phospholipid with values ranging from 46 to 81% in all strains with the exception of 6C^T (19%). The second most abundant phospholipid was PC that ranged from 6.5 to 45% followed by PG and phosphatidylmethylethanolamine (PME) with amounts between 3 and 14% and 1 and 13%, respectively, in all strains. Notable percentages of PE were only found in the strains SWK7^T, SWK13^T and especially in strain 6C^T (17%). Phosphatidylserine (PS) was found only in small quantities in six of the strains.

Phospholipid patterns can be used to distinguish *Rhodopirellula baltica* strains from its next relatives *Blastopirellula marina* and *Pirellula staleyi* since there is no evidence for the presence of PC in these bacteria (63). The PC distribution of the investigated strains varies significantly between the different genetic groups (Table 5) and therefore is of great importance to distinguish them. OTU B contained the highest amounts of PC whereas OTU H contained the lowest leading to a clear distinction from all other strains. Homogenous phospholipid distributions such as observed for

Publikationen

strains belonging to OTU A are another separating feature. The overall phospholipid pattern was very similar. Furthermore, most of the other strains from northern Europe contained higher-than-average amounts of PC and lower amounts of PDME, which is in contrast to the strains from southern Europe (except OTU B) where this ratio was reversed. These results could be indications that the phospholipid pattern is influenced by genetics as well as the biogeography.

Table 6: Relative fatty acid composition (in %) of the strains. -, negative.

Strain	OTU	12:0	14:0	15:0	16:1Δ9c	16:1Δ9t	16:0	17:1Δ9	17:0	18:1Δ9c	18:1Δ9t	18:0	19:0
SH1 ^T	A	0.5	-	0.5	10.1	1.2	27.1	3.6	0.8	49.3	5.5	1.9	-
SWK14	A	1.1	-	-	10.3	1.4	27.7	6.3	1.5	47.7	3.1	0.5	-
WH47	A	0.8	-	-	11.3	-	27.9	4.3	-	53.6	-	0.6	-
6C ^T	B	-	-	-	11.7	0.8	21.0	-	-	49.9	-	-	0.5
CS115	B	-	-	-	8.2	12.3	25.1	3.3	0.6	48.6	-	-	-
K1070	B	0.5	-	0.7	11.2	-	26.0	6.5	2.1	49.6	-	2.3	-
SM41 ^T	C	0.6	0.9	0.6	5.7	22.9	31.7	1.2	-	22.5	-	-	11.9
SM1 ^T	D	-	-	-	3.2	-	32.1	2.0	0.8	47.3	8.0	2.9	-
K587 ^T	E	0.6	-	-	2.9	3.9	22.5	3.5	-	65.7	-	-	-
SWK7 ^T	F	0.7	-	-	8.8	11.4	26.2	7.6	1.7	41.9	-	0.5	-
WH49 ^T	G	-	-	-	0.9	3.9	31.4	1.8	-	55.0	-	-	-
SM35 ^T	H	1.4	-	-	0.5	-	28.4	5.1	1.9	59.3	-	-	-
SM23	H	0.6	-	-	1.7	1.4	26.4	2.3	0.8	63.6	-	1.0	-
CS14 ^T	J	-	-	-	14.7	-	24.3	3.6	-	34.1	19.8	1.5	-
SM50 ^T	M	-	-	-	6.4	7.2	22.8	1.0	-	55.7	-	5.4	-
SWK13 ^T	N	-	-	3.1	10.6	8.2	18.8	12.4	3.1	35.5	3.0	3.0	2.0
SWK21 ^T	O	-	-	-	-	12.7	20.5	4.0	-	48.0	12.5	0.9	-

The *Rhodopirellula* strains contained saturated and monounsaturated fatty acids. The absolute as well as the relative proportion partly varied very strongly. The fatty acid distribution was dominated by C16 and C18 fatty acids (Table 6). Of these, C16:0 and C18:1Δ9c were the most dominating in all strains. The fatty acids C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9 and C18:0 occurred in most strains in notable amounts. If present, C18:1Δ9t was another imported fatty acid. Minor fatty acids like C12:0, C14:0, C15:0, C17:0, C19:0, C20:0 and C22:0 were present in some strains and mostly in lower amounts. The fatty acid composition mainly reflected the observations coming from the phospholipids, but differences between the strains appeared to be less strong. Strains from the northern part of Europe along with the strains belonging to OTU B appeared to be more similar to each other compared to the strains isolated from warmer regions (Table 6). Here, in addition no clear pattern could be observed, except of the strains belonging to OTU H. The results from the fatty acid composition largely mirrored the genetic results as published earlier by Winkelmann (82). Only strain SM41^T was separated from all strains because it is the

only one that contains C16:1 Δ 9t (22.9%) and C19:0 (11.9%) in larger amounts than all other strains and C18:1 Δ 9c in relatively low amounts (22.5%).

Cluster analysis

For better differentiation and visualization of the degree of relation of the analyzed strains an unweighted pair group method with averages (UPGMA) dendrogram was built based on the Euclidean distance and the fatty acid as well as the phospholipid compositions (Figure 3). Two main clusters could be observed. Cluster 1 contains the strains belonging to the OTUs A and B, the strains from Tjärnö and K587^T from Belgium. Associated with this cluster was strain CS14^T from Brest. Cluster 2 contained the strains belonging to OTU H as well as the strains SM1^T, SM50^T and WH49^T. Strain SM41^T belonged to none of the two clusters. Whereas the fatty acid and phospholipid profile results of the strains SH1^T, SWK14, WH47, K1070, CS115, SWK7^T, SWK13^T, SWK21^T, SM35^T, SM23, SM1^T and SM50^T were mainly similar to this observation, strain SM41^T was distinguished from all other strains of cluster 2 through its exceptional fatty acid pattern. Strain 6C^T differed from the other strains in cluster 1 mainly due to the phospholipid profile. The strains CS14^T, K587^T and WH49^T showed no clear cluster affiliation.

According to the lipid profile the strains SWK14 and WH47 are the next relatives to the *R. baltica* SH1^T. Very closely related are also the strains belonging to OTU B (except strain 6C^T).

The cluster analysis therefore reflects the genetic results in many ways but also illustrates a dependence of the lipid composition of *Rhodospirellula* strains to the biogeography. This is especially true for those strains that were isolated from the Skagerrak which showed the highest similarities to the strains belonging to OTU A and B. Also the strains isolated from the warmer seas such as the Mediterranean Sea and the Philippines showed higher similarities to each other. When Euclidean distances were calculated, fatty acids found in large amounts were weighted stronger than fatty acids found in low amounts. This can be misleading results since the latter might be of great importance for the differentiation (75).

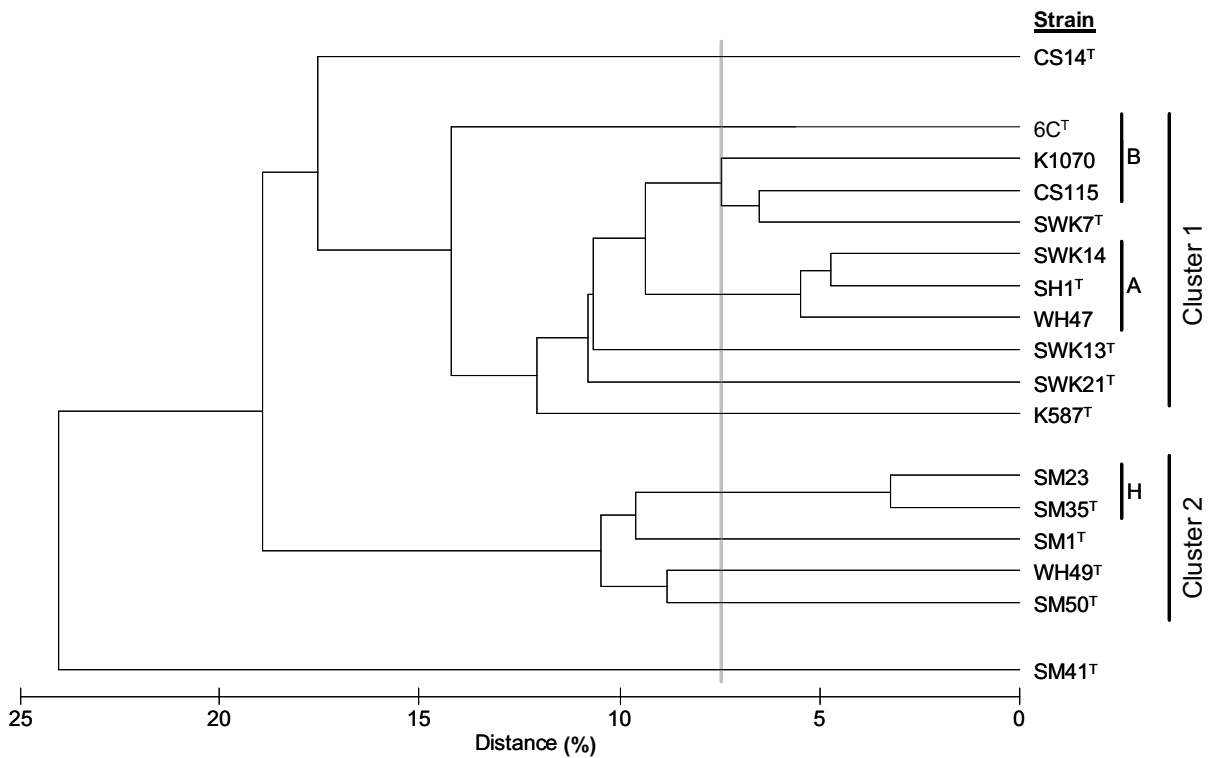


Figure 3: Euclidean distance dendrogram based on phospholipid and total fatty acid composition. The grey line indicates a possible species border based on the differences between OTU A and B, however, the strains 6C^T (OTU B) and SWK7^T (OTU F) represent outlier to this border. Cluster 1 represents next relatives of the *R. baltica* SH1^T.

According to literature in polyphasic approaches lipid composition is standard to describe an organism (11, 23, 30, 50, 66) and the degree of relation of lipid data are mainly consistent to phylogenetic data. For a clear description of organisms reproducible lipid profiles by defined methods (35, 51) and highly standardized growth conditions are of great importance (25, 56, 59). Accordingly, the comparability between different laboratories is often difficult, e.g. the number of C18 fatty acids for *R. baltica* SH1^T of this work with a value of 56.7% varies from the results reported by Schlesner (63) with 46.7%. The results of different FAME-experiments in our lab with SH1^T revealed variations of no more than 5% for C18 fatty acids, thus demonstrating a good reproducibility. In addition, the lipid profile is swayed by lots of environmental influences. Growth conditions like medium composition, pH, age and growth temperature can cause such variations. These variations are usually mostly quantitatively but seldom also qualitative changes can occur. For instance, under deficient conditions more saturated fatty acids and a switch from cis to trans single saturated fatty acids can be observed. A low pH leads to more elongated fatty acids

(48). Low temperature leads to higher amounts of unsaturated fatty acids and the formation of short-chain fatty acids (29, 49, 58, 76, 48) with the latter causing a change to a higher membrane fluidity (6, 15, 27). The amount of unsaturated fatty acids increases with temperature, presumably to make the membrane more stable. The same applies for PC that stabilizes the membrane (20).

Advantages of the FAME analysis are that it is a fast, uncomplicated method for the characterization of bacteria with high automation (73) and that it can be used as a connection between structure analysis and function of microbial communities (52). In addition, its high comparability and conformance to other polyphasic approaches make it an inherent part of systematics. According to literature every taxa has its distinct fatty acid profile (28). Strong quantitative variations can occur within a species, but only small fatty acid variations exist between different genera. Thus, the fatty acid profile is mainly species specific and seldom genus specific. In combination with the phospholipid profile this approach can be used to reveal intraspecies variations and to differentiate strains of one species. However, only the combination with 16S rRNA analysis, DNA-DNA hybridization and physiological experiments can deliver reliable results. Especially genetic data are of great importance to initially classify the bacteria. Nevertheless, the weak resolution of 16S rRNA analysis between closely related strains makes lipid profiles necessary since different species can have identical sequences (9).

Literature and the results obtained in this work confirm that the chemical diversity correlates with the gene diversity (63, 65). Furthermore, lipid profiles mainly fit to phylogenetic profiles and are useful for a closer arrangement. Abraham (1, 2) described for *Caulobacter* that mass spectroscopy of lipids lead to the same results as phylogenetic analyses (1, 2). Moreover, lipid profiles proved to be useful for finding false identifications of genetic data (48).

As pointed out earlier, PC is of great importance to distinguish *R. baltica* strains from each other and other planctomycetes and to stabilize the membrane. This raises the question for its role in *R. baltica* strains. PC is the major phospholipid in the endoplasmic reticulum and a major phospholipid in eukaryotes (41). 10% of all bacteria possess PC (68) including cyanobacteria and rhizobia. It is mainly present in bacteria with extensive intracellular membranes (ICM) and those that live in association with eukaryotes. ICM systems are often found in bacteria containing unsaturated fatty acids and PC. Rhizobia use PC as major membrane component. According to Hagen and Goldfine (21), it plays an important role in elaboration of

Publikationen

cytoplasmic membranes. Likewise, PC and PE have been reported to be the major polar head groups of ladderanes in anammox bacteria, a group of planctomycetes that contains the most dense bacterial membrane found so far (5). These facts speak for a stabilized ICM system in *Rhodopirellula* strains.

