

**Isolierung und genetische Charakterisierung von Stämmen
des Planctomycetengenus *Rhodopirellula* und die
Biogeographie in europäischen Gewässern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Dem Fachbereich Biologie/ Chemie der
Universität Bremen vorgelegt von

Nadine Winkelmann
aus Rahden

Bremen 2009

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Doktorarbeit wurden von Dezember 2005 bis Dezember 2008 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Jens Harder
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Amann

Tag des Promotionskolloquiums: 25.05.09

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung der Arbeit	4
A Einleitung	6
1. Marine Mikrobiologie in Europa: Strömungen und biogeochemische Gradienten	6
2. Biogeographie von Bakterien	8
3. Das Phylum der <i>Planctomyceten</i> und seine Vertreter	10
4. <i>Rhodopirellula baltica</i>	13
5. Weitere Kompartimentierungen in anderen Phyla	15
6. Phylogenetische Untersuchungsmethoden	16
6.1 Multilocus Sequencing Analysis	18
7. Elektronenmikroskopie	19
8. Zielsetzung der Arbeit	21
B Ergebnisse und Diskussion	22
1. Probennahme und vorliegende Umweltbedingungen	22
2. Isolierung der neuen Stämme	23
3. Phylogenetische Untersuchungen der Neuisolate	26
4. Genomanalyse	28
4.1 G+C-Gehalt	28
4.2 DNA-DNA-Hybridisierung	29
5. Einteilung der Stämme in verschiedene OTUs	31
5.1 Multilocus Sequencing Analysis (MLSA)	31
5.2 BOX-PCR	36
6. Morphologische Untersuchungen	39
6.1 Lichtmikroskopie	40
6.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM bzw. SEM)	41
6.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	41
7. Biogeographie der Gattung <i>Rhodopirellula</i>	44
8. Ausblick	46
C Literatur	48
D Anhang	55
E Publikationen	60
I. Publikationsliste mit Erläuterungen	60

1. An improved isolation method for attached-living Planctomycetes of the genus <i>Rhodopirellula</i>	60
2. Diversity analysis of <i>Rhodopirellula</i> Isolates from European Seas applying a multilocus sequence analysis	60
3. Planctomycetes in electron microscopic pictures - a review and insights into the genus <i>Rhodopirellula</i>	60
II. Publikationen	60
F Danksagung	157

Abkürzungsverzeichnis

ANI	average nucleotide identity
ASW	Artifiziellles Seewasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FP	Framework Program
ICM	intracytoplasmatische Membran
kb	Kilobasenpaare
MB	Megabasenpaare
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
MPI BPC	Max Planck Institut für biophysikalische Chemie
NJ	Neighbour Joining
ORF	Open reading frame
OTU	Operational taxonomic unit
PCR	polymerase chain reaction
PSU	Practical salinity unit
<i>R. baltica</i>	<i>Rhodopirellula baltica</i>
RB	<i>Rhodopirellula baltica</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie (=SEM)
rrn	rRNA Gen-Operon
SEM	Scanning electron microscopy (=REM)
SH	Schleswig-Holstein
SSU	small subunit (16S rRNA in kleiner Untereinheit der Ribosomen)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UDS	Ultra-Dünnschnitt

Zusammenfassung der Arbeit

Die Isolierung von neuen Stämmen des Planctomycetengenus *Rhodopirellula* und die genetische Charakterisierung der Stämme sollte neue Einsichten in die Diversität und Biogeographie von anhaftend-lebenden Bakterien ermöglichen. Zu Beginn dieser Arbeit lag nur eine beschriebene Spezies der Gattung vor, *Rhodopirellula baltica*. Der Typstamm SH1 sowie weitere Stämme waren von der Arbeitsgruppe Heinz Schlesner (Universität Kiel) aus unterschiedlichen Wasserproben der Kieler Bucht, einem Teil der Ostsee, isoliert worden. Diese dienten zur Methodenentwicklung bei der Kultivierung und Etablierung molekularer Methoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 130 verschiedene Wasser-, Sediment-, Algen- und Planktonproben gesammelt und mindestens einmal als Inokulum verwendet. Die nördlichsten Probenstandorte lagen in Island und Spitzbergen, die südlichsten in Argentinien und Tansania. Aus 19 dieser Proben konnten Planctomycetenstämme isoliert werden, die der gesuchten Spezies *R. baltica* morphologisch und genetisch ähnelten. In einer Screening-PCR wurden Stämme identifiziert, die in 16S rRNA Teilsequenzen als nächsten Verwandten den Typstamm SH1 von *R. baltica* aufwiesen. Diese Stämme wurden als Reinkultur isoliert. Insgesamt wurden 70 neue Stämme erhalten. Die Mehrzahl der Isolate stammte wie auch die Mehrzahl der Proben aus europäischen Gewässern. Das nördlichste Isolat kam aus Sandgerdi, Island, das südlichste aus Piräus, Griechenland. Zusätzlich wurden ein Isolat aus Dar-es-Salaam, Tansania, und 12 Isolate aus zwei verschiedenen Proben von Panglao Island auf den Philippinen gewonnen.

Alle Isolate zeigten in unterschiedlicher Ausprägung eine rosa bis rote Färbung der Kolonien und runde bis längliche Zellen, die sich zu Rosetten zusammenschließen und mittels Knospung fortpflanzen. Die vollständige 16S rRNA-Gensequenz von 69 Stämmen sowie Teilsequenzen eines weiteren Stammes weisen in BLAST-Analysen *R. baltica* SH1 als nächstverwandte beschriebene Spezies auf. Die Sequenzidentitäten liegen zum Teil außerhalb der Speziesgrenze (98,7 %, Stackebrandt & Ebers, 2006). Dementsprechend enthält die Stammsammlung neue Spezies der Gattung *Rhodopirellula*.

Zur Charakterisierung der Isolate wurde eine Multilocus Sequenz Analyse (MLSA) entwickelt, die mit klassischen Methoden kalibriert wurde. Die Bestimmung des G+C-Gehalts von 16 Neuisolaten zeigte einen G+C-Gehalt von 53,6 bis 56,6 mol% und damit eine Übereinstimmung mit den publizierten Grenzen des Genus. Die DNA-DNA-Hybridisierung von 14 Neuisolaten mit dem Typstamm SH1 und einem weiteren Stamm der Spezies führte zu einer Unterteilung der Stämme in vier verschiedene Gruppen. Die erste, benannt als OTU A, beinhaltet den Typstamm von *Rhodopirellula baltica* sowie die weiteren bereits als *R.*

baltica identifizierten SH-Stämme. In OTU B fallen nach DNA-DNA-Hybridisierung die Stämme CS7, CS8, CS11, CS70, CS115, SM38, 2S, 6C, 1SC, 3SC und 4SC, die aus den Niederlanden, Italien und Griechenland stammen. Ein weiteres OTU C wird nur von Isolaten aus der italienischen Adria gebildet. Der Stamm SM1 von Mallorca bildet nach DNA-DNA-Hybridisierung allein das OTU D.

Die MLSA von neun verschiedenen Haushaltsgenen bestätigte die genetische Spezies der DNA-DNA-Hybridisierung. Die Stämme wurden in die OTUs A bis M eingeordnet. Aufgrund der großen genetischen Unterschiede zwischen den Gruppen war das entwickelte MLSA Schema nicht für alle Stämme anwendbar. Nur die Gene *mdh* und *glpF* führten in fast allen Isolaten zu genetischen Informationen, die anderen entwickelten Primer waren nur für *R. baltica* und eine eng verwandte Spezies geeignet. Mittels BOX-PCR wurden die Gruppierungen dieser nah verwandten OTU A und B bestätigt.

Die mikroskopische Untersuchung der Neuisolate zeigte typische Merkmale von *Rhodopirellula* sp., z.B. Rosettenbildung, Vermehrung mittels Knospung und einen zweiphasigen Lebenszyklus mit Schwärmerzellen. Mittels Elektronenmikroskopie wurden die intracytoplasmatische Kompartimentierung durch eine weitere Membran und filamentöse Zellanhänge charakterisiert sowie morphologische Unterschiede zwischen den OTUs wurden aufgezeigt.

Die 70 Isolate dieser Arbeit wurden durch die molekularbiologischen Untersuchungen in 12 genetische Spezies der Gattung *Rhodopirellula* sp. eingeteilt, die nach der Probenherkunft in Europa mehrere lokale und eine europäische Verbreitung haben. So wurden Isolate von *Rhodopirellula baltica* aus schwedischen Skagerrak- und deutschen Nordsee-Proben isoliert. Diese auf Kultivierung basierende Biogeographie kann durch die entwickelten Primer in Zukunft durch die direkte Charakterisierung der Sedimentproben erweitert werden.

A Einleitung

1. Marine Mikrobiologie in Europa: Strömungen und biogeochemische Gradienten

Marine Mikrobiologie ist eine Teildisziplin der Mikrobiologie und beschäftigt sich mit der Beschreibung und der Untersuchung von marinen Stoffkreisläufen, die von Mikroorganismen beeinflusst werden. Studien zufolge sind von ca. $4\text{--}6 \times 10^{30}$ prokaryotischen Zellen auf der Erde 118×10^{27} Zellen in aquatischen Lebensräumen zu finden (Whitman et al., 1998). 71 % der Erdoberfläche sind von Wasser bedeckt, wovon 97 % marine Lebensräume beinhalten. Die Prozesse im Meer wirken sich nicht nur auf die direkte Umgebung oder einzelne Meeresströmungen aus, sondern auch auf das gesamte Erdklima. Eine für das Klima in Nordeuropa sehr wichtige und auch intensiv untersuchte Strömung ist der Nordatlantikstrom, ein Teilausläufer des Golfstroms. Dessen Wassermassen durchqueren als Teil eines globalen Strömungssystems den Atlantischen und Indischen Ozean und nehmen auf diesem Weg kinetische Energie in Form von Wärme an der amerikanischen Äquatorküste des Atlantiks auf und transportieren sie als Oberflächenströmung bis an die Küsten Nordeuropas. Angetrieben wird dieses System von der thermohalinen Zirkulation sowie von Winden. Auf demselben Breitengrad können die Temperaturen zwischen amerikanischer und nordeuropäischer Atlantikküste so um bis zu 15 °C variieren, wovon 4 °C dem direkten Einfluss der Meeresströmung zugesprochen werden. Auf Höhe Islands am Grönland-Schottland-Rücken fallen die oberflächennahen warmen Wassermassen plötzlich ab, da sich die Dichte des Stromwassers wegen Temperaturveränderungen durch die kalten polaren Wassermassen und die unterschiedlichen Salzgehalte verändert und eine senkrechte Strömung entstehen lässt. Eine rückwärtig gerichtete Tiefenströmung befördert die nun kalten Wassermassen wieder in südliche Richtungen. Neben kinetischer Energie in Form von Wärme werden in dem Strom auch Nährstoffe und Organismen transportiert. Ein stetiger Austausch an Arten ist so prinzipiell möglich.

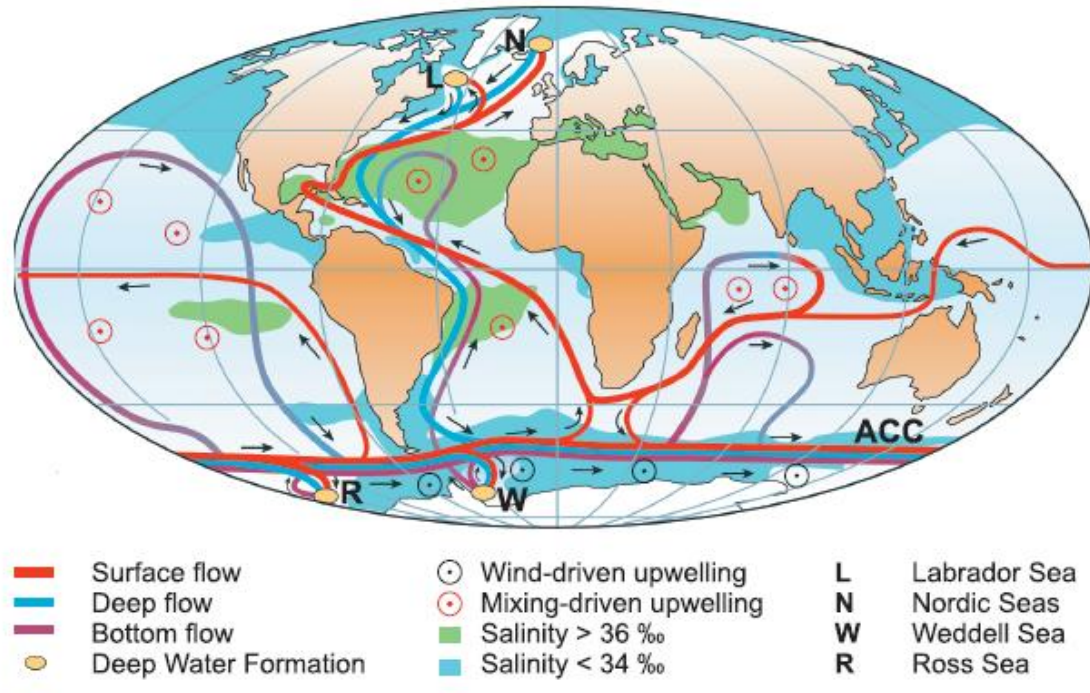


Abbildung 1: Strömungssysteme (nach Kuhlbrodt et al., 2007).

Europäische Gewässer weisen sehr unterschiedliche Parameter auf. Die Salinität im Mittelmeer und der spanisch-portugiesischen Atlantikküste beträgt mehr als 36 PSU und sinkt in Richtung Nordeuropa immer mehr ab. In der Nähe des Polarkreises bei Spitzbergen weist der Atlantik aber noch 34 PSU im Oberflächenwasser auf, während die Nordsee in Richtung Osten auf unter 30 PSU absinkt und die Ostsee Werte weit unter 20 und teilweise auch 10 PSU aufweist. Diese Schwankungen stellen für marine Lebewesen eine Gefahr dar, auf die sie mit speziellen Mechanismen aktiv reagieren müssen oder aber sich bei geringen Toleranzgrenzen lokal auf einen konstanten Lebensraum beschränken müssen. Außer diesen großräumigen Schwankungen können auch kleinere Regionen starken, schnellen Veränderungen ausgesetzt sein. Im Polarmeer droht auf Grund der niedrigen Temperaturen das Wasser zu gefrieren. Die Lebewesen brauchen einen Schutzmechanismus gegen die Kälte. In der relativ flachen Nordsee gibt es das Wattenmeer, dessen Wasser zweimal am Tag völlig abläuft und große Sedimentflächen freilegt. Durch Sonneneinstrahlung droht Trockenheit oder in Prielen und kleinen Wasserlachen durch Verdunstung ein Anstieg der Salinität, UV-Einstrahlung und Temperatur. Diese Schwankungen beeinflussen die Lebewesen in ihrem Lebensraum.

2. Biogeographie von Bakterien

1934 veröffentlichte der holländische Forscher Lourens Baas-Becking in Anlehnung an Beijerinck die Hypothese „*Alles is overal: maar het milieu selecteert*“ und bezog sich mit dieser Aussage auch auf Mikroorganismen. Die vielzitierte Übersetzung „Everything is everywhere, but the environment selects“ wird seitdem im Bereich der Mikrobiologie sehr kontrovers diskutiert. Die Grundaussage dieser Hypothese bedeutet für Bakterien, dass sie grundsätzlich als Kosmopoliten über die gesamte Welt verstreut sind und sich überall dort vermehren, wo die Umweltbedingungen ihren Ansprüchen genügen. Demnach müssten Mikroorganismen in ähnlichen Habitaten auch gleiche oder zumindest ähnliche Merkmale aufweisen und nah verwandt sein. Die Definition einer Spezies ist dabei essentiell, um Unterschiede innerhalb einer Spezies oder zwischen verschiedenen Arten richtig einordnen zu können. Der biologische Artbegriff ist für Prokaryoten nicht anwendbar, da er sich auf die Fähigkeit der sexuellen Fortpflanzung und der damit einhergehenden Rekombination bezieht. Prokaryoten jedoch sind haploid und vermehren sich asexuell. Daher beinhaltet die derzeitige Beschreibung einer Spezies in der Mikrobiologie eine Kombination von morphologischen, physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Parametern (Rossello-Mora & Amann, 2001; Stackebrandt et al., 2002). Für den schnellen, kultur-unabhängigen Nachweis in einer Umweltprobe wird häufig allein die Sequenzierung des 16S rRNA Gens angewandt. Eine Identität von weniger als 98,7 % auf dem ca. 1540 Basenpaar-langen Gen schließt die Zugehörigkeit zweier Prokaryoten zu derselben Art aus (Stackebrandt & Ebers, 2006). Die Aussagekraft des 16S rRNA Gens kann nach Analyse der vorhandenen Datensätze nur die Gattung identifizieren, nicht aber zur Speziesbestimmung genutzt werden (Yarza et al., 2008). Studien, die allein auf der Analyse dieses Genes beruhen, müssen daher in ihrer Aussagekraft als geringer eingestuft werden als solche, die weitere Gene oder auch das gesamte Genom (z. B. Fingerprintmethoden) mit einbeziehen. So wird auch die Sequenzierung spezifischer Markergene, wie z. B. für die Enzyme im Stickstoffkreislauf (nrf-Gene für die periplasmatische Nitrit-Reduktase), zum Nachweis von Organismen verwendet (Mohan et al., 2004). Dabei wird der Begriff OTU (operational taxonomic unit) verwandt um Missverständnisse mit der Speziesdefinition zu vermeiden. Fraglich ist, ob der Nachweis einer Zelle einer Spezies bereits der Beweis für die Anwesenheit einer ganzen Population ist, oder ob diese Zelle nur latent vorhanden ist, ohne sich aktiv zu vermehren. Die Auflösungskraft der zur Zeit verwendeten Methoden ist teilweise noch zu gering um dementsprechende Aussagen treffen zu können. Zudem bedeutet das Misslingen der Detektion eines Organismus in einem bestimmten Habitat nicht gleichzeitig,

dass er nicht vorhanden ist. Die Nachweisgrenzen der Untersuchungsmethoden liegen oberhalb einer sehr geringen Zelldichte.

Biogeographie bezieht sich auf die Verteilung von Biodiversität in einem bestimmten Raum (Habitat) zu einer bestimmten Zeit (Martiny et al., 2006). Die Habitatgröße eines Bakteriums stellt die Untersuchung der Biogeographie dabei vor ein Problem. Während größere Lebewesen klar definierte Lebensräume aufzeigen und die Erreichbarkeit neuer durch die individuelle Reichweite des Tieres oder der Pflanze vorhergegeben ist, so stellt allein die Größe des Organismus eine Herausforderung für Mikrobiologen dar. Auf kleinstem Raum wie im Umkreis eines Bodenpartikels können wichtige Parameter wie Sauerstoffkonzentrationen schon so stark schwanken, dass sich das Habitat für Mikroorganismen auf ein sehr geringes und kaum definierbares Volumen beschränkt. Der Vergleich von verschiedenen Standorten, die mehrere hundert oder tausend Kilometer von einander entfernt liegen, ist in diesen Dimensionen nur schwer möglich. Verschiedene Studien zeigen, dass die genetische Distanz zweier Prokaryoten mit der geographischen Distanz in Korrelation steht (Cho & Tiedje, 2000; Papke et al., 2003; Whitaker et al., 2003). Die Migration ist häufig auf eine Region beschränkt, da geografische Barrieren den Genfluss hindern. Weitere abiotische Faktoren wie Salinität, Temperatur, pH-Wert oder Lichteinstrahlung sind dabei dennoch genauso zu beachten wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Drei wichtige Prozesse beeinflussen, ob biogeographische Muster zu erkennen sind: Artenbildung, Aussterben und Verbreitung eines Taxons (Horner-Devine et al., 2004). Da Prokaryoten nur eine geringe Größe und ein geringes Gewicht aufweisen, können sie leicht durch die Atmosphäre oder durch Wasser verteilt werden. Einige Gattungen wie *Bacillus* sp. sind regelrechte Kosmopoliten (Roberts & Cohan, 1995, berichtet in Horner-Devine et al., 2004). Durch Sporenbildung können sie umweltbedingte Stresssituation überdauern oder fortgetragen werden. Bei günstigen Bedingungen gehen die Zellen dann wieder in die aktive Phase über. Auf diese Weise können Bakterien theoretisch jeden Winkel der Erde erreichen. Die Artenbildung ist bei Bakterien dagegen bivalent. Zum einen weisen einige von ihnen große Populationsdichten mit schnellen Wachstumsphasen auf. Positive Mutationen können so schnell verbreitet werden und eine Spezifizierung in eine neue Art kann schnell erfolgen. Andererseits finden unter Prokaryoten im Gegensatz zu Eukaryoten kaum Rekombinationsereignisse statt. Bakterien können allerdings bestimmte Gene wie z.B. für Antibiotikaresistenz übertragen. Ein Genom-Unterschied von bis zu 25 % ist dabei zwischen den verschiedenen Organismen einer Gattung möglich (Duncan et al., 1989). Die Sterberate von Prokaryoten ist vermutlich relativ gering, da verschiedene Mechanismen sie vor extremen Umweltbedingungen besser schützen als es eukaryotische Organismen können (Horner-Devine et al., 2004). Dadurch wird die Diversität von Prokaryoten erhöht. Biogeographie ist bei freilebenden Bakterien abhängig von Art und Habitatfläche. Weitere