Due to the high fluctuation of the PC content (especially within OTU B), it is of great importance how it is synthesized. For most bacteria it is described that PC is synthesized by stepwise methylation of PS via PE, PME and PDME (N-methylation pathway). A second PC synthesis pathway is the CDP-choline pathway that is described as mainly present in eukaryotes and with eukaryotes associated bacteria that obtain PC from its host. The phosphatidylcholine synthase as major enzyme of this pathway can also be found in *R. baltica* (43, 68).

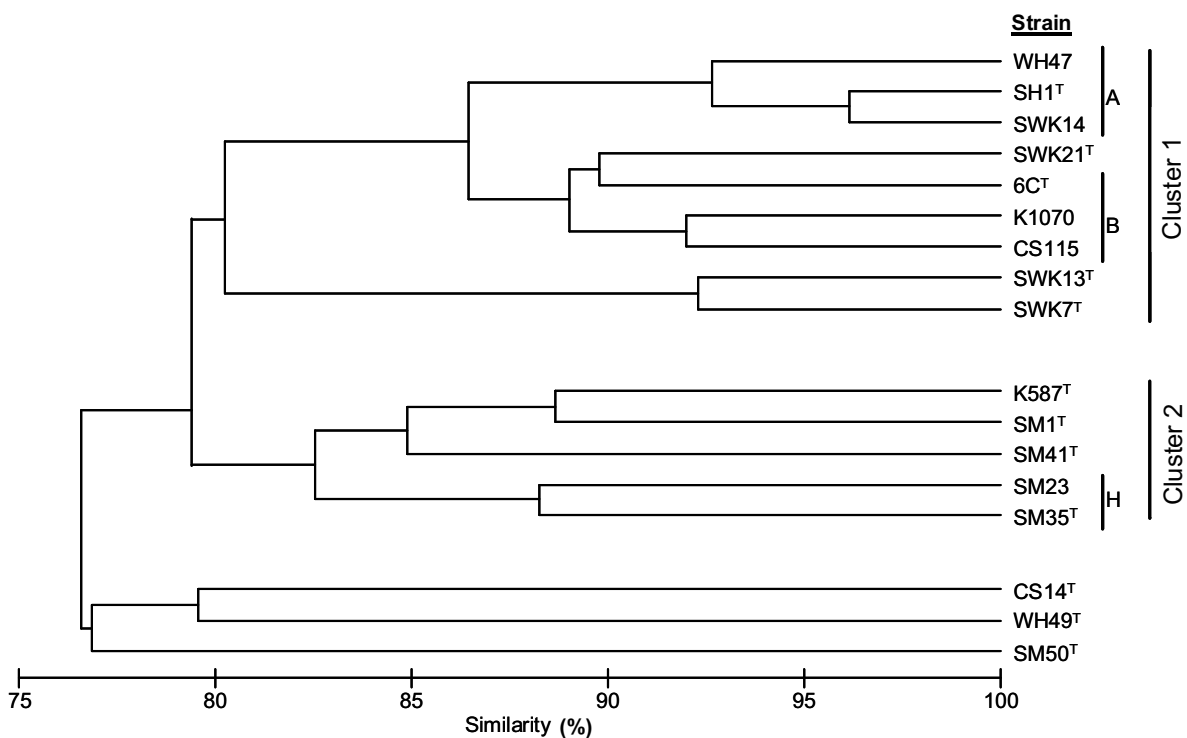


Figure 4: Similarity dendrogram calculated with the Jaccard coefficient and the physiological data (morphology, growth substrates, salinity, temperature, pH and vitamin dependence) – verification of 0 and 1 is pear-shaped (= 1), not pear-shaped (= 0), growth on substrate (= 1), vitamin B₁₂-dependence (= 1), growth at given salinity, temperature, pH (= 1). Cluster 1 represents the next relatives of the *R. baltica* SH1^T.

Cluster analysis of the physiological data based on the Jaccard coefficient showed a related pattern to the Euclidean distance dendrogram (Figure 4). Here, also the strains belonging to the OTUs A and B as well as the strains from Tjärnö form one cluster. Cluster 2 is formed by the strains SM23, SM35^T, SM1^T, SM41^T and K587^T. The three strains CS14^T, WH49^T and SM50^T vary significantly from the other

investigated strains. Apart from the differences already mentioned above, both chemotaxonomic as well as physiological data reflect the genetic data obtained by MLSA (82) therefore supporting these results.

Strain collection

Based on our results that reveal a high diversity in the strain collection we propose an emended classification of the genus *Rhodopirellula*, the description of the genus *Rhodopilula*, and ten new *Rhodopirellula* and one *Rhodopilula* species.

Properties that differentiate the genera *Rhodopirellula* and *Rhodopilula*

The species *Rhodopilula* is comprised of tiny cells, comparatively smaller than those of the genus *Rhodopirellula*. Only a few carbon sources are utilized. The G+C content is with 60 mol% higher than in the genus *Rhodopirellula*. The cells have a comparatively high content of C18:0 fatty acids (5.4%) and a low content of phosphatidylcholine (12.8%).

Emended description of *Rhodopirellula* gen. nov. Schlesner et al. 2004

Rhodopirellula (Rho.do.pi.rel'lu.la. Gr. neut. n. rhodon a rose; N.L. fem. n. *Pirellula* name of a bacterial genus; N.L. fem. n. *Rhodopirellula* a red *Pirellula*).

Cells are ovoid, ellipsoidal, club-shaped or pear-shaped, occurring singly or in rosettes by attachment at the smaller cell pole. Buds are formed at the broader cell pole. Buds may have a single flagellum inserted subpolarly at the proximal pole. Adult cells are immobile. Crateriform structures and fimbriae are found in the upper cell region. Colonies are rosy or pink to red in color, however, some strains are unpigmented. Non-sporulating. Strictly aerobic. Catalase- and cytochrome oxidase-positive. The proteinaceous cell wall lacks peptidoglycan. The major polyamines are putrescine, cadaverine and sym-homospermidine. The major menaquinone is MK-6. The major fatty acids are C16:0 and C18:1 Δ 9c. Minor fatty acids not present in all species are C12:0, C14:0, C15:0, C16:1 Δ 9c, C16:1 Δ 9t, C17:1 Δ 9, C17:0, C18:1 Δ 9t, C18:0, C19:0, C20:0 and C22:0. The major phospholipids are phosphatidylcholine and methylated phosphatidylethanolamines (> 50%). All species also contain phosphatidylglycerol. This genus is a member of the phylum *Planctomycetes*, order *Planctomycetales*, family *Planctomycetaceae*, as currently defined primarily on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. The type species is *Rhodopirellula baltica*.

Emended description of *Rhodopirellula baltica* Schlesner et al., 2004

Rhodopirellula baltica (bal'ti.ca. L. fem. adj. baltica pertaining to the Baltic Sea, the place of isolation).

Cells are 1.0-2.5 x 1.2-2.3 µm in size. A single flagellum is subpolarly inserted at the proximal pole. Colonies are round, smooth and pink to red in color. The salinity range was between 2 and 69 per mill salinity. Growth was observed between pH values of 6.5 and 10 and is optimal between 16 and 32°C. No growth is observed above 37°C. Vitamin B₁₂ is required for growth. The bacterium is strictly aerobic. Glucose is not fermented. Nitrate cannot serve as an electron acceptor. Carbon sources utilized are as follows: cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, maltose, mannose, melibiose, melezitose, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, aesculin, gluconate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Carbon sources not utilized are as follows: fucose, sorbose, methylamine, methylsulfonate, methanol, ethanol, erythritol, adonitol, arabitol, dulcitol, inositol, sorbitol, acetate, adipate, benzoate, caproate, citrate, formate, fumarate, glutarate, malate, 2-oxoglutarate, phthalate, propionate, pyruvate, succinate, tartrate, alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, cystine, glutamine, glutamate, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, norleucine, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, urea, indole, inulin and pectin. Peptone, casamino acids, yeast extract, gelatin, ammonium, nitrate and N-acetylglucosamine are each utilized as a nitrogen source, but neither nicotinate nor urea is utilized. Aesculin and starch are hydrolysed, but alginate, casein, cellulose, chitin and Tween 80 are not hydrolysed. No haemolytic activity is found with horse, calf or sheep blood. Catalase and cytochrome oxidase activities are observed, but urease activity is not observed. H₂S, but not acetoin or indole, is produced. Cells are sensitive to tetracycline, but resistant to streptomycin, ampicillin and penicillin. The G+C content of the DNA is 53-58 mol% (55 mol% for the type strain). Major phospholipids are phosphatidylcholine (> 20%) and phosphatidyl dimethylethanolamine (> 50%).

The type strain is SH1^T (=IFAM 1310^T=DSM 10527^T=NCIMB 13988^T).

Description of *Rhodopirellula europaea* sp. nov.

Rhodopirellula europaea (eu.ro.paea L. fem. adj. europa pertaining to Europe, the continent where the species was found).

The cells are 1.6-2.2 x 0.8-1.5 µm large, with a pear-shaped morphology and a pink to intensive red pigmentation. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 12 to 32°C and between pH values of 6.5 and 10. Vitamin B₁₂ is the only vitamin needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, ribose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, gluconate, glucuronate, N-acetylglucosamine, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, glycerol, aesculin, L-lactate and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and lipase are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 55-56 mol%. Phosphatidylcholine is with > 37% a very abundant phospholipid. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C12:0, C15:0, C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9, C17:0, C18:0 and C19:0.

The type strain is 6C^T (= DSM 24037^T = JCM 17608^T).

Description of *Rhodopirellula sallentina* sp. nov.

Rhodopirellula sallentina (sal'len.ti.na L. neu. adj. sallentium pertaining to the Salento peninsula, the region of origin).

The cells are 1.8-2.2 x 1.3-1.7 µm large, with a pear-shaped morphology and a pink to red pigmentation. The salinity tolerance range is between 12.5 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 12 to 37°C and between pH values of 6.5 and 10. Vitamin B₁₂ is the only vitamin needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, rhamnose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, mannitol, amygdalin, aesculin, L-lactate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, ribose, glycerol, gluconate and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin is hydrolyzed, but casein, DNA, RNA, gelatin, lipase and starch are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 55 mol%. Over 75% of the phospholipids are phosphatidyl dimethylethanolamine. Dominating fatty acids are C16:1Δ9t, C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C12:0, C14:0, C15:0, C16:1Δ9c, C17:1Δ9, C18:0, C19:0, C20:0 and C22:0.

The type strain is SM41^T (= DSM 24067^T = JCM 17618^T).

Description of *Rhodopirellula maiorica* sp. nov.

Rhodopirellula maiorica (mai.ori.ca L. fem. adj. maiorica pertaining to the Majorca island, the region of origin).

The cells are 1.2-1.6 x 1.0-1.4 μm large, almost round with a light rosy pigmentation. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200%. Cells grow at temperatures from 16 to 37°C and between pH values of 6.5 and 10. No vitamin is required for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, mannitol, amygdalin, L-lactate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, rhamnose, ribose, glycerol, glutamine, aesculin and gluconate. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and gelatin are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 57 mol%. Phosphatidylmethylethanolamine is the most abundant phospholipid (> 75%). Dominating fatty acids are C16:0 and C18: Δ 9c. Minor fatty acids are C16:1 Δ 9c, C17:1 Δ 9, C17:0, C18:1 Δ 9t and C18:0.

The type strain is SM1^T (= DSM 24050^T = JCM 17615^T).

Description of *Rhodopirellula flandrensis* sp. nov.

Rhodopirellula flandrensis (flan.dren.sis L. fem. adj. flandrensis pertaining to Flanders, the region of origin).

The cells are 1.4-1.8 x 1.1-1.3 μm large, with a pear-shaped morphology and a rosy to pink pigmentation. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200%. Cells grow at temperatures from 12 to 37°C and between pH values of 6.5 and 10. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, mannitol, aesculin, amygdalin, L-lactate, gluconate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, rhamnose, ribose, trehalose, glycerol and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and gelatin are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 56 mol%. Dominating phospholipids are phosphatidylmethylethanolamine and phosphatidylcholine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18: Δ 9c. Minor fatty acids are C12:0, C15:0, C16:1 Δ 9c, C16:1 Δ 9t and C17:1 Δ 9.

The type strain is K587^T (= DSM 24051^T = JCM 17611^T).

Description of *Rhodopirellula gimesia* sp. nov.

Rhodopirellula gimesia (gi.me.sia L. fem. adj. gimesia from the name Gimesi, a Hungarian botanist, who first reported the observation of planctomycetes in 1924).

The cells are 2.2-2.6 x 1.3-1.7 µm large, with a pear-shaped morphology and a pink to red pigmentation. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200‰. Cells grow at temperatures from 12 to 32°C and between pH values of 5.5 and 10. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, rhamnose, sucrose, trehalose, xylose, N-acetylglucosamine, mannitol, amygdalin, L-lactate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, ribose, dextrin, glycerol, aesculin, gluconate and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and gelatin are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 53 mol%. Dominating phospholipids are phosphatidylidimethylethanolamine and phosphatidylcholine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C12:0, C15:0, C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9, C17:0 and C18:0.