Parameter spielen aber ebenfalls eine Rolle: Mikroorganismen aus extremen Lebensräumen wie heißen Quellen oder psychrophile Bakterien an den Polkappen sind mit der Hypothese Baas-Beckings nur schwer zu vereinen. So wurden 78 verschiedene Stämme des Archaeons *Sulfolobus* sp. aus geothermalen Gebieten der nördlichen Hemisphäre isoliert und in 16S rRNA Gen-Identität und in 8 weiteren Genloci untersucht. Die 16S rRNA Gensequenzen zeigten eine Übereinstimmung von mindestens 99,8 % und im Gesamtkontext aller untersuchten Gene konnte nur ein Unterschied von höchstens 1,05 % ermittelt werden. Nach verschiedenen Genomstudien weisen Isolate einer Spezies eine durchschnittliche Nukleotididentität (ANI, average nucleotide identity) von 94 % und mehr auf (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Somit gehören alle Isolate dieser *Sulfolobus*-Studie einer Spezies an. Dennoch war eine Musterbildung mit biogeographischer Aussage möglich. Identische Isolate aus nur wenig entfernten Quellen (< 50m) zeigten, dass Genfluss auf kurzen Distanzen möglich ist. Je größer die geographische Distanz zwischen den Probenorten war, umso größer war auch der genetische Unterschied zwischen den Populationen. Die Beschaffenheit und Umweltparameter des Isolationsortes spielten dabei nur eine untergeordnete Rolle. Genauso fanden Staley und Gosink (1999) in einer zusammenfassenden Studie über psychrophile Bakterien (Temperaturmaximum <20 °C) der beiden Polarregionen keine Vertreter einer Spezies an beiden Polen. Obwohl sich die Umweltbedingungen der beiden Habitate fast gleichen, stellt die große Entfernung zwischen Nord- und Südpol, sowie die notwendige Durchquerung warmer Gewässer in Äquatornähe eine anscheinend unüberwindbare Barriere für psychrophile Bakterien dar. Die Nutzung kalter Tiefenströmungen für die Transsektion würde einen zu langen Zeitraum (ca. 100 Jahre) unter nicht optimalen Bedingungen in Anspruch nehmen. Daher konnten keine gleichen Spezies, aber gleiche Gattungen gefunden werden.

Prokaryotische Gattungen können demnach, wie von Baas-Becking vorher gesagt, kosmopolitisch sein, während der endgültige Beweis einer freilebenden endemischen Spezies außerhalb extremer Lebensräume noch aussteht.

3. Das Phylum der *Planctomyceten* und seine Vertreter

Planctomyceten sind eine monophyletische Gruppe von Bakterien, die sich mittels Knospung vermehren. Ihr Erstentdecker Gimesi beobachtete den ersten Vertreter 1924 in einem See in der Nähe von Budapest und ordnete ihn aufgrund der Knospung und einer Rosetten-Bildung fälschlicherweise den planktonischen Pilzen zu, daher der Name *Planctomyces bekefii*. Ihm gelang allerdings keine Isolierung und Reinkultur. Erst 1973 berichtete Staley von der Isolierung eines knospenden Bakteriums dieser Gruppe, das 1976 als *Planctomyces maris* veröffentlicht wurde (Bauld & Staley, 1976). Trotz des vorherigen Fehlers bei der

Bestimmung wird der Name *Planctomycetes* für das Phylum beibehalten (Staley et al., 1992). *Planctomyceten* sind ubiquitär und konnten in terrestrischen wie auch aquatischen Habitaten zumindest mittels 16S rRNA Genanalyse nachgewiesen werden (z. B. Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003; Woebken et al., 2007). Die Habitate sind dabei sehr divers und variieren stark in ihren ökologischen Parametern. Isolate wurden aus oxischen und anoxischen Habitaten wie Süßwasser, Meerwasser, Tiefsee, Boden, Klärschlamm und dem Inneren von *Crustaceen*-Larven und Schwämmen berichtet (Ivanova & Dedysh, 2006; Liesack & Stackebrandt, 1992; Lopez-Garcia et al., 2001; Pimentel-Elardo et al., 2003; Wang et al., 2002; Ward et al., 2006). Ein verstärktes Auftreten wurde in marinen Habitaten nach Algenblüten beobachtet, was durch ihre Fähigkeit zur Anheftung erklärt werden kann (Brümmer et al., 2000; Brümmer et al., 2004; Eiler & Bertilsson, 2004; Tadonleke, 2007). Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehrere aerobe, heterotrophe Gattungen beschrieben: *Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Zarvarzinella*, *Isophaera*, *Singulisphaera* and *Schlesneria* (Fuerst et al., 1997; Giovannoni et al., 1987; Kulichevskaya et al., 2007; Kulichevskaya et al., 2008; Kulichevskaya et al., 2009; Schlesner et al., 2004; Schmid et al., 2003; Staley et al., 1980; Ward et al., 2006). Zugleich werden in der Literatur noch 5 verschiedene Gruppen der *Candidatus*-Spezies der Anammoxbakterien aufgeführt. Diese bisher noch nicht in Reinkultur vorliegenden Bakterien können eine anaerobe Ammoniumoxidation durchführen. Dabei wird Ammonium (NH_4^+) mit Nitrit (NO_2^-) unter anaeroben Bedingungen zu molekularem Stickstoff (N_2) umgesetzt (Schmid et al., 2003). Alle *Planctomyceten* haben zwei Gemeinsamkeiten: ihnen fehlt Peptidoglycan in ihrer Zellwand und sie besitzen eine intrazelluläre Kompartimentierung. Neben den *Chlamydien*, intrazelluläre Energie-Parasiten mit einem reduzierten Genom (Teeling et al., 2006), sind *Planctomyceten* die einzigen bekannten Bakterien ohne Peptidoglycan in ihrer Zellwand. Diese ist reich an Prolin und Cystin und wird von Schwefelbrücken der Proteine stabilisiert (Liesack et al., 1986; Stackebrandt et al., 1986). Aufgrund dieser Besonderheit sind *Planctomyceten* resistent gegen Antibiotika, die die Peptidoglycansynthese oder aber den Aufbau der Zellwand angreifen. Dieser Umstand kann in der Isolationsstrategie ausgenutzt werden. Die intrazelluläre Kompartimentierung der *Planctomyceten* ist in dieser Form einzigartig bei Prokaryoten. Im einfachsten Aufbau umgibt eine Membran (intracytoplasmatische Membran, ICM) den fibrillären Nucleoid und den Großteil der Ribosomen. Dieses Kompartiment wird Pirellosom genannt, in Anlehnung an die Gattung *Pirellula* (Lindsay et al., 1997). Außerhalb des Pirellosoms im Cytoplasma können sich je nach Spezies noch weitere kleinere Einschlußkörper befinden. Ribosomen zeigen sich in der Elektronenmikroskopie als Elektronen-dichte Partikel im Pirellosom und sind mit Immunofluoreszenz-Methoden nicht außerhalb des Pirellosoms im Paryphoplasma zu finden. Verschiedene Gattungen zeigen unterschiedliche Ausprägungen der intrazellulären

Kompartimentierung. Neben verschiedenen Formen werden auch weitere Membranen innerhalb des Pirellosoms entdeckt. *Gemmata obscuriglobus* weist eine zweite doppelte ICM innerhalb des Pirellosoms auf, die laut EM-Analyse gefaltet ist und den Nucleoid wie eine Zellkernmembran umschließt (Fuerst, 2005). Der Zellkern der Eukaryoten zeigt starke Ähnlichkeiten zu dieser Struktur, weshalb *Planctomyceten* für einige Zeit als mögliche Verbindung zwischen Prokaryoten und Eukaryoten angesehen wurden (Endosymbiontentheorie gegen autonome Kerngenese, Lindsay et al., 2001). Ein weiteres Zellkompartiment innerhalb des Pirellosoms zeigen die Anammoxbakterien, die in einem Anammoxosom genannten Kompartiment giftige Zwischenprodukte ihres Stoffwechsels aufbewahren (Hydrazin). Bis heute ist der Transportmechanismus innerhalb der Planctomycetenzelle durch die ICM unbekannt.

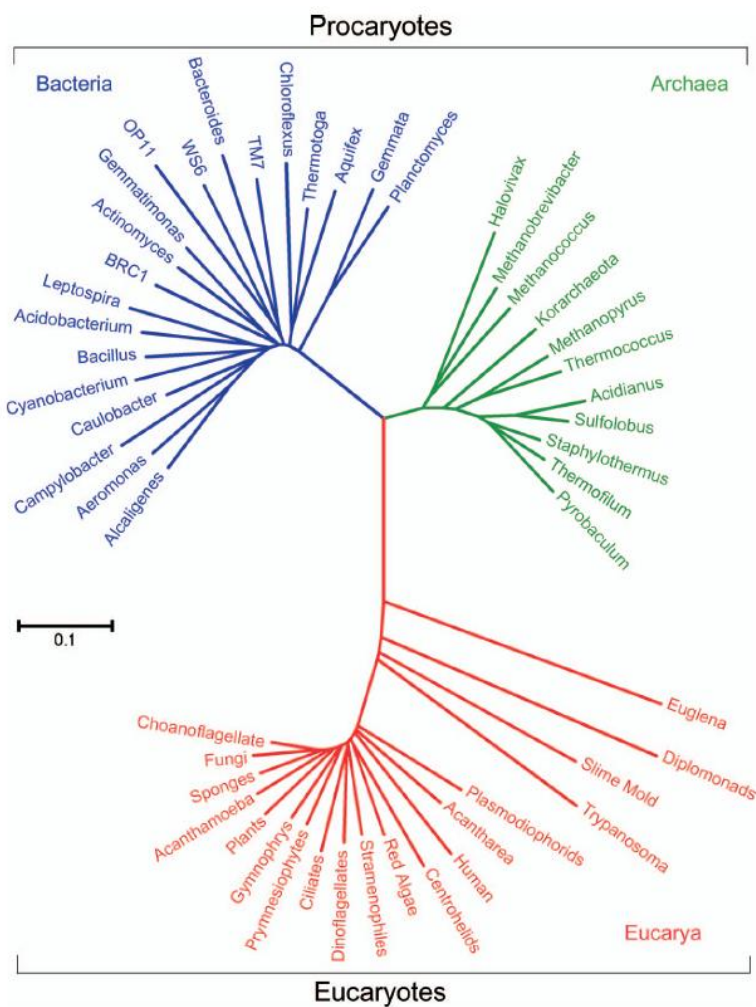


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum auf Grundlage von 16S bzw. 18S rRNA-Gensequenzen (SSU) der drei Domänen *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya*. Der unverwurzelte Baum wurde mittels einer Maximum Likelihood Methode berechnet, die Astlänge gibt die evolutionäre Distanz wieder. (Aus Whitman, 2009).

Phylogenetische Analysen stellen das Phylum der *Planctomyceten* häufig als eines der ursprünglichsten *Bacteria* dar und positionieren es in 16S rRNA-Gen basierenden Bäumen nahe dem Übergang zu *Archaea* und *Eukarya*. Trotz widersprüchlicher Aussagen zeigt auch der zuletzt veröffentlichte phylogenetische Baum aller drei Domänen wieder diese Anordnung (Abb. 2). Die Einordnung aller Taxa in einen phylogenetischen Baum des Lebens und deren Positionen innerhalb dieses Gefüges werden sich noch häufig ändern, da immer noch neue Daten und Taxa dazukommen.