The type strain is SWK7^T (= DSM 24063^T = JCM 17620^T).

Description of *Rhodopirellula syltensis* sp. nov.

Rhodopirellula syltensis (sylv.en.sis L. neu adj. sylt pertaining to the Sylt island, the region of origin).

The cells are 1.4-2.0 x 1.4-2.0 µm large, round with a rosy to pink pigmentation. The salinity tolerance range is between 12.5 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 12 to 28°C and between pH values of 6.5 and 10. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose, N-acetylglucosamine, mannitol, amygdalin, L-lactate, gluconate, glucuronate, salicin, and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, rhamnose, ribose, dextrin, glycerol, aesculin and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and gelatin are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 56 mol%. Dominating phospholipid is phosphatidylidimethylethanolamine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18Δ9c. Minor fatty acids are C16:1Δ9c, C16:1Δ9t and C17:1Δ9.

The type strain is WH49^T (= DSM 24042^T = JCM 17625^T).

Publikationen

Description of *Rhodopirellula philippinensis* sp. nov.

Rhodopirellula philippinensis (phil.ip.pi.nen.sis L. fem. adj. philippinensis pertaining to the Philippines, the region of origin).

The cells are 1.2-1.9 x 1.2-1.9 µm large, with a pear-shaped morphology. They are unpigmented. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 12-37°C and between pH values of 6.5 and 9. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, glycerol, mannitol, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, ribose, gluconate and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, gelatin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA and RNA are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is between 57-58 mol%. Over 75% of the phospholipids are phosphatidylmethylethanolamines. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C12:0, C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9, C17:0 and C18:0.

The type strain is SM35^T (= DSM 24066^T = JCM 17617^T).

Description of *Rhodopirellula clava* sp. nov.

Rhodopirellula clava (cla.va L. fem. adj. clava meaning cudgel, due to its cudgel-like morphology).

The cells are 2.1-2.5 x 1.3-1.7 µm large, with a cudgel-like morphology and a rosy to pink pigmentation. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 12 to 32°C and between pH values of 6.5 and 10. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, lactose, galactose, glucose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose, N-acetylglucosamine, mannitol, L-lactate, glucuronate and salicin, not utilized are fucose, rhamnose, ribose, dextrin, glycerol, amygdalin, aesculin, gluconate, glutamine and chondroitin sulfate. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin is hydrolyzed, but casein, DNA, RNA, starch, gelatin and lipase are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 53 mol%. Dominating phospholipid is phosphatidylmethylethanolamine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C16:1Δ9c, C17:1Δ9, C18:1Δ9t and C18:0.

The type strain is CS14^T (= DSM 24082^T = JCM 17609^T).

Description of *Rhodopirellula magna* sp. nov.

Rhodopirellula magna (mag.na L. fem. adj. magna meaning large, due to its large cell-morphology).

The cells are 2.1-2.9 x 1.4-1.8 µm large, with a pear-shaped morphology and a pink to red pigmentation. The salinity tolerance range is between 12.5 and 200%. Cells grow at temperatures from 12 to 32°C and between pH values of 5.5 and 10. No vitamin is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, rhamnose, sucrose, trehalose, xylose, N-acetylglucosamine, amygdalin, L-lactate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, ribose, dextrin, glycerol, mannitol, aesculin, gluconate and glutamine. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Gelatin, lipase and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and aesculin are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 54 mol%. Dominating phospholipids are phosphatidylmethylethanolamine and phosphatidylcholine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C15:0, C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9, C17:0, C18:1Δ9t, C18:0 and C19:0. The type strain is SWK13^T (= DSM 24064^T = JCM 17621^T).

Description of *Rhodopirellula bahusiensis* sp. nov

Rhodopirellula bahusiensis (ba.hu.si.en.sis L. fem. adj. bahusiensis pertaining to the Bahusia, the region of origin).

The cells are 1.7-2.1 x 1.2-1.6 µm large, with a pear-shaped morphology and a pink to red pigmentation. The salinity tolerance range is between 12.5 and 200%. Growth occurs at temperatures from 16 to 28°C and between pH values of 6.5 and 10. Vitamin B₁₂ is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, lyxose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, trehalose, xylose, dextrin, N-acetylglucosamine, mannitol, amygdalin, aesculin, gluconate, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate, not utilized are fucose, glycerol, glutamine and L-lactat. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin, gelatin and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA and lipase are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 55 mol%. Dominating phospholipids are phosphatidylmethylethanolamine and phosphatidylcholine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C16:1Δ9t, C17:1Δ9, C18:1Δ9t and C18:0.

Publikationen

The type strain is SWK21^T (= DSM 24079^T = JCM 17623^T).

Description of *Rhodopilula* gen. nov.

Rhodopilula (Rho.do.pi.lu.la. Gr. neut. n. rhodon a rose; N.L. fem. n. pilula a small ball; N.L. fem. n. *Rhodopilula* a red small ball).

The cells are round and form multicellular rosette-like aggregates. They reproduce by budding. The major menaquinone is MK-6. The species contains phosphoglycerol, phosphoethanolamine, phosphomethylethanolamine, phosphodimethylethanolamine, phosphocholine and phosphoserine as phospholipid headgroups. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. This genus is a member of the phylum *Planctomycetes*, order *Planctomycetales*, family *Planctomycetaceae*, as currently defined primarily on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. The type species is *Rhodopilula apulia*.

Description of *Rhodopilula apulia* sp. nov.

Rhodopilula apulia (apu.lia. L. fem. adj. apulia pertaining to Apulia, the region of origin).

The cells are 1.1-1.3 x 1.1-1.3 μm large. Colonies are round, smooth and pink to red in color. The salinity tolerance range is between 6.25 and 200‰. Growth occurs at temperatures from 16 to 37° and between pH values of 6.5 and 10. Vitamin B₁₂ is needed for growth. Carbon sources utilized are cellobiose, galactose, glucose, lactose, melibiose, maltose, mannose, melezitose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose, N-acetylglucosamine, glucuronate, salicin and chondroitin sulfate. Not utilized are fucose, fructose, lyxose, rhamnose, ribose, dextrin, glycerol, mannitol, amygdalin, aesculin, gluconate, glutamine and L-lactat. The catalase and cytochrome oxidase tests were positive. Aesculin and starch are hydrolyzed, but casein, DNA, RNA, gelatin and lipase are not hydrolyzed. The G+C content of DNA is 60 mol%. Dominating phospholipid is phosphatidyl dimethylethanolamine. Dominating fatty acids are C16:0 and C18:Δ9c. Minor fatty acids are C16:1Δ9c, C16:1Δ9t, C17:1Δ9, and C18:0.

The type strain is SM50^T (= DSM 24084^T = JCM 17619^T).

Acknowledgments

We thank Mohammad Al-Najjar, Julius Lipp, Jesicca Caspar, Emmo Hamann, Maik Kallaene and Christina Probian for technical assistance. This study was funded by the Max Planck Society.

References

1. **Abraham, W. R., H. Meyer, S. Lindholst, M. Vancanneyt, and J. Smit.** 1997. Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter* sensu lato, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **20**:522-539.
2. **Abraham, W. R., C. Strompl, H. Meyer, S. Lindholst, E. R. B. Moore, R. Christ, M. Vancanneyt, B. J. Tindall, A. Bennasar, J. Smit, and M. Tesar.** 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:1053-1073.
3. **Bengtsson, M. M., and L. Ovreas.** 2010. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *BMC Microbiology* **10**:261
4. **Bondoso, J., L. Albuquerque, M. F. Nobre, A. Lobo-da-Cunha, M. S. Dacosta, and O. M. Lage.** 2011. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov. A novel planctomycete isolated from a freshwater aquarium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 10.1099/ijms.0.027474-0
5. **Boumann, H. A., E. C. Hopmans, I. van de Leemput, H. J. M. Op den Camp, J. van de Vossenberg, M. Strous, M. S. M. Jetten, J. S. S. Damste, and S. Schouten.** 2006. Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups. *FEMS Microbiology Letters* **258**:297-304.
6. **Canillac, N., M. T. Pommier, and A. M. Gounot.** 1982. Effect of incubation-temperature on lipid-composition of *Arthrobacter* and *Corynebacterium*. *Canadian Journal of Microbiology* **28**:284-290.
7. **Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of genus *Vibrio* - numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* **104**:410-433.
8. **Foss, S., U. Heyen, and J. Harder.** 1998. *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, alpha-pinene, 2-carene, and alpha-phellandrene) and nitrate. *Systematic and Applied Microbiology* **21**:237-244.

9. **Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk.** 1992. How close is close - 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**:166-170.
10. **Frank, C. S., P. Langhammer, B. M. Fuchs, and J. Harder.** 2011. Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*. *Archives of Microbiology* **193**:365-372.
11. **Fredrickson, H. L., T. E. Cappenberg, and J. W. Deleeuw.** 1986. Polar lipid ester-linked fatty acid composition of Lake Vechten seston - an ecological application of lipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **38**:381-396.
12. **Fuerst, J. A.** 2005. Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annual Review of Microbiology* **59**:299-328.
13. **Fuerst, J. A., H. G. Gwilliam, M. Lindsay, A. Lichanska, C. Belcher, J. E. Vickers, and P. Hugenholtz.** 1997. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:254-262.
14. **Fukunaga, Y., M. Kurahashi, Y. Sakiyama, M. Ohuchi, A. Yokota, and S. Harayama.** 2009. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov and *Phycisphaerae* classis nov in the phylum *Planctomycetes*. *Journal of General and Applied Microbiology* **55**:267-275.
15. **Fulco, A. J.** 1969. Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids by Bacilli .I. Temperature Induction of Desaturation Reaction. *Journal of Biological Chemistry* **244**:889-895.
16. **Gade, D., H. Schlesner, F. O. Glockner, R. Amann, S. Pfeiffer, and A. Thomm.** 2004. Identification of planctomycetes with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. *Microbial Ecology* **47**:243-251.
17. **Gade, D., T. Stuhmann, R. Reinhardt, and R. Rabus.** 2005. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. *Environmental Microbiology* **7**:1074-1084.
18. **Gimesi, N.** 1924. Hydrobiological tanulmányok [hydrobiological studies]. *Planctomyces bekefii* Gim. nov. gen. et sp. [Hungarian with German translation]. Budapest: Kiadja a Magyar Cizterci:1-8.
19. **Glockner, F. O., M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, and R. Reinhardt.** 2003. Complete genome sequence of the marine

Publikationen

- planctomycete *Pirellula* sp strain 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:8298-8303.
20. **Goldfine, H.** 1984. Bacterial membranes and lipid packing theory. Journal of Lipid Research **25**:1501-1507.
 21. **Goldfine, H., and P. O. Hagen.** 1968. N-methyl groups in bacterial lipids .3. Phospholipids of *Hyphomicrobia*. Journal of Bacteriology **95**:367-375
 22. **Goodfellow, M., and D. Minnikin.** 1985. Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press Inc., London.
 23. **Guckert, J. B., D. B. Ringelberg, D. C. White, R. S. Hanson, and B. J. Bratina.** 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the *Proteobacteria*. Journal of General Microbiology **137**:2631-2641.
 24. **Hall, P. O., and R. C. Aller.** 1992. Rapid, small-volume, flow-injection analysis for CO₂ and NH₄⁺ in marine and fresh-waters. Limnology and Oceanography **37**:1113-1119.
 25. **Harwood, J. L., and N. J. Russell.** 1984. Lipids in plants and microbes. George Allen and Unwin Co, London.
 26. **Hieu, C. X., B. Voigt, D. Albrecht, D. Becher, T. Lombardot, F. O. Glockner, R. Amann, M. Hecker, and T. Schweder.** 2008. Detailed proteome analysis of growing cells of the planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T. Proteomics **8**:1608-1623.
 27. **Kaneda, T.** 1972. Positional reference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. Biochimica Et Biophysica Acta **280**:297-305.
 28. **Kates, M.** 1964. Bacterial Lipids. Advances in Lipid Research **2**:17-90.
 29. **Kis, M., O. Zsiros, T. Farkas, H. Wada, F. Nagy, and Z. Gombos.** 1998. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**:4209-4214.
 30. **Kohring, L. L., D. B. Ringelberg, R. Devereux, D. A. Stahl, M. W. Mittelman, and D. C. White.** 1994. Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiology Letters **119**:303-308.
 31. **Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje.** 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**:2567-2572.

32. **Kulichevskaya, I. S., O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, W. I. C. Rijpstra, J. S. S. Damste, and S. N. Dedysh.** 2009. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp nov., a novel stalked, *Gemmata*-like planctomycete from a Siberian peat bog. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59**:357-364.
33. **Kulichevskaya, I. S., A. O. Ivanova, O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, J. S. S. Damste, and S. N. Dedysh.** 2008. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **58**:1186-1193.
34. **Kulichevskaya, I. S., A. O. Ivanova, S. E. Belova, O. I. Baulina, P. L. E. Bodelier, W. I. C. Rijpstra, J. S. S. Damste, G. A. Zavarzin, and S. N. Dedysh.** 2007. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **57**:2680-2687.
35. **Lambert, M. A., and C. W. Moss.** 1983. Comparison of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. Journal of Clinical Microbiology **18**:1370-1377.
36. **Legender, P., and L. F. J. Legendre.** 1998. Numerical ecology (developments in environmental modelling). Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.
37. **Liesack, W., H. Konig, H. Schlesner, and P. Hirsch.** 1986. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. Archives of Microbiology **145**:361-366.
38. **Liesack, W., R. Soller, T. Stewart, H. Haas, S. Giovannoni, and E. Stackebrandt.** 1992. The influence of tachytelically (rapidly) evolving sequences on the topology of phylogenetic trees - intrafamily relationships and the phylogenetic position of *Planctomycetaceae* as revealed by comparative-analysis of 16S ribosomal RNA sequences. Systematic and Applied Microbiology **15**:357-362.
39. **Lindsay, M. R., R. I. Webb, M. Strous, M. S. Jetten, M. K. Butler, R. J. Forde, and J. A. Fuerst.** 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. Archives of Microbiology **175**:413-429.

Publikationen

40. **Lopez-Garcia, P., A. Lopez-Lopez, D. Moreira, and F. Rodriguez-Valera.** 2001. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:193-202.
41. **Lopez-Lara, I. M., C. Sohlenkamp, and O. Geiger.** 2003. Membrane lipids in plant-associated bacteria: Their biosyntheses and possible functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:567-579.
42. **Lyman, J., and F. R. H.** 1940. Composition of sea water. *Journal of Marine Research* **3**:134-146.
43. **Martinez-Morales, F., M. Schobert, I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger.** 2003. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology-SGM* **149**:3461-3471.
44. **Mesbah, M., U. Premachandran, and W. B. Whitman.** 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**:159-167.
45. **Morris, R. M., K. Longnecker, and S. J. Giovannoni.** 2006. *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environmental Microbiology* **8**:1361-1370.
46. **Musat, N., U. Werner, K. Knittel, S. Kolb, T. Dodenhof, J. E. E. van Beusekom, D. de Beer, N. Dubilier, and R. Amann.** 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **29**:333-348.
47. **Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. H. Schleifer.** 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology-Uk* **144**:3257-3266.
48. **Niepel, T.** 1999. Chemotaxonomie ausgewählter gram-positiver Bakterien anhand ihrer polaren Lipide, Sequenzierung ihrer 16S rDNAs und Vergleich beider Methoden. Dissertation, Universität Braunschweig.
49. **Nishida, I., and N. Murata.** 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**:541-568.
50. **Nunes, O. C., M. M. Donato, C. M. Manaia, and M. S. Dacosta.** 1992. The polar lipid and fatty acid composition of *Rhodothermus* strains. *Systematic and Applied Microbiology* **15**:59-62.

51. **Orgambide, G. G., R. N. Reusch, and F. B. Dazzo.** 1993. Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalyzed transesterification procedures. *Journal of Bacteriology* **175**:4922-4926.
52. **Pelz, O., C. Hesse, M. Tesar, R. B. Coffin, and W. R. Abraham.** 1997. Development of methods to measure carbon isotope ratios of bacterial biomarkers in the environment. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **33**:131-144.
53. **Pfennig, N., and S. Wagener.** 1986. An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **4**:303-306.
54. **Pimentel-Elardo, S., M. Wehrl, A. B. Friedrich, P. R. Jensen, and U. Hentschel.** 2003. Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquatic Microbial Ecology* **33**:239-245.
55. **Prakash, O., M. Verma, P. Sharma, M. Kumar, K. Kumari, A. Singh, H. Kumari, S. Jit, S. K. Gupta, and R. Lal.** 2007. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian Journal for Microbiology* **47**:98-108.
56. **Ratledge, C., and S. G. Wilkinson.** 1988. An overview of microbial lipids, vol. 1. Academic Press, London.
57. **Raven, J. A.** 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *The Royal Society* **11**: 1-51
58. **Romano, I., M. R. Bellitti, B. Nicolaus, L. Lama, M. C. Manca, E. Pagnotta, and A. Gambacorta.** 2000. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry* **54**:289-294.
59. **Rose, A. H.** 1989. Influence of the environment on microbial lipid composition, vol. 2. Academic Press, London.
60. **Schleifer, K. H.** 2009. Classification of bacteria and archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* **32**:533-542.
61. **Schlesner, H.** 1994. The Development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. *Systematic and Applied Microbiology* **17**:135-145.

Publikationen

62. **Schlesner, H.** 1986. *Pirella marina* sp. nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water. *Systematic and Applied Microbiology* **8**:177-180.
63. **Schlesner, H., C. Rensmann, B. J. Tindall, D. Gade, R. Rabus, S. Pfeiffer, and P. Hirsch.** 2004. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1567-1580.
64. **Schlesner, H., and E. Stackebrandt.** 1986. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **8**:174-176.
65. **Sittig, M., and H. Schlesner.** 1993. Chemotaxonomic Investigation of various prosthecate and/or budding bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **16**:92-103.
66. **Skerratt, J. H., P. D. Nichols, C. A. Mancuso, S. R. James, S. J. Dobson, T. A. Mcmeekin, and H. Burton.** 1991. The phospholipid ester-linked fatty acid composition of members of the family *Halomonadaceae* and genus *Flavobacterium* - a chemotaxonomic guide. *Systematic and Applied Microbiology* **14**:8-13.
67. **Smibert, R. M., and N. R. Krieg.** 1994. Phenotypic characterization. American Society for Microbiology, Washington DC.
68. **Sohlenkamp, C., I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger.** 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in Lipid Research* **42**:115-162.
69. **Stackebrandt, E., and J. Ebers.** 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* **33**: 152-155
70. **Staley, J. T.** 1968. *Prostecomicribium* and *Ancalomicrobium*-new prosthecate freshwater bacteria. *Journal of Bacteriology* **95**:1921-1942.
71. **Staley, J. T., J. A. Fuerst, S. Giovannoni, and H. Schlesner.** 1992. The order *Planctomycetales* and the genera *Plantomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera*. *The Prokaryotes* **4**:3710-3731.
72. **Sturt, H. F., R. E. Summons, K. Smith, M. Elvert, and K. U. Hinrichs.** 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass

- spectrometry - new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**:617-628.
73. **Suzuki, K., M. Goodfellow, and A. G. O'Donnell.** 1993. Cell envelopes classification. Academic Press, London.
 74. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. DeVos, K. Kersters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**:407-438.
 75. **Vauterin, L., P. Yang, and J. Swings.** 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:298-304.
 76. **Wada, H., and N. Murata.** 1990. Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* Pcc6803. *Plant Physiology* **92**:1062-1069.
 77. **Wagner, M., and M. Horn.** 2006. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology* **17**:241-249.
 78. **Ward, N., J. T. Staley, J. A. Fuerst, S. Giovannoni, H. Schlesner, and E. Stackebrandt.** 2006. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. *Prokaryotes* **7**:757-793.
 79. **Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper.** 1987. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:463-464.
 80. **Wecker, P., C. Klockow, A. Ellrott, C. Quast, P. Langhammer, J. Harder, and F. O. Glockner.** 2009. Transcriptional response of the model planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T to changing environmental conditions. *BMC Genomics* **10**:410.
 81. **Winkelmann, N., and J. Harder.** 2009. An improved isolation method for attached-living *Planctomycetes* of the genus *Rhodopirellula*. *Journal of Microbiological Methods* **77**:276-284.
 82. **Winkelmann, N., U. Jaekel, C. Meyer, W. Serrano, R. Rachel, R. Rossello-Mora, and J. Harder.** 2010. Determination of the diversity of *Rhodopirellula*

Publikationen

isolates from european seas by multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:776-785.

83. **Woebken, D., H. Teeling, P. Wecker, A. Dumitriu, I. Kostadinov, E. F. DeLong, R. Amann, and F. O. Glöckner.** 2007. From the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes. *ISME Journal* **1**:419-435.
84. **Wright, S. W., S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, C. A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, and N. Welschmeyer.** 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology-Progress Series* **77**:183-196.

3

The core genome of *Rhodopirellula baltica*

Carsten S. Frank (1), Christine Klockow (2), Michael Richter (2), Frank Oliver Glöckner (2) und Jens Harder (1)

(1) Dept. of Microbiology and (2) Microbial Genomics Group, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Manuscript in preparation

Das Manuskript wurde in Zusammenarbeit mit Jens Harder und mit Unterstützung von Michael Richter erstellt, Christine Klockow und Frank Oliver Glöckner wurde es noch nicht vorgelegt.

Address correspondence to: Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359 Bremen, Germany, phone: +49 421 2028-750, fax: +49 421 2028-580, e-mail: jharder@mpi-bremen.de

Keywords: *Rhodopirellula baltica*, microarray, whole genome analysis, comparative genomics

Abstract

In the last years *Rhodopirellula baltica* was the object of many scientific investigations, including the assembly of a whole genome microarray targeting all 7325 genes annotated within the *R. baltica* type strain SH1 genome and the isolation and description of novel *Rhodopirellula* species. Ten strains were chosen to determine the core genome of *R. baltica* by microarray analysis. In addition, genome sequencing was done with eight strains. The resulting draft genomes were used to test the suitability of the microarrays and to determine the core genome using the predicted protein coding sequences. The core genome of the species *R. baltica* included according to the microarrays 3314 genes and according to the genome analysis 4232 genes. Moreover, the genome analysis suggested a reclassification of *Rhodopirellula* strain SH398 into a different species within the genus. For closely related strains within a species the microarrays were suitable. In contrast, the results for the strains belonging to the genus *Rhodopirellula* but to a different species underestimated the core genome. KEGG analysis gave a first hint for the functional distribution of the genome providing basis for further investigations.

Introduction

The definition of species borders is an important issue in microbial research. Early scientific works distinguished species according to phenotypic attributes (40). The morphologic, chemotypic and phenotypic characterization is a cornerstone of the bacterial species description (54). Today DNA based methods are mainly applied to identify the taxonomic affiliation of new isolates. Since the 1960s DNA-DNA-hybridization (DDH) has been performed for genome comparison (40). DDH experiments are interpreted with a species border at 70% DNA sequence similarity between two studied strains (56). Major deficits of this method are its poor reproducibility (46), the complex and time consuming nature of the technique (19) and the impossibility of building cumulative databases on DDH results (39). The alternative method of 16S rRNA analysis with species and genus borders at 98.7 and 96.4% sequence similarity, respectively (45), proved to have an insufficient resolution on the species level (39, 47). At values above 98.7% sequence similarity DDH is recommended to test the genomic uniqueness of novel isolates.

In 2004 a pairwise whole genome comparison of several fully sequenced related strains showed more than 94% average nucleotide identity (ANI) for strains of one species (25). Using BLAST conserved shared and strain specific orthologous protein coding genes (CDS) were identified whereat conserved genes represent the core genomes. The core genomes of nine *E.coli*, seven *Salmonella enteric* and five *S. aureus* strains were defined followed by a functional distribution using the Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) database (51) and whole genome comparison.

This work suggested the average nucleotide identity (ANI) between a given pair of genomes as an alternative to DDH for species definition (25). The resulting ANI reflects the degree of evolutionary distance between the compared genomes and an ANI value of 94% identity coincided with the DDH boundary of 70% sequence similarity. These findings were confirmed by several following projects and a software package (39) was developed for the calculations.

In recent years DNA microarrays were used for many different approaches such as transcription analysis (49), single-nucleotide polymorphism (52) and mutation detection (44), resequencing (14), comparative genomics (24) and identification of bacterial species (8, 10). Comparative genome analysis using microarrays was successfully used of related strains in a variety of genera. These studies mainly dealt

Publikationen

with the identification of environmental communities (53) and the study of the phylogeny of bacterial genomes in combination with genome sequencing (28).

In most studies gene identification relied upon specific hybridization of PCR amplified oligonucleotide probes with PCR amplified genes as target (6, 63). Genomic DNA usage appeared to be a good alternative to PCR amplified DNA due to less pre-selection and a lower risk of PCR biases (2). Usage of gDNA was already common for environmental (2) and comparative genomic hybridization (CGH) for genetic variations (32).

Challenges when using gDNA appeared to be specificity, sensitivity and reproducibility (2, 29). Despite of these limitations whole genome microarrays were used in a row of approaches to compare strains within a species or a genus. This includes approaches with *Helicobacter pylori* (16), *Oenococcus oeni* (9), *Campylobacter jejuni* (36), *Dehalococcoides* strains (28), *Mycoplasma hyopneumoniae* (32) as well as *Xylella fastidiosa* (12). In most cases these data were compared and supported by whole genome sequencing as an instrument for validation or microarrays were directly designed from whole genome sequences for comparative genomics (28, 60). These studies used whole genome arrays as a tool to determine the core genome of a species.