4. *Rhodopirellula baltica*

Im Jahr 2004 wurde die Gattung *Pirellula* in drei verschiedene Gattungen mit jeweils einer Spezies aufgeteilt: *Pirellula staleyi*, *Blastopirellula marina* und *Rhodopirellula baltica* (Schlesner et al., 2004). Genauere Untersuchungen wie DNA-DNA-Hybridisierungen hatten gezeigt, dass es sich um drei einzelne Gattungen handelt, die sich phylogenetisch und chemotaxonomisch voneinander unterscheiden.

Rhodopirellula baltica SH1^T wurde 1986 aus Oberflächenwasser der Kieler Bucht isoliert (Schlesner, 1986) und die Gattung besteht bisher aus nur einer Spezies. Verschiedene weitere Isolate dieser Spezies wurden aus Wasser der Kieler Bucht sowie aus dem Gewebe von *Aplysina aerophoba*, einem Mittelmeer-Schwamm, isoliert und mittels DNA-DNA-Hybridisierung dem Typstamm SH1 zugeordnet (Gade et al., 2004; Schlesner et al., 2004). FISH-Studien zeigten eine stetige Abundanz der Spezies in der Kieler Bucht mit Zellzahlen von 10⁴ Zellen pro ml Wasser (Gade et al., 2004). *R. baltica* ist ein strikt aerobes heterotrophes Bakterium. Es bildet auf festem Medium rosa bis rote Kolonien, deren Farbstoff bisher noch unbekannt ist. Die Zellen besitzen eine ovoide bis birnenförmige Gestalt und sind mittels einer ICM in Pirellulosom und Paryphoplasma unterteilt. Die Zellen proliferieren mittels Knospung am reproduktiven Pol der Zelle, der zudem von so genannten „kraterförmigen“ Strukturen bedeckt ist. Am vegetativen Pol der Zelle wird eine Holdfast-Substanz abgesondert, die aus Glycoproteinen besteht. *R. baltica* besitzt einen zweiphasigen Zellzyklus. Juvenile Zellen sind mittels eines Flagellums beweglich, das sie während der Maturation verlieren. Adulte Zellen heften sich mit einer Holdfast-Substanz an Oberflächen wie Sedimentpartikel oder aneinander und formen so Rosetten (Gade et al., 2005). Auch die Anheftung an Partikel des „marine snow“ (abgestorbenes organisches Material, mariner Schnee) wird diskutiert.

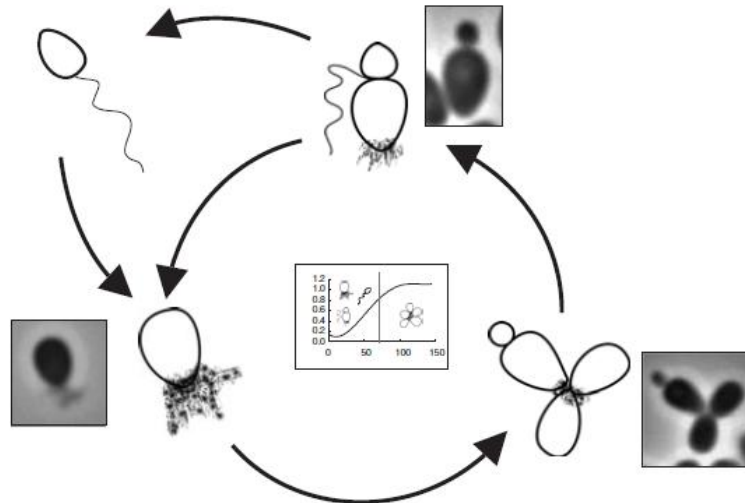


Abbildung 3: Schematische Zeichnung des Zellzyklus von *R. baltica* (aus Gade et al., 2005).

Rhodopirellula baltica war die erste Spezies der *Planctomycetes* mit vollständig sequenziertem Genom. Mit 7,145 MB ist dieses Genom eines der größten sequenzierten zirkulären bakteriellen Genome. Mehr als 7000 ORF (open reading frames) kodieren ebensoviele mögliche Enzyme, darunter 110 vermutliche Sulfatasen, welche eine wichtige Rolle in der Degradation von mariner abgestorbener organischer Materie (marine snow) spielen. Die genetische Information des Organismus ist auf einem zirkulären Chromosom organisiert, das einen 343,5 kb großen Inversionsbereich aufweist (Glöckner et al., 2003). Zudem besitzt *Rhodopirellula baltica* kein *rrn* Operon, da 16S und 5S-23S rRNA Genes durch 460 kb separiert sind.

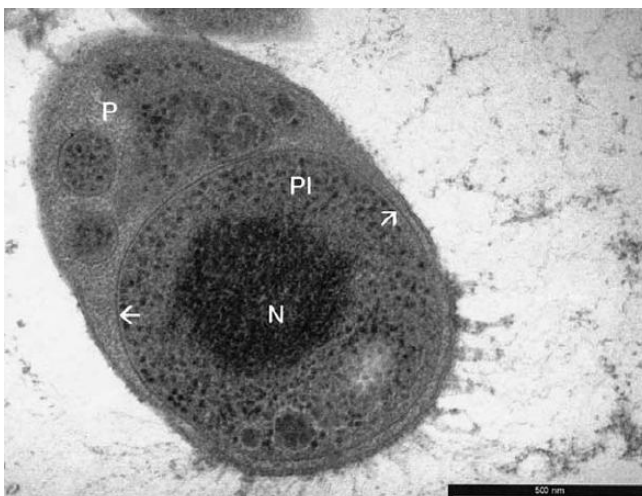


Abbildung 4: TEM-Aufnahme des *Rhodopirellula baltica* Stammes SH796, isoliert aus dem marinen Schwamm *Aplysina aerophoba* (Gade et al., 2004) sowie kreisförmige Darstellung des Genoms von *Rhodopirellula baltica* SH1^T mit Einzeichnung der Lage für Gene für Ribosomen im 3. Kreis, der

Antibiotika-Biosynthese im 4. Kreis, der Sulfatasen im 6. Kreis und des C1-Metabolismus im innersten Kreis (Glöckner, 2006).

Rhodospirellula baltica ist ein aerober Organismus, aber er besitzt mehrere Gene, die für die Fermentation notwendig sind. Ebenso befinden sich auch die Gene zur Peptidoglycan-Produktion im Genom. Glöckner und Kollegen vermuten einen evolutionären Verlust des kompletten Pfades. Ein weiterer interessanter Punkt im Genom ist das fast vollständige Potential zur Konvertierung von C1-Metaboliten. Allerdings fehlen die Gene für die ersten Oxidationsschritte. Daher ist ein Wachstum auf Methanol oder Methylamin nicht möglich. Dennoch ist das Vorhandensein von Genen für Tetrahydromethanopterin(H₄MPT)-abhängige Enzyme ein interessanter Aspekt außerhalb der *Archaea* und methylo trophen *Proteobakterien*.

5. Weitere Kompartimentierungen in anderen Phyla

Neben *Planctomyceten* sind auch andere Prokaryoten für intrazelluläre Strukturen bekannt. Allerdings weist keines der anderen Beispiele eine so starke Ähnlichkeit zu eukaryotische Zellstrukturen auf wie die ICM der *Planctomyceten*.

Subzelluläre Organisation ist in Eukaryoten typisch und dient als grundlegendes Unterscheidungsmerkmal zu prokaryotischen Zellen. Der Besitz von Organellen wie Zellkern, Chloroplasten und Mitochondrien kann in der Identifizierung der Zellen einen Prokaryoten ausschließen. Mitochondrien besitzen sogar eine eigene genetische Information und werden bei der Proliferation vererbt. Eukaryotische Organellen sind vom Cytoplasma durch mindestens eine Lipid-Doppelschicht, also eine Membran abgegrenzt.

Prokaryotische Zellen können ebenfalls subzelluläre Strukturen und Membransysteme enthalten. Diese sind aber nicht den eukaryotischen Organellen gleichzusetzen. Viele Prokaryoten besitzen Speicherstoffe, die als Granula mit oder ohne Membran im Cytoplasma gelagert werden. Volutin zur Phosphatspeicherung und Polysaccharid-Granula zur Speicherung von Glycogen und Kohlenhydraten sind solche recht häufigen Strukturen in Bakterien, die keine Membran aufweisen. Die PHB-Granula (Polyhydroxybuttersäure) von z.B. *Bacillus* und *Pseudomonas* Spezies verfügen über eine Lipid-Monomembran (Pötter et al., 2002). Neben der Funktion als Speicher werden subzelluläre Strukturen auch zur Energiegewinnung im Zellstoffwechsel genutzt. Photosynthetische Bakterien bilden durch Abschnürung der Cytoplasmamembran intracytoplasmatische Membransysteme oder Thylakoide, die für die Photosynthese genutzt werden. Die zum selben Zweck entwickelten Chlorosomen der grünen Schwefelbakterien hingegen sind von einer Lipid-Monomembran umgeben (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2007). Unilaminare Proteinschichten werden

zur Abgrenzung von Schwefeleinschlüssen in z.B. Purpurbakterien, zur Bildung von Gasvakuolen in Cyanobakterien, sowie in den Carboxysomen der autotrophen Bakterien zur CO₂-Fixierung verwendet (Cannon et al., 2001). Eine den eukaryotischen Organellen gleiche Abgrenzung durch Lipid-Doppelmembranen ist bei Prokaryoten nur in der Endosporenbildung, sowie bei der Bildung von Acidocalcisomen und Magnetosomen (Schüler et al., 2008) bekannt und wie bereits erwähnt, bei *Planctomyceten*.

Subzelluläre Strukturen bei Prokaryoten zeigen eine Funktion für die Zelle auf. Neben Speicherung und Energiegewinnung können sie auch der Ausrichtung der Zelle im Raum dienen. Außer der Isolierung von toxischen Zwischenprodukten und dem Aufbau eines Gradienten im Anammoxosom der Anammoxbakterien, fehlt diese funktionelle Ausrichtung der Kompartimentierung bisher in anderen *Planctomyceten*.

6. Phylogenetische Untersuchungsmethoden

Zur Untersuchung der bakteriellen Phylogenie stehen heute viele verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine häufig angewandte Methode zur Identifizierung eines Prokaryoten ist die Sequenzierung des 16S rRNA Gens. Ribosomale Gene stehen aufgrund ihrer wichtigen Funktion in den Ribosomen, dem Ort der Proteinbiosynthese, unter hohem evolutionären Druck zur Erhaltung der funktionellen Struktur. Mutationen und einhergehende Strukturänderungen in der rRNA können zum Funktionsverlust führen. Daher sind Veränderungen wie z. B. durch lateralen Gentransfer als sehr unwahrscheinlich anzusehen. Carl Woese entwickelte die Sequenzierung der SSU, der kleinen Untereinheit der Ribosomen, als Standardmethode zur phylogenetischen Einordnung von Mikroorganismen und nutzte die 16S rRNA der Prokaryoten erstmals als evolutionäre Uhr (Woese & Fox, 1977). Aus heutiger Sicht wissen wir, dass die 16S rDNA mit durchschnittlich 1540 Basenpaaren eine Identifizierung des Organismus bis hin zur Gattung zulässt (Yarza et al., 2008). Aufgrund der Kürze des Gens und der starken Konservierung kann eine Identifizierung der Art oder aber sogar eine Unterteilung in Unterarten und intraspezies-spezifische Untersuchungen nicht erfolgen. Dennoch nutzen verschiedene Methoden die kleine ribosomale Untereinheit als Ziel für ihre Untersuchungen. Mit ihnen werden bakterielle Gemeinschaften untersucht, um eine Aussage über die Spezieskomposition treffen zu können. In diesem Falle wird nicht von Spezies sondern Ribotypen gesprochen. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Bibliotheken von 16S rRNA-Genen, terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (T-RFLP) und amplifizierte rDNA Restriktionsanalyse (ARDRA) sind zurzeit häufig verwendete Analysemethoden. Sie besitzen allerdings zwei Nachteile: die Auflösungskraft des amplifizierten Gens (SSU) ist zu gering und aufgrund der zugrundeliegenden Polymeraseketten-Reaktion (PCR) können Artefakte

entstehen und manche Organismen eventuell gar nicht detektiert werden (Rossello-Mora & Amann, 2001).