In the last years the planctomycete *Rhodopirellula baltica* has been the focus of many investigations. From the year 2000 on the genome of *R. baltica* SH1^T was selected for whole genome sequencing, annotation and functional analysis. The genome was published by Glöckner *et al.* in 2003 as the first complete planctomycete genome (20). With 7,145 Mb and 7,325 open reading frames (ORF) plus 72 RNA genes, the genome of *R. baltica* represented one of the largest bacterial genomes sequenced at that time. Since then further planctomycete genomes were published including draft genomes of *Blastopirellula marina* DSM 3645^T (42) and *Planctomyces maris* DSM 8797^T that are almost completely annotated. The availability of the genome information triggered several proteome studies (18, 22) as well as studies on enzyme activity (55), protein crystallization (13) and the investigation of the dimorphic life cycle (17, 18). Furthermore gene expression studies were carried out by Wecker (57). A conventional whole genome microarray targeting all 7325 genes annotated within the *R. baltica* genome was established.

Winkelmann (58) isolated new *Rhodopirellula* strains from a variety of sample sides with a focus on European Seas. These isolates were arranged into different operational taxonomic units (OTU; 59) and ten new *Rhodopirellula* species in

addition to *R. baltica* SH1^T were described in a polyphasic approach (Frank et al., 2011, manuscript in preparation).

Based on this knowledge the objective of this work is the identification of the core genome – the genes all strains share with each other – of *Rhodopirellula baltica* by analysis of six strains belonging to the species of *R. baltica* and four additional well-studied strains belonging to the genus *Rhodopirellula* but to different species (Table 1). Since literature results reported that comparative genome analysis using microarrays was successfully used for related strains this might also be useful within the genus *Rhodopirellula*. Thus, for this study the microarray designed by Wecker that bases on the *R. baltica* SH1^T was used. To verify this assumption, the genomes of eight strains were sequenced using 454 sequencing in a second approach and used as comparison to the microarray results.

Table 1: Strains used in this study. + indicates an identity of ≥ 99 percent.

Strain	OTU	16S rRNA gene identity (%)	Isolation site	Country
SH1 ^T	A	+	Bay of Kiel	Germany
SH28	A	+	Bay of Kiel	Germany
SWK14	A	+	Tjärnö	Sweden
WH47	A	+	Sylt	Germany
6C ^T	B	+	Porto Cesareo	Italy
SH398	B*	+	Bay of Kiel	Germany
SM41 ^T	C	97	San Cataldo	Italy
SM1 ^T	D	95	Pt. Andratx	Spain
SWK7 ^T	F	98	Tjärnö	Sweden
SH26	A	+	Bay of Kiel	Germany
WH46	A	+	Sylt	Germany
<i>B. marina</i> _DSM3645 ^T		88	Bay of Kiel	Germany

* SH398 was assigned to *R. baltica* (OTU A) by Schlesner (2004), but the genome analysis in this study revealed an affiliation to OTU B.

Materials and methods

Cultivation

Strains were grown on Pla-NAcGI medium (58). Batch cultivation was performed in modified M13a medium (42). 1000 ml medium included 250 ml artificial sea water (31) and 20 ml Hutner's basal salts (11), 1 g/l glucose was used. The pH value was adjusted to 7.5 with 1 M Tris/HCl. After autoclavation, 10 ml vitamin solution no. 6 (48), 4 ml cycloheximide (50 g/l) and 4 ml ampicillin (50 g/l) were added. Liquid batch cultures were inoculated with several pure colonies into a 1 l Duran bottle containing 750 ml medium and incubated at 24°C in the dark on a rotary shaker (75 rpm).

Sample collection, cell lyses, degradation of DNA and DNA staining

Strains SH1^T, SH26, SH28, SH398 were isolated and described by Schlesner (42), the strains WH46, WH47, SWK14, 6C^T, SM41^T, SM1^T and SWK7^T were isolated by Winkelmann (58) and described by Winkelmann (59) and Frank (2011, manuscript in preparation). Cultures were harvested under a sterile hood and stored at -20°C.

Total DNA was isolated using the protocol of the FastDNA Spin Kit for Soil by MP Biomedicals, Germany. The purity and quality of the extracted total DNA was checked with 1% agarose gel and the DNA was stored at -20°C. Concentrations of DNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). To obtain DNA fragments smaller 1000 bp the DNA was fragmented using NEBNext dsDNA Fragmentase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany). For DNA degradation 15 µl DNA were incubated in a 100 µl volume at 37°C for 70 minutes. DNA size and quality were checked in a 1.5% agarose gel. If necessary the DNA was further degraded. Afterwards, the enzyme was heat inactivated at 65°C for 15 minutes. DNA concentrations were checked as described before. The QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to clean up the reaction mix (10 µl DNA). The samples were stored at -20°C.

DNA was directly labeled using the Platinum*Bright* Nucleic Acid Labeling Kit based on KREATECH's patented Universal Linkage System (ULS; Biocat, Heidelberg, Germany) according to the manufacture's protocol. Concentrations of DNA were measured, and incorporation of the dyes Alexa 546 and Alexa 647 were checked, using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Whole Genome Array construction, hybridization, signal detection and data analysis

Whole Genome Array construction, hybridization and image analysis were performed as described by Wecker (57) with the following changes. For hybridization 3.5 µg of Alexa 546 dye-labeled reference DNA (strain SH1^T) and 3.5 µg of Alexa 647 dye-labeled sample DNA were combined and taken up in a final volume of 100 µl DIG Easy Hyb hybridization solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After the blocking step the sample solution was applied to the arrays, denaturated at 95°C for 10 min and hybridized under stringent conditions at 52°C for over 12 hours.

Venn Diagrams

Venn Diagrams were performed according to Hulsen (23) (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/>).

DNA-DNA-Hybridization

DNA-DNA-Hybridization was performed at DSMZ. Cells were disrupted using French pressure cell (Thermo Spectronic) and the DNA in the crude lysate was purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al. (1977). DNA-DNA hybridization was carried out as described by De Ley et al. (1970) under consideration of the modifications described by Huss et al. (1983) using a model Cary 100 bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6x6 multicell changer and a temperature controller with in-situ temperature probe (Varian).

Pyrosequencing

Pyrosequencing of eight Planctomycetes strains was performed on a Genome Sequencer GS FLX System (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) at LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany).

Gene prediction, auto-annotation and data mining

Gene prediction was carried out by using a combination of the Metagene (35) and Glimmer3 (15) softwares. Ribosomal RNA genes were detected by using the RNAmmer 1.2 software (27) and transfer RNAs by tRNAscan-SE (30). Annotation was performed by using the GenDB, version 2.2 system (33), supplemented by the tool JCoast, version 1.6 (38) seeking for each coding region observations from

Publikationen

similarity searches against sequence databases (NCBI-nr, Swiss-Prot, KEGG-Genes, genomesDB (38)) and protein family databases (Pfam (3), InterProScan (34)), and from predictive signal peptide (SignalP (5)) and transmembrane helix-analysis (TMHMM (26)). Predicted protein coding sequences were automatically annotated by the in-house software MicHanThi (37). The MicHanThi software predicts gene functions based on similarity searches using the NCBI-nr (including Swiss-Prot) and InterPro database. The annotation of proteins highlighted within the scope of this study was subject of manual inspection. For all observations regarding putative protein functions, an e-value cutoff of 10^{-5} was applied.

Comparison of the shared gene content by reciprocal best match (RBM).

All eight sequenced strains were compared with the *Rhodopirellula baltica* type strain SH1 in order to *in silico* determine the shared gene content. For this purpose a BLAST all vs. all search was performed. RBMs were counted by a BLAST result with an expectation values E of $< 1e^{-5}$ each and a subject coverage of over 65%.

***In silico* DNA-DNA hybridization**

The average nucleotide identity (ANI) was determined by using the *in silico* DNA-DNA hybridization methods of the JSpecies (39) software using standard parameters.

Cluster analysis

Similarity matrices and dendrogramms were built with the program Primer 6 (Version 6.1.11, Primer-E Ltd., Luton, UK).

Comparative Microarray Analysis

The specificity of the *Rhodopirellula baltica* microarray probes were *in silico* matched against the eight newly sequenced genomes. This matching was performed by using the exonerate software with standard parameters (www.ebi.ac.uk). Exonerate is a generic tool for pairwise sequence alignments. The algorithms used by exonerate are described by Slater and Birney (43).

MlxS (Minimum Information about any (x) Sequence (MixS)) submission

Consistent contextual data acquisition for MlxS standard compliant submission has been done for all eight sequenced genomes by using the web-based software CDinFusion (<http://www.megx.net/cdinfusion>, 21).

Data deposition

The draft genome data were deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession AFAR00000000. The version described in this paper is the first version, AFAR01000000 (= strain WH47).

Results

The presented work consists of two parts, the characterization of genomes on the *R. baltica* microarray and the genome analysis. The investigated strains isolated from Germany, Sweden, Italy and Spain are shown in table 1. The strains SH26, SH28 and SH398 were classified by Schlesner (42) using DDH. The strains SWK14, WH46, WH47, 6C^T, SM41^T, SM1^T and SWK7^T were classified by Winkelmann (59) using DDH and MLSA into the five OTUs A, B, C, D and F. Six strains of OTU A had been assigned together with the *R. baltica* SH1^T to the species *R. baltica*. The other strains belong within the genus *Rhodopirellula* to different species. *B. marina* is the next validly described relative of the genus *Rhodopirellula*. The strains SH28, SH398, SWK14, WH47, 6C^T, SM41^T, SM1^T and SWK7^T were used for genome and the microarray analysis, the strains SH26 and WH46 were additionally analyzed by microarray analysis.

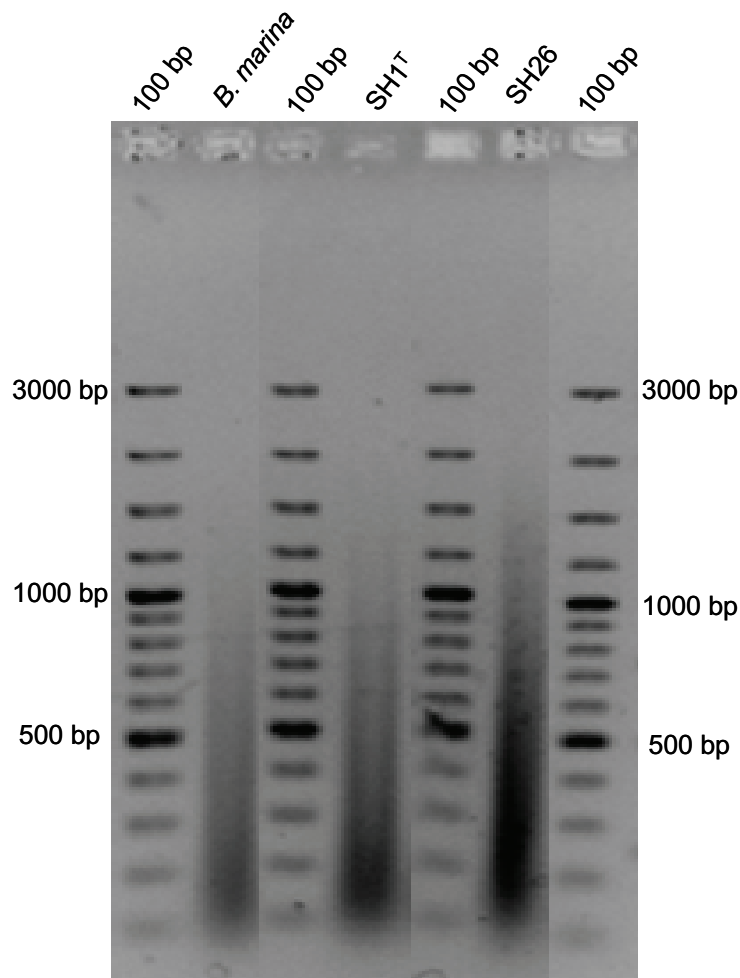


Figure 1: Agarose gel of fragmented DNA from *R. baltica* strains SH1^T and SH26 and *B. marina* strain 3645^T.

Microarray studies

The analysis of the genetic diversity within the genus *Rhodopirellula* and the identification of the core genome was performed using a microarray designed, constructed and validated by Wecker (57) with unique probes from all identified SH1^T genes. As this array was optimized for mRNA analysis of *Rhodopirellula baltica* SH1^T it first had to be optimized for genomic analysis. The genomic DNA was cut randomly into pieces smaller than 1000 bp since 939 bp was described as average gene length by Glöckner (20, figure 1). The specificity was tested using strain SH1^T and *B. marina* 3645^T. Different amounts of DNA (2 µg and 3.5 µg DNA) and different temperatures (42°C and 52°C) were tested according to Wecker (57) and Tiquia (53). Larger amounts of DNA and a higher temperature proved to work best. DNA of SH1^T bound in > 7000 probes whereas the DNA of *B. marina* hybridized to 386 probes. However, comparative analysis of the probe sequences with the *B. marina* genome interpreted the signal as unspecific. The detection of nearly all genes in the positive control experiment indicated that under the current experiment conditions the hybridization of the DNA fragments to each other did not hinder the hybridization to the microarray probes. To identify the core genome, all ten strains (Table 1) were hybridized to the array pairwise together with the *R. baltica* SH1^T as inside reference. Genes that showed a positive signal for strain SH1^T as well as the strain investigated were considered as positive. The shared genes between two or more strains as well as the unique genes one strain does not share with any other strain were calculated using BioVenn (23; figure 2).