Beim Vorliegen von Reinkulturen können neben der 16S rRNA Genanalyse noch weitere molekulare Methoden zur unterstützenden Identifizierung und für intraspezies-spezifische Untersuchungen angewandt werden. Diese als Fingerprint-Methoden bezeichneten Techniken sind in den meisten Fällen auch PCR basiert, beziehen sich aber auf das gesamte Genom oder definierte Teilstücke davon. Da bei dem Großteil der *Bacteria* die 16S rRNA Gene als Cluster vorliegen, bilden sie ein Operon (*rrn*) mit zwei internen transkribierenden Spacer-Regionen (ITS). Im Gegensatz zu den Genen unterliegen diese ITS-Sequenzen nicht demselben evolutionären Erhaltungsdruck und weisen eine höhere Varianz und damit auch Auflösung vor. Als automatische ribosomale intergenetische Spacer-Analyse (ARISA) wird diese Technik sogar in der Analyse mikrobieller Gemeinschaften verwandt. Allerdings besitzen nicht alle *Bacteria* ein *rrn*-Operon: Bei *Mycoplasmen* ist die 5S rDNA separiert (Taschke et al., 1986) und bei vielen *Planctomyceten* die 16S rDNA (Ward-Rainey et al., 1996). In der Domäne der *Archaea* ist eine solche Dislokalisierung des rDNA Operons sogar noch häufiger beobachtet worden (Neumann et al., 1983).

Fingerprint-Methoden führen in der Regel zu einem Gemisch an unterschiedlich großen PCR-Amplikons, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Das erhaltene Bandenmuster wird danach analysiert und Vergleiche zwischen den eingesetzten Organismen können gezogen werden. Verschiedene repetitive Elemente (rep-PCR) des bakteriellen Genoms können als Ziel dienen. Die Primersequenzen werden konservierten Bereichen dieser repetitiven Elemente entnommen, wobei diese Sequenzen über das gesamte Genom verteilt sind. Häufig genutzte Familien sind die 35- bis 40-bp repetitiven extragenetischen palindromischen Sequenzen (REP), die 124- bis 127-bp langen enterobakteriellen repetitiven intergenetischen Consensus-Sequenzen (ERIC) sowie das 154-bp BOX-Element (Louws et al., 1994). Diese Sequenzen sind alle evolutionär hoch konserviert, da sie wichtige Protein-DNA-Wechselwirkungsorte darstellen. Bereiche zwischen diesen Elementen hingegen sind unterschiedlich groß und zeigen somit ein Stamm-spezifisches Muster im Gelbild (Sikorski et al., 1999). Die Analyse dieser Fingerprints erfolgt dann mittels einer spezifischen Software, die Muster erkennen kann, in Matrixen umrechnet und so phylogenetische Bäume mittels UPGMA (Unweighted pair group method of analysis) berechnen kann. Neben konservierten Zielsequenzen können aber auch zufällige kurze Nukleotidsequenzen zur intraspezies-spezifischen Analyse genutzt werden. Diese RAPD-Primer (Random amplified polymorphic DNA) binden zufällig im Genom und produzieren daher in einer PCR eine Vielzahl unterschiedlicher Fragmente, die im Gel analysiert werden (Williams et al., 1990). Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit von Mustern dieser Methode nur gering ist.

6.1 Multilocus Sequencing Analysis

Eine wichtige und hochauflösende Methode ist die Sequenzierung verschiedener Haushaltsgene (housekeeping genes) geworden. Haushaltsgene werden konstitutiv exprimiert (unabhängig vom Zellzyklus und Umweltbedingungen) und sind essentiell für den Grundstoffwechsel einer Zelle. Ihre Sequenzen unterliegen somit auch einem evolutionären Druck und sind generell konserviert. Da sie im Gegensatz zu der 16S rRNA jedoch direkt zu Proteinen translatiert werden, können Punktmutationen an z. B. der dritten Position des Triplett-Codons (Wobble-Prinzip) ohne Einfluss auf die Funktion des Proteins sein. Diese stillen Mutationen unterliegen keinem evolutionären Druck und solche Unterschiede können als molekulare Uhr dienen. Im Jahr 1998 beschrieb Martin C. J. Maiden eine Methode zur eindeutigen Identifizierung von Isolaten des pathogenen Bakteriums *Neisseria meningitidis*. Da traditionelle Methoden kaum zwischen verschiedenen Laboren transferierbar sind und Ergebnisse nur schwer verglichen werden können, entwickelte er eine molekulare Technik, die die eindeutige Aussage und Publizierbarkeit von Nukleotidsequenzen für die Charakterisierung von Mikroorganismen nutzt (Maiden et al., 1998). Die Methode wurde Multilocus Sequence Typing (MLST) genannt. In der vorgestellten Studie wurden 107 Isolate des Bakteriums *Neisseria meningitidis* von verschiedenen Patienten (erkrankt und gesund) in 11 verschiedenen Haushaltsgenen miteinander verglichen. Bei durchschnittlichen Fragmentgrößen von 470 Basenpaaren wurden 26 bis 166 variable Basen pro Genfragment entdeckt. Es stellte sich heraus, dass sechs verschiedene Haushaltsgene ausreichend sind für eine Identifizierung der krankheitserregenden Linien der Serotypen A, B und C. Die erhaltenen Ergebnisse sowie die angewandten Protokolle lassen sich in global zugänglichen Datenbanken hinterlegen und die schnelle Identifizierung von pathogenen Bakterienstämmen ist somit jedem Labor möglich (z. B. www.MLST.net oder www.pubmlst.org).

Auch die Umweltmikrobiologie hat sich die Methode zu nutzen gemacht. In diesem Fall wird die Technik aber Multilocus Sequence Analysis (MLSA) genannt um zum einen eine Abgrenzung von der Klinischen Mikrobiologie und pathogenen Bakterien zu zeigen und zum anderen die primäre Ausrichtung auf die Artbeschreibung zu lenken. MLST nutzt Allelprofile von Stämmen innerhalb einer Spezies, während MLSA mit verknüpften Gensequenzen arbeitet um Spezies gegeneinander abzugrenzen (Delétoile et al., 2009). MLSA wird als möglicher Ersatz für Hybridisierungen des ganzen Genoms gehandelt. Verschiedene statistische Untersuchungen bestätigen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von DNA-DNA-Hybridisierung mit MLSA und können so einen neuen Standard in der Stammbeschreibung und Speziesdefinition liefern (Thompson et al., 2007).

7. Elektronenmikroskopie

Bei der morphologischen Beschreibung von Mikroorganismen ist der Lichtmikroskopie eine natürliche Grenze gesetzt. Prokaryotische Zellen besitzen eine Größe von durchschnittlich 0,3 bis 10 μm . Da die Wellenlänge des sichtbaren Lichts die Auflösung eines Lichtmikroskops auf 0,3 bis 0,5 μm beschränkt, können manche Mikroorganismen, vor allem aber ihre subzellulären Strukturen nicht ausreichend beobachtet werden. Die Nutzung anderer Strahlenquellen kann die Auflösung erhöhen. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nutzt einen genau fokussierten Laserstrahl, der die Oberfläche des Objekts abtastet und so Computer-gestützt eine dreidimensionale Aufnahme erzeugt. Aufgrund der geringfügigen anderen Lichtquelle wird eine laterale Auflösung von ~ 180 nm erreicht, axial jedoch nur ~ 470 nm.

Elektronen besitzen, ähnlich den Photonen, eine spezifische Wellenlänge, die durch Masse und Geschwindigkeit des Elektrons, sowie durch das Planck'sche Wirkungsquantum definiert ist (postuliert von de Broglie, 1924). Damit könnten Elektronenmikroskope theoretisch eine Auflösung von 0,004 nm erreichen. In diesem Fall limitiert aber der Fehler der elektromagnetischen Linse die Auflösung. Mit modernen Elektronenmikroskopen ist zurzeit eine Auflösung von 0,1 bis 0,5 nm möglich, die allerdings durch die Art der Präparation noch einmal eingeschränkt werden kann (0,3 bis 3 nm). Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von Elektronenmikroskopie: die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM oder SEM). Bei beiden Techniken wird ein Elektronenstrahl von einer Kathode mittels elektromagnetischer Linsen konzentriert auf eine zuvor präparierte Probe gelenkt. Um eine unkontrollierte Ablenkung des Strahls zu verhindern und um gleichzeitig dessen Geschwindigkeit zu erhöhen, wird innerhalb des Mikroskops ein starkes Vakuum erzeugt. Daher muss die eingebrachte Probe zuvor vollständig entwässert werden. Die Rasterelektronenmikroskopie tastet die Oberfläche des Objektes ab und abgelenkte Elektronen werden von einem Detektor aufgefangen und zu einem Bild verrechnet. Da die hochenergetischen Elektronen ein organisches Objekt sofort zerstören würden, wird die Oberfläche des Objektes zuvor nach der vollständigen Entwässerung und Trocknung mit einer dünnen Schicht eines Schwermetalls oder Kohle bedampft. Diese Schicht leitet absorbierte Strahlung schnell ab und streut gleichzeitig die abprallenden Elektronen besser, wodurch das erzeugte Bild eine höhere Auflösung erhält.

In der TEM durchstößt der Elektronenstrahl das zu untersuchende Objekt. Daher muss dieses in einem vorherigen Präparationsschritt in einem Harz oder Kunststoff eingebettet und in Ultradünnschnitte zerteilt worden sein. Eine zusätzliche Kontrastierung mit Schwermetallsalzen wie Uranylacetat, Bleicitrat oder Osmiumtetroxid erhöht die Ablenkung der durchdringenden Elektronen und ermöglicht so detaillierte Bilder des Objekts. Durch den

Einsatz von spezifischen Antikörpern, gebunden an Schwermetalle wie Gold, können gezielt Strukturen wie zum Beispiel Ribosomen oder besondere Proteine sichtbar gemacht werden. Um filigrane Außenstrukturen zu zeigen, werden getrocknete Zellen schräg mit Platin bedampft. Der im Bild sichtbare Schattenwurf kann so einen Eindruck von Zellanhängseln und Zellformen vermitteln. Für einen dreidimensionalen Eindruck der Zelle können gefriergetrocknete Zellen im Vakuum mit einem Messer gebrochen werden. Die zufällig erhaltenen Oberflächen werden mit einem dünnen Metallfilm bedampft und die verbleibende organische Materie wird verätzt. Ein Abdruck der Bruchstelle bleibt dann erhalten, der im TEM bildlich dargestellt werden kann.

In der Elektronenmikroskopie gibt es weitere Erneuerungen, die eine noch höhere Auflösung ermöglichen und teilweise dreidimensionale Zellstrukturen sichtbar machen. Mittels Elektronen-Tomographie kann die Lage von Membranen und subzellulären Strukturen genauer beobachtet werden und detaillierte Aussagen über Zellprozesse werden möglich (Niftrik et al., 2008). Junglas und Kollegen zeigten mit seriellen Schnitten gefriersubstituierter Zellen von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* unter Anwendung von Elektronen-Kryotomographie direkte Zell-Zell-Kontakte in einer dreidimensionalen Rekonstruktion (Junglas et al., 2008). Computer-gestützte Auswertungen digitaler Bilder erhöhen die Möglichkeiten in der Elektronenmikroskopie und verbessern die Aussagekraft.

8. Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war in der *Planctomyceten* Gattung *Rhodopirellula* sp. nur eine Art bekannt, *Rhodopirellula baltica*. Von dieser Art waren mehrere Isolate aus Gewässern der Kieler Bucht sowie aus dem Gewebe des Mittelmeerschwamms *Aplysina aerophoba* bekannt und in der Literatur beschrieben. Das weitere Vorkommen der Art in verschiedenen Gewässern wurde mittels Klonbanken und FISH-Studien (Fluoreszenz-in-situ-hybridization) nachgewiesen.

Ziel der Arbeit war es, neue Stämme aus möglichst vielen verschiedenen europäischen marinen Wasserproben zu isolieren und an ihnen die Biogeographie eines anheftenden Bakteriums zu erforschen. Dazu sollten verschiedene molekulare Fingerprintmethoden für eine intraspezies-spezifische Analyse dieser Spezies angewandt werden. Eine eindeutige Identifizierung der Stämme sollte mittels vollständiger 16S rRNA Gensequenzierung sowie DNA-DNA-Hybridisierung und weiterer phylogenetischer Untersuchungen erfolgen. Aufgrund der charakteristischen intrazellulären Kompartimentierung der *Planctomyceten* sollten elektronenmikroskopische Versuche am Typstamm sowie an den Neuisolaten erfolgen um bereits bekannte Strukturen zu bestätigen und eventuell neue Erkenntnisse über Funktion und Aufbau der *Planctomyceten*-Zelle zu erlangen. Zudem sollte überprüft werden, ob sich genotypische Unterschiede auch im Phänotyp widerspiegeln. Die einzelnen Ergebnisse sollten in einen Gesamtkontext gestellt werden um so unter in Bezugnahme der Umweltbedingungen eine Aussage über die Biogeographie von *R. baltica* in europäischen Gewässern treffen zu können. Besitzt *R. baltica* als assoziiertes heterotrophes Bakterium eine Biogeographie und ist eine eventuelle Varianz durch Strömungen oder weitere Transportmechanismen zu erklären? Oder aber trifft Baas-Beckings Hypothese uneingeschränkt zu? Prinzipiell stellt sich auch die Frage nach weiteren Spezies dieser Gattung in europäischen Gewässern. Ist *R. baltica* endemisch für Europa oder ist diese Spezies global anzutreffen? Gibt es ein spezifisches Markergen, das für einen schnellen und korrekten Nachweis in Umweltproben angewandt werden kann? Eine Beantwortung dieser Fragestellungen sollte neue Erkenntnisse über assoziierte Bakterien bringen.

B Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit im Gesamtzusammenhang dargestellt und es wird im Einzelnen auf Abbildungen und Tabellen in den angehängten Publikationen verwiesen. Material und Methoden sowie spezielle Details können den Publikationen entnommen werden.

1. Probennahme und vorliegende Umweltbedingungen

Im Rahmen des vom europäischen FP6 geförderten „Network of Excellence“ MarBEF (Marine Biodiversity and Ecosystem Functioning) sollte die Biogeographie eines marinen Bakteriums untersucht werden. Dazu wurde die *Planctomyceten*-Spezies *Rhodopirellula baltica* ausgewählt, da zu Beginn dieser Studie nur eine einzige Art dieser Gattung bekannt war und außerdem das Genom vollständig sequenziert vorlag. Da bisherige Isolierungen aus küstennahen marinen Proben erfolgt waren, wurden Mitarbeiter des Instituts, Freunde und Mitglieder von MarBEF gebeten, Wasser-, Sediment- und Planktonproben an europäischen Küsten zu sammeln und nach Bremen zu schicken. Zudem erfolgte eine eigenständige Probennahme im März 2005 in Porto, Portugal, sowie im Mai 2006 in San Cataldo und Porto Cesareo in Italien. Die Proben wurden beim Eintreffen in Bremen katalogisiert und kühl gelagert. Eine Aufbereitung und Animpfung der Proben erfolgte wie in Manuskript 1 beschrieben. Insgesamt wurden 130 verschiedene Proben sowie zusätzliche Unterproben aus Europa, Asien, Afrika und Südamerika bearbeitet. Die Probennahme erfolgte von Februar 2005 bis Januar 2008. Probe NW10 stammte aus einer im Labor vorhandenen Probe eines Schlammvulkans in Rumänien und befand sich bereits seit 2004 in Bremen (Alain et al., 2005). Die Art der Proben unterschied sich in ihrer Zusammensetzung: neben 69 reinen Wasserproben und 39 Sedimentproben (feucht), wurden auch 11 gemischte Proben, 8 Planktonnetz-Proben sowie 3 Proben von Wasser und Algen (gemischt) erhalten. Umweltparameter wurden nur in wenigen Fällen mit der Probe übermittelt. Daher konnten entsprechende Werte teilweise nur mit der World Ocean Atlas Software intrapoliert werden (Siehe Publikation 1). Ein Vergleich der gemessenen Umweltdaten einer Schiffspassage in der Ostsee sowie einer Probennahme auf Sylt in der Nordsee zeigt eine gute Übereinstimmung der intrapolierten und realen Werte. Die Temperaturen reichten von $-0,4^{\circ}\text{C}$ in den Gewässern um Spitzbergen bis zu $28,9^{\circ}\text{C}$ an der afrikanischen Küste in Dar es Salaam. Der Großteil der Proben wurde allerdings bei moderaten Temperaturen genommen. Die maximale Wachstumstemperatur von *R. baltica* von 32°C wurde an keinem Ort überschritten. Wachstumsversuche mit *R. baltica* zeigten eine Salztoleranz von 4,14 bis 69 PSU (Schlesner et al., 2004). Die Salinität der Proben betrug minimal 6,9 PSU und maximal

40,7 PSU für marine Proben. Es wurden aber auch Wasserproben aus israelischen Salzseen untersucht, die eine Salinität an der Sättigungsgrenze aufwiesen (bis 359 PSU), sowie drei Frischwasserproben aus der Donau.

2. Isolierung der neuen Stämme

Die ersten 59 erhaltenen Proben wurden auf selektivem Medium mit Ampicillinzusatz ausgestrichen und inkubiert. Das Antibiotikum Ampicillin verhindert die Bildung der bakteriellen Zellwand durch Blockierung der D-Alanin-Transpeptidase, welche das Peptidoglycan der Zellwand quervernetzt. Da *Planctomyces* kein Peptidoglycan in ihrer Zellwand besitzen, kann ihnen ein solches β -Lactam-Antibiotikum keinen Schaden zufügen. Drei verschiedene Zusammensetzungen der Medien wurden gewählt: PLA-rich, PLA-BW und PLA-NAcGI. Die Medien unterscheiden sich in Salinität, Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. PLA-rich und PLA-BW sind reichhaltige Medien mit Pepton, Hefeextrakt und Glucose als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. PLA-BW enthält allerdings nur die Hälfte an Salzen und ahmt so Brackwasserbedingungen nach. PLA-NAcGI enthält N-Acetylglucosamin als einzige Quelle für Stickstoff und Kohlenstoff, welches *R. baltica* nutzen kann. Zur Kontrolle wurde auch das in der Stammbeschreibung publizierte Medium M13a benutzt. Alle Medien enthielten neben Ampicillin auch Cycloheximid zur Unterdrückung von Pilzwachstum.

Durchschnittlich wurden auf Platten mit reichhaltigem Medium 10365 Kolonien pro ml Probe nach 4 Wochen Inkubation gebildet. Platten mit N-Acetylglucosamin als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zeigten hingegen nur eine durchschnittliche Kolonienzahl von 1018 cfu pro ml Probe. Dieses Ergebnis zeigt die höhere Selektivität von PLA-NAcGI. Die Art der Probe zeigte ebenfalls Einfluss auf die Kolonienzahl. Sediment-freie Wasserproben erbrachten im Gegensatz zu Sediment-haltigen Proben wesentlich weniger Kolonienformende Einheiten (cfu) pro ml Probe. Daraus kann geschlossen werden, dass Ampicillin-resistente Bakterien in höherer Zahl an Sediment assoziiert sind, wo auch mehr Prokaryoten nachgewiesen worden sind. Eine Studie von Whitman (1998) zählte 5×10^5 prokaryotische Zellen pro Milliliter marines Wasser des Kontinentalschelfs und $4,6 \times 10^8$ Zellen in marinem Sediment.

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 4 Wochen bei 24 °C wurden rötliche Kolonien auf neue Platten mit PLA-NAcGI überführt und mittels Zwölf-Ösenausstrich aufgereinigt. Eine PCR mit *R. baltica* spezifischen Primern für das 16S rRNA-Gen wurde angewandt um potentielle neue Stämme schnell identifizieren zu können. Die entsprechenden Primersequenzen für Pir197F und Pla905R wurden den Sequenzen von spezifischen FISH-Primern entnommen (siehe Manuskript 1 und Diplomarbeit). Aus mehr als

10000 Kolonien wurden 917 aufgrund ihrer Färbung ausgewählt und transferiert. 875 dieser Kolonien wuchsen auf dem selektiveren Medium an und wurden mittels der Screening-PCR untersucht. Davon zeigten nur sechs ein positives Ergebnis in der PCR, wovon drei nach Teil-Sequenzierung des 16S rRNA-Gens falsch positiv waren. Eine Untersuchung der Haltbarkeit von Ampicillin auf Platten wurde unter Isolationsbedingungen durchgeführt. Dabei zeigten Platten mit Ampicillin nach einer Lagerung von 10 Tagen bei Raumtemperatur und 20 Tagen bei 4 °C vor Inokulation keinen inhibitorischen Effekt mehr. Aufgrund dieser geringen Stabilität von Ampicillin kann von einem schwachen Effekt auf langsam wachsende Bakterien ausgegangen werden.

Mit dieser Methode konnten insgesamt vier neue Stämme von *Rhodopirellula* sp. isoliert werden. Aufgrund der geringen Effizienz wurde diese Methode aber verworfen.