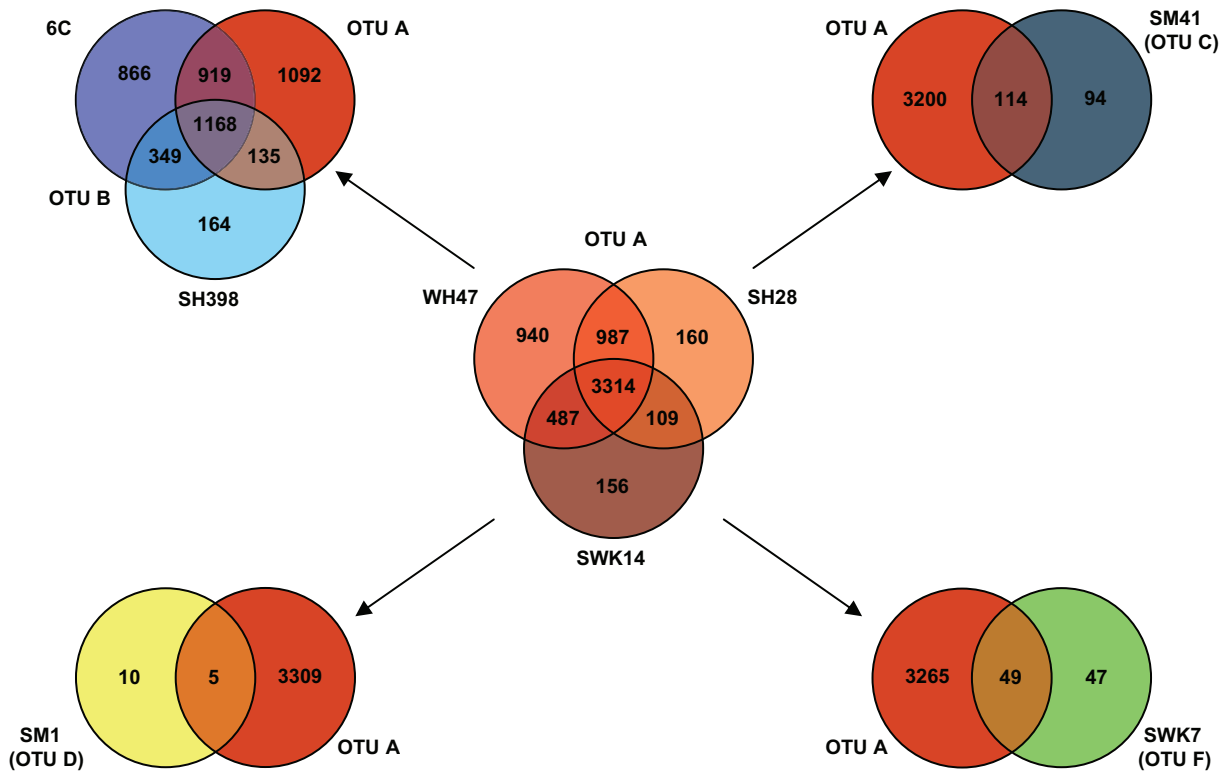


Figure 2: Distribution of common and unique genes according to microarray analysis of eight investigated strains that were also analyzed by genome analysis. The overlap of the circles represent the core genomes of OTU A, A and B, A and C, A and D and A and F. Red – OTU A, blue – OTU B, dark green – OTU C, yellow – OTU D, light green – OTU F. Strain SH398 is already reclassified into OTU B.

The core genome of OTU A – the species *R. baltica* – including the strains WH47, SH28 and SWK14 comprises 3314 genes. 940, 160 and 156 genes were unique for the strains WH47, SH28 and SWK14, respectively. The OTUs B, C, D and F that belong to the genus *Rhodopirellula* show 1168, 114, 5 and 49 genes that were also positive in OTU A, respectively. The microarray results presented in figure 2 indicate a dramatic decline of the positive matched sequences which correlates with a decrease of the relationship between the strains. Table 4 reveals discrepancies within all five strains of OTU A with WH47 showing most positive and WH46 showing less positive signals. 6C^T of OTU B revealed more positive signals than strain SH398.

Table 4: Number of genes detected by microarray analysis in two genomes.

	WH47	SH26	SH28	SWK14	WH46	6C ^T	SH398	SM41 ^T	SWK7 ^T	SM1 ^T
WH47	5728									
SH26	5133	5685								
SH28	4301	4480	4570							
SWK14	3801	3703	3423	4066						
WH46	3426	3343	3054	2981	3645					
6C ^T	3053	3083	2615	2371	2903	3302				
SH398	1656	1607	1522	1455	1286	1517	1816			
SM41 ^T	157	152	147	141	128	94	100	208		
SWK7 ^T	65	69	66	65	60	55	50	31	96	
SM1 ^T	8	7	6	6	3	7	4	5	7	15

Genomic analysis

The genomes were sequenced by 454 pyrosequencing. The resulting draft genomes were assembled of 144 to 1141 contigs, contained 6071 to 7847 ORFs and were between 7.0 to 8.9 Mb long. Therefore, the genomes were at least as large as the SH1^T genome that already was described to be one of the largest bacterial genomes (Table 2). Concerning sequence length and number of ORFs the strains of OTU A and B that are closely related to SH1^T show strong similarities to each other. The strains SM41^T, SM1^T and SWK7^T have significantly larger genomes and a higher number of ORFs compared to the other draft genomes. The average nucleotide identity between all sequenced strains was calculated using ANI (1, 25; figure 3). These results revealed a membership of WH47 (97.35%), SH28 (97.05%) and SWK14 (97.25%) to OTU A with an ANI higher 94% to SH1^T and to each other. This confirmed the results of prior studies (59). In addition, strain SH398 and 6C^T were closely related to each other (95.84%ANI) whereas the ANI of SH398 to SH1^T was less than 90%. In contrast to prior studies carried out with DDH, the genome analysis revealed that strain SH398 belongs not to OTU A but to OTU B. These results were confirmed by DNA-DNA hybridization, that showed that the similarity of SH398 to SH1^T was 49.3 to 58.9% and its similarity to 6C^T was 75 to 75.1%. Therefore, strain SH398 was reclassified into OTU B in this context. SM41^T, SM1^T and SWK7^T do not show any close degree of relation to any other investigated strain according to ANI.

Table 2: Genomic properties of eight sequenced strains, and its next relatives.

Project	Contigs	ORFs	Length	% GC	% Coding
SH1 ^T	1	7325	≥7.2	55.4	97
SH28	182	6140	≥7.2	55.5	89
SH398	213	6361	≥7.5	55.8	88
SWK14	190	6633	≥7.5	55.4	88
WH47	332	6071	≥7.0	55.5	88
6C ^T	273	6210	≥7.2	55.7	89
SM41 ^T	495	6893	≥8.2	56.7	86
SM1 ^T	1141	7847	≥8.9	54.7	84
SWK7 ^T	144	7242	≥8.8	56.0	88
<i>B. marina</i> _DSM3645 ^T	64	6025	≥6.7	57.0	87
<i>P. staleyj</i> _DSM6068 ^T	1	4716	≥6.2	57.5	85
<i>P. maris</i> _DSM8797 ^T	125	6480	≥7.8	50.5	87
<i>G. obscuriglobus</i> _UQM22446 ^T	922	7989	≥9.2	67.2	81
<i>E. coli</i> _K_12__MG1655 ^T	1	4266	≥4.6	50.8	87
<i>B. subtilis</i> 168 ^T	1	4242	≥4.2	43.5	89
<i>P. ubique</i> _HTCC1062 ^T	1	1354	≥1.3	29.7	96

Calculation of the core genome was performed using the protein coding genes (CDS, Table 3) on each draft genome shared with *R. baltica* SH1^T. According to this method, the strains SWK14, SH28, WH47, SH398, 6C^T, SWK7^T, SM41^T and SM1^T shared 4648, 4605, 4549, 4342, 4168, 3360, 3137 and 2977 CDSs with SH1^T, respectively. *B. marina* as next *Rhodopirellula* relative shared only 2095 CDSs with SH1^T. According to RBM analysis the core genome of OTU A, OTU A and B, OTU A and C, OTU A and D and OTU A and F contains 4232, 3785, 2959, 2816 and 3154 CDSs, respectively. All five OTUs had 2214 CDS in common.

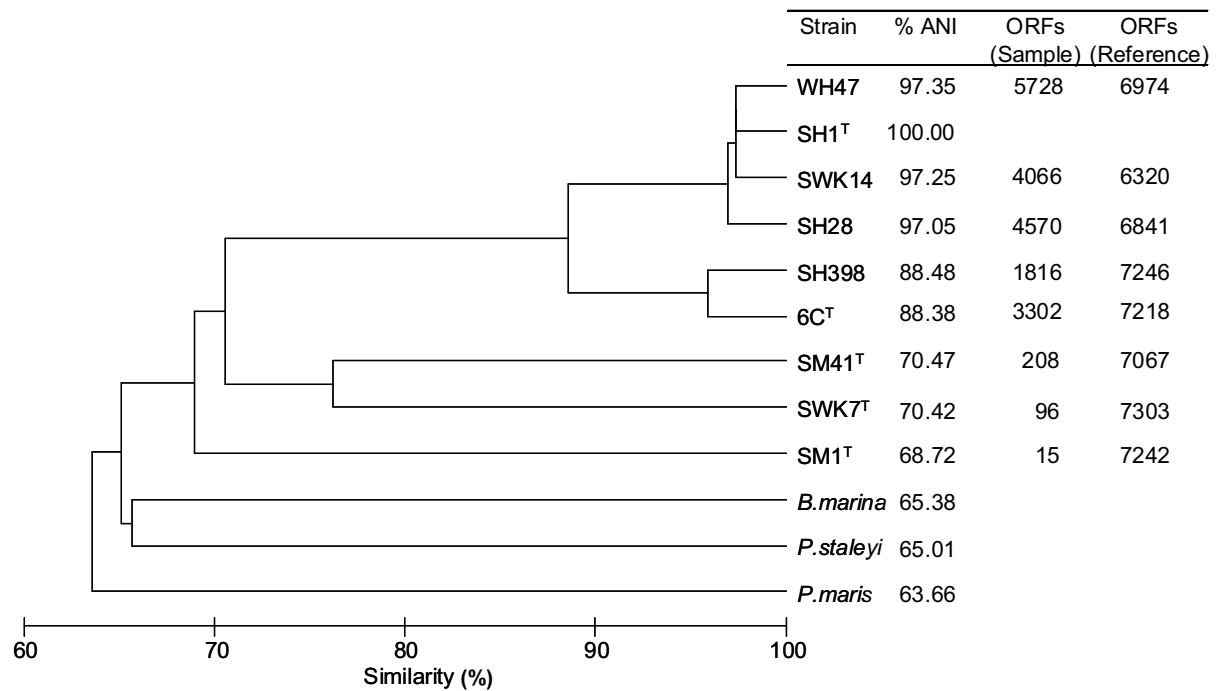


Figure 3: UPGMA dendrogram displaying the similarity according to ANI calculation. The %ANI reflects the relation of each strain to SH1^T. ORF samples reveal the number of positive signals on the microarray chips for each sample strain. ORF reference (SH1^T) reveals the number of positive signals on the corresponding chips for SH1^T.

The microarray results showed strong parallels with the genome analysis. In figure 3 the positive signals of the reference (SH1^T) are pictured. This indicates the problematics of the microarray method. Of 7325 ORFs on the chip only 6320 SH1^T genes of the SWK14 experiment matched positive compared to for example 6974 of WH47. Due to the fact that 600 less SH1^T genes were considered as positive also the number of possible positive SWK14 genes decreased (600 less genes were available as positive SWK14 genes). Therefore, the deviation might be more than 10% for the OTU A. A look to the references of the experiments of the strains in OTU B, C, D and F reveals that strain SH1^T DNA resulted in more positive signals on the array in these experiments. This may be caused by hybridization of DNA of a closely related strain to the DNA of *R. baltica* SH1^T.

The G+C content measured during genome sequencing differed only very little from prior measured values (Table 2). Only the values of the strains SWK14 (58 mol%), SM41^T (55 mol%), SM1^T (57 mol%) and SWK7^T (53 mol%) differed by more than 0.5 mol% from the values measured by Frank (2011, manuscript in preparation.).

Publikationen

Table 3: The core genome as calculated by reciprocal best matches (RBM). The similarity of the positive genes is presented with respect to *R. baltica* SH1^T, arranged according to its sequence similarities.