Ein anderer Ansatz mit einem 96-Pin-Transferstempel für Klonbanken sollte einen hohen Durchsatz an Proben ermöglichen. Statistisch überträgt jeder Stift dieses Stempels 1 µl Flüssigkeit beim Transfer. Daher wurden Proben mit sterilem künstlichem Meerwasser (ASW) verdünnt und mittels des Stempels auf große Platten (150 mm Durchmesser) übertragen. Mehrere verschiedene Proben wurden so behandelt und es erfolgte ein Koloniewachstum von ca. 60 %. Allerdings zeigte keine dieser Kolonien ein positives Ergebnis in der Screening-PCR und kein Isolat von *Rhodopirellula* sp. konnte gewonnen werden. Vermutlich liegt dieses Ergebnis darin begründet, dass an den Metallstiften des Stempels nur Flüssigkeit haften bleibt, jedoch nicht genügend festes Material wie Sedimentpartikel. Ein Volumen von 1 µl Sediment-freien Wasser ist demnach nicht ausreichend für die Isolation von *R. baltica*. Da die Anreicherung derselben Proben mit einer anderen Methode teilweise Isolate erbrachte, kann davon ausgegangen werden, dass der Fehler in der Methode lag.

R. baltica ist auch gegen weitere Antibiotika resistent. Daher wurden in einer weiteren Isolationsstrategie die Antibiotika Streptomycin und Cycloserin verwendet. Cycloserin inhibiert die Alanin-Racemase und die D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase, zwei Enzyme zur Zellwand-Synthese (Curtiss et al., 1965). Streptomycin hingegen hemmt die kleine 30S Untereinheit der 70S Ribosomen und stört damit die Translation (Modolell und Davis, 1969). Beide Antibiotika wurden in Kombination mit dem selektiven PLA-NAcGI Medium eingesetzt und reduzierten die Anzahl an Kolonien-bildenden Einheiten mit 100 µl Inokulum auf 1 bis 69 Kolonien pro Platte. Im Durchschnitt wurden 262 cfu pro ml Probe mit Cycloserin und 107 cfu pro ml Probe mit Streptomycin erhalten. Eine Kombination beider Antibiotika brachte insgesamt sogar nur 25 Kolonien. Davon gehörten nach Sequenzierung des 16S rRNA-Gens 8 der Gattung *Rhodopirellula* an. Mit Cycloserin inkubierte Proben ergaben insgesamt 25 neue Isolate (von 145 untersuchten Stämmen) der Gattung *Rhodopirellula*, mit Streptomycin 33 neue Stämme (von insgesamt 54 untersuchten). Auffällig bei der weiteren Untersuchung

der Stämme war eine klebrige Konsistenz der mit Streptomycin isolierten Kolonien auf festem Medium. Zudem zeigten die Stämme eine geringere Zugänglichkeit der DNA mit gängigen Isolationsmethoden. Auch PCR-Ansätze mit Kultur als direktes Template zeigten bei Streptomycin isolierten Stämmen eine geringere Ausbeute als solche mit Cycloserin. Trotz der höheren Effizienz von Streptomycin in der Isolation wird daher die Verwendung von Cycloserin empfohlen. Die höchste Anzahl an *Rhodopirellula baltica*-ähnlichen Kolonien auf einer Platte mit 100 µl Inokulum waren 12 Kolonien mit Cycloserin von Probe NW104 aus Porto Cesareo, Italien. Die verschiedenen unabhängigen Kolonien wurden CS65 bis CS72, CS108 bis CS110 und CS126 genannt.

Nach der Inokulierung von 130 verschiedenen Proben mit zwei unterschiedlichen erfolgreichen Methoden wurden insgesamt 70 verschiedene neue Stämme des Planctomycetengenus *Rhodopirellula* aus 19 Proben isoliert, darunter auch Proben aus Tansania und von den Philippinen. Bis auf zwei Stämme, K249 und K587, wurden alle Stämme auf Medium mit N-Acetylglucosamin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle isoliert. K249 und K587 hingegen wurden auf PLA-rich Medium isoliert, danach aber weiter auf PLA-NAcGI kultiviert. Die europäischen Isolate stammen aus Island bis Griechenland und die Proben wiesen Salinitäten von 21 bis 38 PSU und in situ Wassertemperaturen von 5,2 °C bis 21 °C auf. Obwohl sowohl die Inkubationstemperaturen als auch die Salinitäten den Umweltbedingungen der Probenstandorte teilweise angepasst wurden, führte dieses nicht zu Unterschieden in der Isolationseffizienz. Die vorläufige Identifizierung erfolgte mittels Teilsequenzierung des 16S rRNA-Gens sowie morphologischer Untersuchungen. Die Neuisolate zeigten auf festem Medium rosé bis rote Kolonien (siehe Abb. 5). In der Phasenkontrastmikroskopie sind runde bis birnenförmige Zellen, teilweise auch länglich, zu erkennen, die sich zu typischen Rosetten zusammenfinden (siehe Manuskript 1). Zudem kann Knospung am breiteren Zellpol beobachtet werden und kleinere Zellen, die beweglich sind. Die Zellgröße variiert zwischen 1,0 – 1,5 µm und 2,0 – 3,0 µm. Bei Zellen in der stationären Phase, gewachsen auf festem Medium, können im Phasenkontrastmikroskop bereits intrazelluläre Strukturen erkannt werden (siehe Manuskript 1). Zur weiteren Kultivierung hat sich die Nutzung des Mediums M13a für Flüssigkulturen und PLA-NAcGI für Platten bewährt.

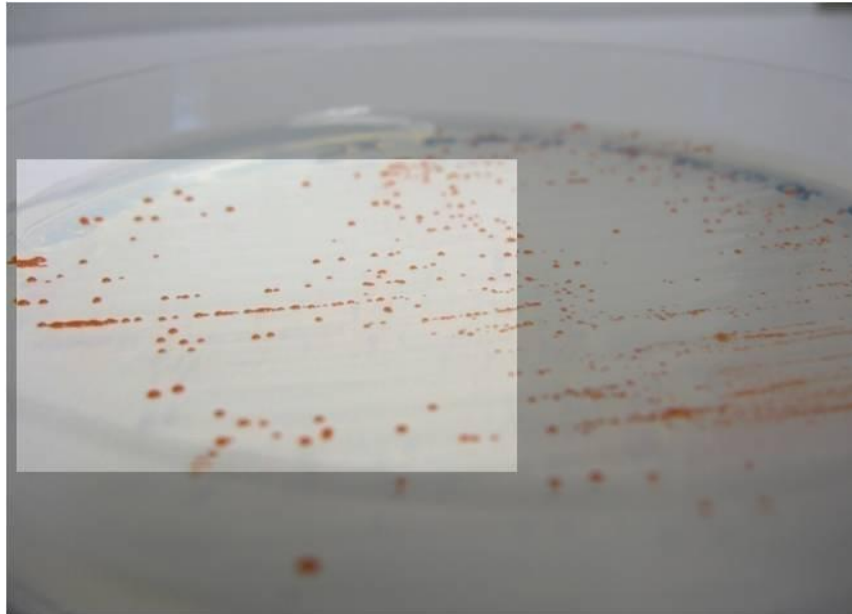


Abbildung 5: Stamm 7C auf PLA-NAcGI-Medium

3. Phylogenetische Untersuchungen der Neuisolate

Die Identifizierung erfolgte hauptsächlich anhand der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. Um diese vollständig zu erhalten wurden neue Primer außerhalb des Gens erstellt. Da bereits das gesamte Genom von *Rhodopirellula baltica* sequenziert ist (Glöckner et al., 2003), konnte anhand von 100 bp langen Stücken vor und hinter dem Gen die Primer Rb-114 ((-98)-(-80)F) und Rb+206 ((+83)-(+59)R) designt werden. Diese werden jeweils mit zwei Primern innerhalb des Gens kombiniert (Rb771 und Rb560). Somit kann in Kombination mit den Screening-Primern das gesamte Gen sowie kurze Bereiche davor und danach ermittelt werden. Klassische Analysen verwenden die Primerkombination von GM3 long (8-27F) und GM4 (1507-1492R) (siehe Manuskript 1). Da *R. baltica* im Bereich des Forward-Primers GM3 long aber einen Mismatch aufweist, ist eine PCR nicht immer erfolgreich. Von 70 neuen Isolaten konnten von 69 Isolaten das 16S rRNA-Gen vollständig sequenziert werden. Nur SM51 liegt bisher nur in Teilsequenzen vor, die laut BLAST-Analyse aber ebenfalls als nächsten Verwandten *R. baltica* aufweisen (89 %). Alle anderen Isolate zeigen eine Übereinstimmung mit dem 16S rRNA-Gen des Typstamms *R. baltica* SH1 von mindestens 93,6 bis zu 100 %. Nach dem alten Kriterium zur Definition einer Spezies mit einer Grenze für Stämme innerhalb einer Art von 97 % repräsentieren die neuen Isolate so vermutlich 6 verschiedene Spezies (Stackebrandt et al., 2002). Nach der neuen Definition von 2006 (Stackebrandt & Ebers) wurde diese Grenze auf 98,7 % angehoben. Damit wären in der Stammsammlung mindestens 10 verschiedene Spezies vorhanden. Eine vergleichende

Studie aller bisher in Datenbanken veröffentlichten 16S rRNA-Gensequenzen von Yarza und Kollegen (2008) ermittelte eine statistische Identität von 96,4 % im Durchschnitt für verschiedene Spezies innerhalb einer Gattung. Die Grenze für Familie wurde in dieser Studie auf 90,1 % gesetzt. Demnach gehören alle neuen Isolate mit Sicherheit derselben Familie an, innerhalb der Fehlergrenzen 67 zur Gattung *Rhodopirellula* und 44 zur Spezies *Rhodopirellula baltica*, unter dem Vorbehalt weiterer Untersuchungsmethoden.

Neben den Neuisolaten wurden auch 11 weitere Stämme aus einer Stammsammlung von *R. baltica*, isoliert aus Wasser der Kieler Bucht, in die phylogenetische Untersuchung mit eingeschlossen. Diese Stämme wurden 2004 (Schlesner et al., 2004) mittels DNA-DNA-Hybridisierung als *R. baltica* identifiziert. Ihre 16S rRNA-Gensequenz lag aber bisher noch nicht vor. Gleichzeitig wurden diese Stämme auch gemeinsam mit dem Typstamm SH1 zur Etablierung von Fingerprintmethoden und MLSA genutzt. Bis auf Stamm SH155 weisen alle Stämme eine Übereinstimmung von mindestens 99,6 % auf. Stamm SH155 hingegen zeigt 2,3 % Divergenz zum Gen des Typstamms auf. Damit liegt die Identität unterhalb der Grenze von 98,7 % für eine Spezies. Auch in der Screening-PCR weist dieser Stamm Besonderheiten auf. Aufgrund von drei Mismatches im Bindebereich des Forward-Primers Pir197F zeigt SH155 in der Screening-PCR kein positives Produkt. Diese Mismatches weisen auch mehrere Sequenzen von Stämmen aus Portugal auf, die in GenBank hinterlegt sind. Demnach scheint die Screening-PCR für die Gattung zu spezifisch zu sein. Eventuell ist dadurch die Isolierung weiterer Stämme im Rahmen dieser Arbeit verhindert worden.