Identity (%)	SWK14	SH28	WH47	SH398	6C ^T	SWK7 ^T	SM41 ^T	SM1 ^T	<i>B. marina</i>	<i>P. stalyi</i>	<i>P. maris</i>
90	4526	4458	4449	3323	3204	125	111	39	2	2	0
80	66	87	57	780	757	513	486	270	20	22	12
70	20	28	17	145	128	753	686	570	159	147	80
60	9	7	7	31	33	743	685	678	335	292	252
50	7	5	6	22	21	574	567	616	469	421	432
40	8	8	7	13	9	397	345	454	515	501	523
30	3	8	4	13	12	206	210	281	433	426	458
20	9	4	2	15	4	49	47	69	162	158	207
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
CDSs	4648	4605	4549	4342	4168	3360	3137	2977	2095	1970	1966

Discussion

The genome analysis was first and foremost done to identify the core genome. We identified between 15 and 5728 positive probe signals in the microarray experiments. More genes were detected in strains more closely related to SH1^T. Prior microarray experiments with environmental samples and performed with genomic DNA (gDNA) and PCR-amplified target DNA indicated that no cross hybridizations occur at temperatures higher than 50°C and showed very low signal to noise ratios (53). Moreover, it is reported that a signal intensification can be achieved by using DNA concentrations of more than 8 ng (53) and 5 ng (62) for pure cultures, respectively, suggesting a correlation between gDNA concentrations and signal intensity in pure cultures. In most studies PCR amplified gDNA, oligonucleotides and random hexamers as target DNA of environmental samples were investigated (2, 50). No data were found that affect the hybridization specificity with complex targets like gDNA (2).

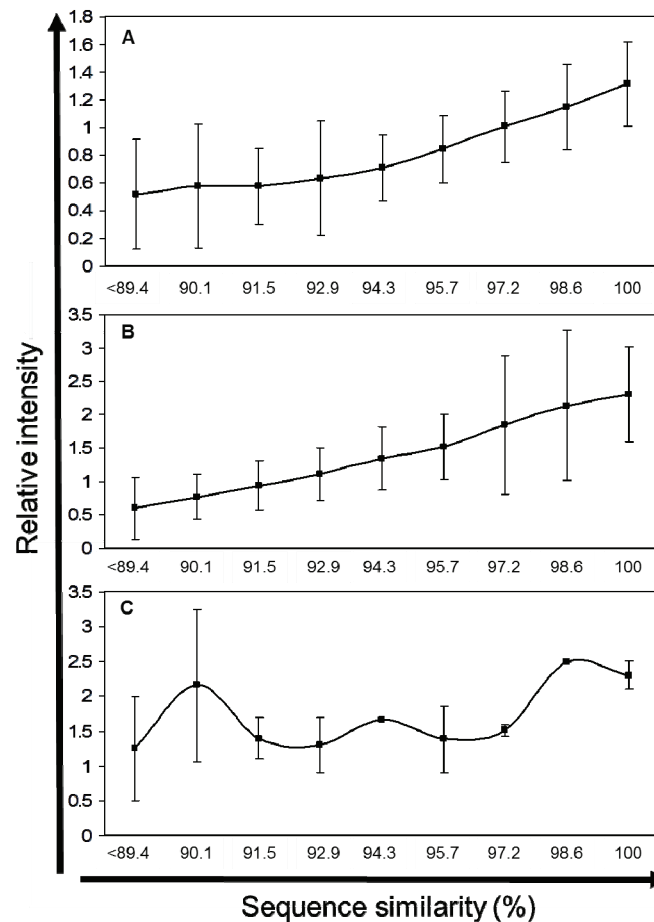


Figure 4: Relative signal intensity (sample strains against SH1^T) according to microarray analysis plotted against the sequence similarity (%) of the used SH1^T probes spotted on the chips to the corresponding genes on the draft genomes of WH47 (A), 6C^T (B) and SWK7^T (C).

The applicability of the microarrays was a critical question to be answered. The comparison with the draft genomes revealed a correlation of a positive probe signal with a sequence similarity of above 90%. Within the positive signals, the relative signal intensity was investigated. For all strains the relative intensity of the samples (tested strains divided by the reference (=SH1^T)) was calculated, displayed in a graph and plotted against the calculated sequence similarities of the probe to the corresponding genes in the %ANI. Thus, the relative signal intensity increased slightly for very conserved genomes (Figure 4). Within OTU A the intensities grew linear with the similarities starting with a similarity of 94%ANI. Therefore, in areas higher than 94%ANI the relative intensities on the array correlate with the genomic similarities. Tiquia (53) described that the signal intensity increases substantially for probes showing more than 86%ANI similarity to the target DNA and particularly over 90%ANI similarity. The standard deviation in the linear part of the curve is +/- 0.2.

Publikationen

Under 94%ANI it rises up to +/- 0.5. The curves of OTU B show a close to linear smooth increase from 90-97%ANI for 6C^T and 90-100%ANI for SH398; from 98%ANI on, a saturation occurs. Still, also here the intensity increases with a rising similarity. Problematic is the higher standard deviation of at least between +/- 0.3 up to over +/- 1, especially in the range of higher sequence similarity. The strains SM41^T, SM1^T and SWK7^T do not show a clear increase of relative intensities with increasing sequence similarities. This indicates a good usability within the species *R. baltica*, a limited usability for closely related strains (> 88%ANI) and a poor usability for strains less related. Wu achieved a good classification at 55°C and 50% formamid on species level (62), but under these conditions a strain-level differentiation was not possible.

The sequence similarities were calculated by comparison of SH1^T probe sequences with the genes of the sample genomes. They can be used to prove the reasonability of the microarray data but not to calculate the core genomes due to the risk of false matching on the sample genomes. For this reason, the protein coding genes (CDS) were calculated from the draft genomes. Detailed results revealed parallels to the microarray data. The number of common CDSs increased for OTU A and B with an increasing % identity to SH1^T CDSs, whereas SH1^T together with SM41^T, SM1^T and SWK7^T showed no clear patterns (Table 3). Therefore, the similarities are lower. Between 96.8 (=SWK14) and 97.8% (=WH47; SH28=97.4%) of the CDSs of OTU A showed identities > 90%. For OTU B these values varied between 76.5 and 76.8%. Regarding the number of genes, these results show strong parallels with the microarray results. Overall for OTU A the number of positive signals of genome sequencing, microarray and RBM increases with increasing of gene similarities (data not shown). For all other strains this is not the case. The vast amount of positive signals showed similarities < 90%. Together with the prior presented results, this leads to the conclusion that the microarray works well for closely related strains belonging to the same species (OTU A) only. The observation that microarrays work well to discriminate different species but not to discriminate strains belonging to one species was also monitored in other studies (7).

The overall percentage of genes belonging to the core genome was 45% for OTU A after microarray and 58% after RBM analysis compared to the total number of 7325 genes found in *R. baltica* SH1^T. Therefore, the divergence was 13%. Genomic analysis showed within the species *E.coli* a value of 55-60% (25) and within the species *Helicobacter pylori* a value of 66% (16).

Table 5: KEGG distribution calculated according to microarray analysis. The last column reveals the KEGG distribution for SH1^T according to genomic analysis

KEGG Kategorie	Core genome						Unique genes						R. batlica SH1 ^T		
	A (3314)	AB (1168)	AC (114)	AD (5)	AF (49)		WH47 ^T (2414)	SWK14 ^T (752)	SH28 ^T (1256)	6C ^T SH398 ^T (2134)	SM41 ^T (94)	SM1 ^T (10)		SWK7 ^T (47)	
Metabolism	1219	510	48	0	24		690	214	377	793	159	20	3	10	2124
Carbohydrate Metabolism	270	118	12	0	1		145	50	90	155	39	0	0	4	478
Energy Metabolism	112	48	7	0	4		46	12	25	53	13	0	0	0	171
Lipid Metabolism	124	51	1	0	1		92	30	46	85	19	4	3	0	235
Nucleotide Metabolism	61	27	2	0	3		40	9	19	48	10	0	0	2	108
Amino Acid Metabolism	180	88	12	0	6		98	28	50	112	19	5	0	0	302
Metabolism of Other Amino Acids	41	17	1	0	1		22	3	8	26	4	1	0	0	67
Glycan Biosynthesis and Metabolism	71	19	1	0	2		31	8	14	60	6	2	0	1	110
Metabolism of Cofactors and Vitamins	91	34	2	0	2		58	22	28	71	13	0	0	0	155
Metabolism of Terpenoids and Polyketides	46	18	2	0	0		17	6	12	27	4	3	0	2	75
Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	41	22	0	0	0		15	4	6	24	4	1	0	1	68
Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	147	48	8	0	1		104	36	64	102	20	4	0	0	284
Enzyme Families	35	20	0	0	3		22	6	15	30	8	0	0	0	71
Genetic Information Processing	281	141	6	2	7		156	26	78	212	44	3	0	6	505
Transcription	50	18	3	0	1		31	8	15	34	9	2	0	2	96
Translation	76	58	3	2	0		45	3	32	64	16	0	0	0	140
Folding, Sorting and Degradation	14	14	0	0	1		18	3	5	29	6	0	0	0	62
Replication and Repair	115	51	0	0	5		62	12	26	85	13	1	0	4	207
Environmental Information Processing	229	85	7	0	4		133	26	54	153	41	8	0	2	399
Membrane Transport	152	55	5	0	3		85	18	28	106	28	6	0	2	255
Signal Transduction	68	29	2	0	1		36	8	19	41	10	2	0	0	123
Signaling Molecules and Interaction	9	1	0	0	0		12	0	7	6	3	0	0	0	21
Cellular Processes	123	58	7	0	4		76	16	33	84	11	2	0	2	223
Transport and Catabolism	38	11	2	0	3		34	6	17	33	2	0	0	1	74
Cell Motility	69	38	4	0	1		36	8	10	47	9	2	0	1	122
Cell Growth and Death	15	8	1	0	0		5	2	5	4	0	0	0	0	25
Cell Communication	1	1	0	0	0		1	0	1	0	0	0	0	0	2
Organismal Systems	12	7	0	0	0		6	2	5	4	3	0	0	0	23
Immune System	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Endocrine System	7	5	0	0	0		5	0	5	2	2	0	0	0	14
Circulatory System	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Digestive System	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Excretory System	0	0	0	0	0		1	2	0	0	1	0	0	0	3
Nervous System	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sensory System	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Development	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Environmental Adaptation	5	2	0	0	0		0	0	0	2	0	0	0	0	6

Publikationen

So far, only the numbers of positive signals on the microarray and in the genome were discussed and the core genome was defined. To get more information about the composition of the core genomes we analyzed the distribution of the orthologies by using KEGG (Table 5). This is of significant importance if we concern prior studies (Frank et al., 2011, unpublished) that revealed phenotypic differences between *R. baltica* strains. The results indicated for the shared genes as well as the unique genes only small differences. In all cases more than 60% of the genes are involved in the metabolism. Only the OTU A to OTU C core genome includes a higher share of metabolic genes on the cost of genes involved in genetic information processing. OTU A to OTU D include only genes involved in genetic information processing, but as strain SM1 shares only five genes with OTU A and only very few positive signals on the microarray, this distribution is not representative. The unique genes show a related result, larger deviations were only observed for SWK14, SM41^T, SM1^T and SWK7^T. A view on the distribution made for the genomic data (Figure 5) did not reveal significant differences between the investigated strains. This leads to the assumption that most differences concerning the microarray data are a consequence of too few positive signals on the chips. A specific pattern revealing clear differences between unique and core genes could not be observed. A prior study (41) with *Helicobacter pylori* strains shows that the core genome mainly includes genes for metabolic and cellular processes whereas unique genes include restriction modification genes, transposases and genes encoding cell surface proteins. Therefore, unique genes are mainly used to aid bacteria under specific circumstances and for producing the phenotypic characteristics (9, 41).

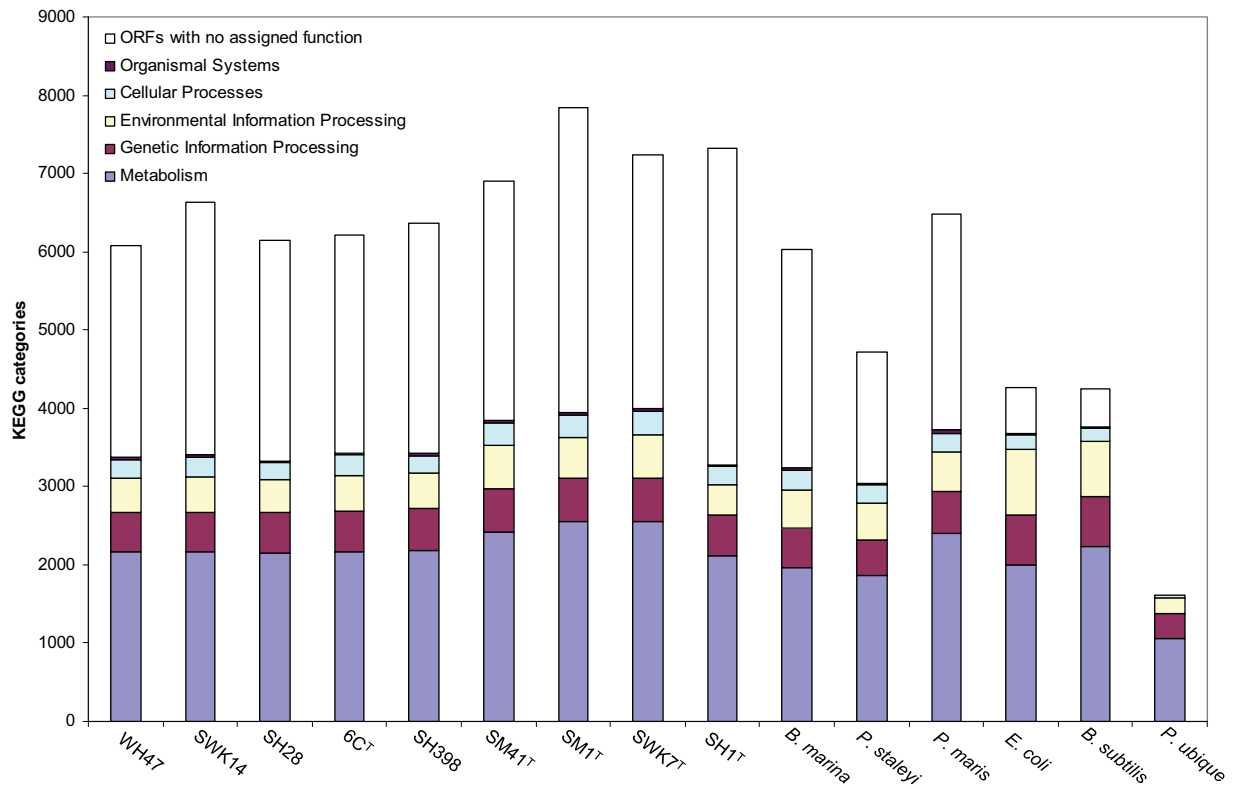


Figure 5: KEGG distribution of genomes. The ORFs with an assigned function account for up to 4000.

Acknowledgments

We thank Andreas Ellrott for technical assistance. This study was funded by the Max Planck Society.

References

1. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.
2. **Avarre, J. C., P. de Lajudie, and G. Bena.** 2007. Hybridization of genomic DNA to microarrays: A challenge for the analysis of environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* **69**:242-248.
3. **Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, and S. R. Eddy.** 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **32**:D138-D141.
4. **Bauld, J., and J. T. Staley.** 1976. *Planctomyces maris* sp. nov.: A marine isolate of *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. *Journal of General Microbiology* **97**:45-55.
5. **Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**:783-795.
6. **Bodrossy, L., and A. Sessitsch.** 2004. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Current Opinion in Microbiology* **7**:245-254.
7. **Boesten, R. J., F. H. J. Schuren, and W. M. de Vos.** 2009. A *Bifidobacterium* mixed-species microarray for high resolution discrimination between intestinal bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **76**:269-277.
8. **Bontemps, C., G. Golfier, C. Gris-Liebe, S. Carrere, L. Talini, and C. Boivin-Masson.** 2005. Microarray-based detection and typing of the rhizobium nodulation gene nodC: Potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:8042-8048.
9. **Borneman, A. R., E. J. Bartowsky, J. McCarthy, and P. J. Chambers.** 2010. Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:681-691.

10. **Cho, J. C., and J. M. Tiedje.** 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3677-3682.
11. **Cohen-Bazire, G., S. W. R., and S. R. Y.** 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of cellular physiology* **49**:25-68.
12. **da Silva, V. S., C. S. Shida, F. B. Rodrigues, D. C. D. Ribeiro, A. A. de Souza, H. D. Coletta-Filho, M. A. Machado, L. R. Nunes, and R. C. de Oliveira.** 2007. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. *BMC Genomics* **8**:474.
13. **Dabin, J., M. Jam, M. Czjzek, and G. Michel.** 2008. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the polysaccharide lyase RB5312 from the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **64**:224-227.
14. **Davignon, L., E. A. Walter, K. M. Mueller, C. P. Barrozo, D. A. Stenger, B. C. Lin, and E. O. S. Con.** 2005. Use of resequencing oligonucleotide microarrays for identification of streptococcus pyogenes and associated antibiotic resistance determinants. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:5690-5695.
15. **Delcher, A. L., K. A. Bratke, E. C. Powers, and S. L. Salzberg.** 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**:673-679.
16. **Dong, Q. J., Q. Wang, Y. N. Xin, N. Li, and S. Y. Xuan.** 2009. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* **15**:3984-3991.
17. **Frank, C. S., P. Langhammer, B. M. Fuchs, and J. Harder.** 2011. Ammonium and attachment of *Rhodopirellula baltica*. *Archives of Microbiology* **193**:365-372.
18. **Gade, D., T. Stuhmann, R. Reinhardt, and R. Rabus.** 2005. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. *Environmental Microbiology* **7**:1074-1084.
19. **Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson, and**

Publikationen

- J. Swings.** 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**:733-739.
- 20. Glockner, F. O., M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, and R. Reinhardt.** 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp strain 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:8298-8303.
- 21. Hankeln, W. N., G. J., W. J., P. L. Buttigieg, I. Konstadinov, R. Kottmann, Y. P., and G. F. O.** 2011. CDinFusion - Submission-ready, on-line Integration of Sequence and Contextual Data. *PLoS ONE*.
- 22. Hieu, C. X., B. Voigt, D. Albrecht, D. Becher, T. Lombardot, F. O. Glockner, R. Amann, M. Hecker, and T. Schweder.** 2008. Detailed proteome analysis of growing cells of the planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T. *Proteomics* **8**:1608-1623.
- 23. Hulsen, T., J. de Vlieg, and W. Alkema.** 2008. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**:488.
- 24. Koide, T., P. A. Zaini, L. M. Moreira, R. Z. N. Vencio, A. Y. Matsukuma, A. M. Durham, D. C. Teixeira, H. El-Dorry, P. B. Monteiro, A. C. R. da Silva, S. Verjovski-Almeida, A. M. da Silva, and S. L. Gomes.** 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *Journal of Bacteriology* **186**:5442-5449.
- 25. Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje.** 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:2567-2572.
- 26. Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**:567-580.
- 27. Lagesen, K., P. Hallin, E. A. Rodland, H. H. Staerfeldt, T. Rognes, and D. W. Ussery.** 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* **35**:3100-3108.
- 28. Lee, P. K. H., D. Cheng, P. Hu, K. A. West, G. J. Dick, E. L. Brodie, G. L. Andersen, S. H. Zinder, J. He, and L. Alvarez-Cohen.** 2011. Comparative

- genomics of two newly isolated Dehalococcoides strains and an enrichment using a genus microarray. The ISME Journal **5**:1014-1024.
29. **Letowski, J., R. Brousseau, and L. Masson.** 2004. Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. Journal of Microbiological Methods **57**:269-278.
 30. **Lowe, T. M., and S. R. Eddy.** 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Research **25**:955-964.
 31. **Lyman, J., and F. R. H.** 1940. Composition of sea water. J. Mar. Res. (Sears Foundation) **3**:134-146.
 32. **Madsen, M. L., M. J. Oneal, S. W. Gardner, E. L. Strait, D. Nettleton, E. L. Thacker, and F. C. Minion.** 2007. Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Journal of Bacteriology **189**:7977-7982.
 33. **Meyer, F., A. Goesmann, A. C. McHardy, D. Bartels, T. Bekel, J. Clausen, J. Kalinowski, B. Linke, O. Rupp, R. Giegerich, and A. Puhler.** 2003. GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. Nucleic Acids Research **31**:2187-2195.
 34. **Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, L. Cerutti, R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, W. Fleischmann, J. Gough, D. Haft, N. Harte, N. Hulo, D. Kahn, A. Kanapin, M. Krestyaninova, D. Lonsdale, R. Lopez, I. Letunic, M. Madera, J. Maslen, J. McDowall, A. Mitchell, A. N. Nikolskaya, S. Orchard, M. Pagni, C. P. Pointing, E. Quevillon, J. Selengut, C. J. A. Sigrist, V. Silventoinen, D. J. Studholme, R. Vaughan, and C. H. Wu.** 2005. InterPro, progress and status in 2005. Nucleic Acids Research **33**:D201-D205.
 35. **Noguchi, H., J. Park, and T. Takagi.** 2006. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. Nucleic Acids Research **34**:5623-5630.
 36. **Poly, F., D. Threadgill, and A. Stintzi.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. Journal of Bacteriology **186**:4781-4795.
 37. **Quast, C.** 2006. MicHanThi - Design and implementation of a system for the prediction of gene functions in genome annotation projects. Diploma work, University of Bremen, Germany.

Publikationen

38. **Richter, M., T. Lombardot, I. Kostadinov, R. Kottmann, M. B. Duhaime, J. Peplies, and F. O. Glockner.** 2008. JCoast - A biologist-centric software tool for data mining and comparison of prokaryotic (meta) genomes. *Bmc Bioinformatics* **9**:177.
39. **Richter, M., and R. Rossello-Mora.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:19126-19131.
40. **Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* **25**:39-67.
41. **Salama, N., K. Guillemin, T. K. McDaniel, G. Sherlock, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:14668-14673.
42. **Schlesner, H., C. Rensmann, B. J. Tindall, D. Gade, R. Rabus, S. Pfeiffer, and P. Hirsch.** 2004. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1567-1580.
43. **Slater, G. S., and E. Birney.** 2005. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *Bmc Bioinformatics* **6**:31.
44. **Sougakoff, W., M. Rodrigue, C. Truffot-Pernot, M. Renard, N. Durin, M. Szpytma, R. Vachon, A. Troesch, and V. Jarlier.** 2004. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection* **10**:289-294.
45. **Stackebrandt, E., and J. Ebers.** 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* **33**:152-155
46. **Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, and W. B. Whitman.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1043-1047.

47. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16s ribosomal RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:846-849.
48. **Staley, J. T.** 1968. *Prostecomicribium* and *Ancalomicrobium*-new prostecate freshwater bacteria. *Journal of Bacteriology* **95**:1921-1942.
49. **Tang, T., N. Francois, A. Glatigny, N. Agier, M. H. Mucchielli, L. Aggerbeck, and H. Delacroix.** 2007. Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics* **23**:2686-2691.
50. **Taroncher-Oldenburg, G., E. M. Griner, C. A. Francis, and B. B. Ward.** 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1159-1171.
51. **Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin, and D. A. Natale.** 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *Bmc Bioinformatics* **4**:41
52. **Tillib, S. V., and A. Mirzabekov.** 2001. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:53-58.
53. **Tiquia, S. M., L. Y. Wu, S. C. Chong, S. Passovets, D. Xu, Y. Xu, and J. Z. Zhou.** 2004. Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* **36**:664-675.
54. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. DeVos, K. Kersters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**:407-438.
55. **Wallner, S. R., M. Batter, C. Wurdemann, P. Wecker, F. O. Glockner, and K. Faber.** 2005. Highly enantioselective sec-alkyl sulfatase activity of the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica* shows retention of configuration. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**:6381-6384.
56. **Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper.** 1987. Report of the ad-hoc-

Publikationen

- committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:463-464.
57. **Wecker, P., C. Klockow, A. Ellrott, C. Quast, P. Langhammer, J. Harder, and F. O. Glockner.** 2009. Transcriptional response of the model planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1^T to changing environmental conditions. *Bmc Genomics* **10**:410.
58. **Winkelmann, N., and J. Harder.** 2009. An improved isolation method for attached-living planctomyces of the genus *Rhodopirellula*. *Journal of Microbiological Methods* **77**:276-284.
59. **Winkelmann, N., U. Jaekel, C. Meyer, W. Serrano, R. Rachel, R. Rossello-Mora, and J. Harder.** 2010. Determination of the diversity of *Rhodopirellula* isolates from European seas by multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:776-785.
60. **Witney, A. A., M. Marsden, T. G. Holden, R. A. Stabler, S. E. Husain, J. K. Vass, P. D. Butcher, J. Hinds, and J. A. Lindsay.** 2005. Design, validation, and application of a seven-strain *Staphylococcus aureus* PCR product microarray for comparative genomics. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:7504-7514.
61. **Wobken, D., H. Teeling, P. Wecker, A. Dumitriu, I. Kostadinov, E. F. DeLong, R. Amann, and F. O. Glockner.** 2007. From the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes. *ISME Journal* **1**:419-435.
62. **Wu, L. Y., D. K. Thompson, X. D. Liu, M. W. Fields, C. E. Bagwell, J. M. Tiedje, and J. Z. Zhou.** 2004. Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environmental Science & Technology* **38**:6775-6782.
63. **Zhou, J.** 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Microbiology* **6**:288-294.

C. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form hätte entstehen können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jens Harder für die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Seine guten und fachkompetenten Ratschläge und seine großzügige Förderung dieser Arbeit sowie seine Hilfe bei Konferenzen, Publikationen, Seminaren waren für mich von unschätzbarem Wert.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Amann danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens und die Finanzierung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer, Dr. Marcus Elvert, Richard Hahnke und Robert Marmulla danke ich für die Teilnahme am Prüfungskomitee.

Zudem danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Mikrobiologie für die gute Arbeitsatmosphäre, fachliche Unterstützung und Anregungen. Für technische Assistenz und Einarbeitung danke ich Christina Probian.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen jetzigen und ehemaligen Mitstreitern aus Büro, Labor und sonstigen Ecken des MPI. Hier sind vor allem Alex, Andi, Frauke, Jan, Johannes, Kirsten, Marcel, Nadine, Sandra, Stefano, Steffi, Vladi und Zainab zu nennen. Besonderer Dank geht an Richard.

Viele Dank auch an alle Korrekturleser der Arbeit.

Schließlich danke ich noch meinen Eltern und meinem Bruder für ihre jederzeitige Unterstützung.