Alle vollständigen 16S rRNA-Gensequenzen wurden in die Software ARB importiert und in die Datenbank SILVA (release SSURef_96, 04.10.2008) align (Ludwig et al., 2004; Pruesse et al., 2007). Das erhaltene Alignment wurde zur Berechnung von phylogenetischen Bäumen genutzt. Dazu wurden verschiedene Methoden genutzt; neben der Distance Matrix Methode Neighbour Joining mit verschiedenen Filtern und Bootstrapping auch die Maximum Likelihood Methoden RaxML, AxML, FastdnaML und PhymI. Mit einem verwendeten Filter von 50 % zeigten die Berechnungen stabile Verzweigungen. In Manuskript 1 ist ein phylogenetischer Baum, berechnet mit RAXML, abgebildet. Anammoxbakterien dienten bei der Berechnung als Outgroup. Der Baum zeigt noch einmal die große Ähnlichkeit der Neuisolate sowie ihre nahe Verwandtschaft zum Typstamm *R. baltica* SH1. Anhand der 16S Phylogenie können mit diesem Baum mindestens 7 verschiedene Gruppen gebildet werden, die eventuell neuen Spezies zuzuordnen sind. Dieses muss sich aber zunächst mit anderen Methoden in einem polyphasischen Ansatz bestätigen.

4. Genomanalyse

Im Rahmen einer gültigen Speziesbeschreibung müssen neben der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens auch weitere Teile des Genoms untersucht werden. Zu den klassischen Untersuchungsmethoden gehört die Bestimmung des G+C Gehalts in mol%, das bedeutet den Anteil der Basen Guanin und Cytosin am gesamten Genom. Außerdem muss zur genauen Abgrenzung von anderen Spezies eine DNA-DNA-Hybridisierung des gesamten Genoms erfolgen. Beides wurde mit Teilen der neuen Stammsammlung durchgeführt.

4.1 G+C-Gehalt

Die Bestimmung des G+C-Gehalts in mol% dient der Abgrenzung zweier Arten. Ein gleicher oder ähnlicher G+C-Gehalt kann nicht als Nachweis einer Verwandtschaft dienen, ein Abweichen um mehr als 5 % zeigt dagegen eine klare Abgrenzung. Prokaryoten weisen Werte von 20 bis 78 mol% auf. Aufgrund der Vielzahl von Arten kann somit ein spezifischer G+C-Gehalt von vielen unterschiedlichen Arten geteilt werden. Für *Rhodopirellula baltica* wurde in der Literatur ein Wert von 53 bis 57 mol% berichtet, wobei der Typstamm 55 mol% besitzt (Schlesner et al., 2004). Andere *Planctomyceten* wie *Gemmata obscuriglobus* weisen wesentlich höhere Werte auf (64 mol%).

$$\text{G+C-Gehalt (mol\%)} = 100 (G + C) / (A + T + G + C)$$

Der G+C-Gehalt wird außerdem für weitere Untersuchungsmethoden benötigt um zum Beispiel in der DNA-DNA-Hybridisierung die korrekte Hybridisierungstemperatur ermitteln zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von 22 verschiedenen *Rhodopirellula*-Stämmen der G+C-Gehalt bestimmt. Dazu wurden von jedem Stamm eine großvolumige Kultur (300 ml) angezogen und zu Beginn der stationären Phase mittels Zentrifugation geerntet. Nach DNA-Isolierung und definierter Stückelung wurden von jedem Stamm mehrere Schmelzkurven in einem thermal gesteuerten Photometer erstellt. Der Mittelwert der erhaltenen Werte wurde mit den Literaturwerten abgeglichen.

Tabelle 1: Tabelle mit G+C-Gehalt bekannter Stämme und einiger Neuisolate (in mol%)

Analysierte Stämme	Messungen von W. Serrano	Standardabweichung +/-	Werte aus Schlesner et al., 2004
RB SH1 ^T	54,9	1,5	55
SH126	55,4	0,7	nd
SH155	56,5	0,2	55
SH198	54,5	1,5	nd
SH386	55,4	1,0	nd
SH398	53,7	1,1	55
2S	55,2	1,3	
4S	54,8	1,6	
6C	55,2	0,5	
1SC	55,6	0,5	
3SC	54,7	1,6	
4SC	54,4	1,2	
CS7	55,6	0,7	
CS8	53,9	0,7	
CS11	54,5	0,5	
CS68	56,3	1,1	
CS70	55,4	1,0	
CS96	55,7	0,3	
SM38	55,0	0,5	
SM41	54,5	0,3	
K833	56,5	0,9	
K1070	55,0	0,1	

nd = not determined, nicht bestimmt

Die gemessenen Werte des Typstamms RB SH1 stimmen mit den Literaturwerten fast genau überein. Und auch die anderen SH-Stämme kommen den Literaturwerten innerhalb der Fehlergrenzen sehr nah. Daher scheint die Methode anwendbar und die Ergebnisse können mit anderen Literaturwerten verglichen werden. Alle Neuisolate zeigen G+C-Gehalt Werte von 53,6 bis 56,5 mol% und liegen damit alle innerhalb der Speziesgrenzen. Anhand der G+C-Werte kann also keine Art-Abgrenzung erfolgen. Dafür müssen weitere Methoden angewandt werden.

4.2 DNA-DNA-Hybridisierung

Zur genaueren Analyse der Neuisolate wurden aus 16 Stämmen, zwei *Rhodopirellula baltica* Stämme aus der Kieler Bucht und 14 Neuisolate aus ganz Europa, genomische DNA in

hohen Konzentrationen und großer Reinheit isoliert und für DNA-DNA-Hybridisierungen ins Institut IMEDEA (Institut Mediterrani d'Estudis Avançats) in Esporles auf Mallorca, Spanien, befördert. Dort erfolgte eine Präparation der DNA nach Ziemke (beschrieben in Manuskript 2). Die DNA von vier verschiedenen Stämmen wurde markiert und mit einzelsträngiger DNA derselben und von anderen Stämmen hybridisiert. Nach Auftrennung von noch einzelsträngiger DNA und doppelsträngiger DNA konnte der Anteil an Heteroduplexen mittels einer enzymatischen Reaktion kolorimetrisch bestimmt werden. Dabei musste aber stets ein Abgleich mit den Homoduplexen der markierten DNA erfolgen. So ließ sich ein Prozentsatz ermitteln, der aussagt, wie viel der markierten DNA sich mit der entsprechenden „fremden“ hybridisieren lässt. In der Literatur wird ein Grenzwert von 70 % für die Speziesbeschreibung angegeben (Stackebrandt et al., 2002). Dieser Wert stellt allerdings keine unumstößliche Grenze da, sondern ist eher als Richtwert zu verstehen. So lassen sich dann auch die Ergebnisse in Tabelle 2 von Manuskript 2 wie folgt interpretieren.

Zunächst wurde DNA des Typstamms SH1 markiert und mit der eigenen DNA sowie mit 13 anderen DNA hybridisiert. Der Stamm SH126 aus der Kieler Stammsammlung zeigte dabei eine Hybridisierung von 99,3 % und spiegelte so die Aussage aus der Stammbeschreibung wieder (Schlesner et al., 2004), auch wenn die DNA-DNA-Hybridisierung hier mit einer anderen Methode erfolgte. Alle anderen Werte blieben deutlich unterhalb der Grenze von 70 % und zeigten höchstens 63,8 % Hybridisierung mit der markierten DNA von SH1. Dieses Ergebnis legt den Verdacht nahe, dass es sich bei den untersuchten Neuisolaten nicht um Stämme der Spezies *Rhodospirellula baltica* handelt, obwohl 16S rRNA-Genanalyse dieses zumindest in einigen Fällen nicht ausgeschlossen hat. Um die Nicht-*R. baltica* Stämme weiter einzugrenzen wurden nun die DNA von drei von ihnen markiert und mit allen anderen DNA hybridisiert. Anhand der Ergebnisse konnte eine Gruppierung erfolgen. Der Stamm CS96 aus San Cataldo, Italien, hybridisierte außer mit sich selbst nur mit dem Stamm SM41, ebenfalls aus San Cataldo, zu mehr als 70 %. Alle anderen Stämme hybridisierten zu weniger als 62 %. Damit bilden die beiden Stämme eine Gruppe, die OTU C (operational taxonomic unit) genannt wurde. Stamm CS11 von der holländischen Nordseeküste und Stamm 6C aus Porto Cesareo, Italien, hybridisierten miteinander zu mehr als 82 %. Damit bilden diese beiden markierten Stämme ebenfalls eine Gruppe, die mit weiteren Stämmen zu mehr als 70 % hybridisieren. Zu diesem OTU B gehören neben CS11 und 6C auch CS7, CS8, 3SC, CS115, SM38, CS70, 2S, 1SC und 4SC, wobei die 5 zuletzt genannten nur mit Stamm 6C zu mehr als 70 % hybridisieren. Interessanterweise hybridisiert die markierte DNA von CS11 und 6C nun auch mit der DNA des *R. baltica* Typstamms SH1 zu mehr als 77 %. Das zeigt, dass diese Stämme zumindest nah miteinander verwandt sind. Da bei Markierung der Typstamm-DNA allerdings nur 55 bzw. 61 % Hybridisierung erreicht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich trotzdem um zwei verschiedene Spezies handelt, die

eventuell unterschiedliche Genomgrößen besitzen, daher verschiedene Hybridisierungswerte erbringen. Die Gruppe um den Typstamm SH1 wird im weiteren Verlauf der Arbeit als OTU A bezeichnet. Ein einzelner Stamm ließ sich nicht mit den mitgeführten Stämmen in ausreichenden Maßen hybridisieren. Stamm SM1 von Mallorca zeigte mit keiner markierten DNA einen höheren Wert als 56,9 %. Damit konnte zu diesem Zeitpunkt keine weitere Aussage über den Stamm getroffen werden und er bildete alleine OTU D. Die Standardabweichung war in allen Versuchen nicht höher als ein Prozentpunkt und zeigte damit eine relativ konstante Methode an.

Insgesamt bestätigte die DNA-DNA-Hybridisierung die Existenz verschiedener *Rhodopirellula*-Spezies in unserer Stammsammlung und konnte damit die zuvor in der Analyse der 16S rRNA getroffene Aussage unterstützen. Um allerdings alle Stämme mit einzubeziehen, muss eine Technik angewandt werden, die mit weniger Aufwand dieselbe Aussagekraft hat.

5. Einteilung der Stämme in verschiedene OTUs

5.1 Multilocus Sequencing Analysis (MLSA)

Um genauere Aussagen über die Zusammensetzung der *Rhodopirellula*-Stammsammlung treffen zu können, wurden Primer für eine Multilocus Sequenz Analyse erstellt. Die Auswahl der zu untersuchenden Gene sowie das Design der ersten Primer erfolgte in der Bachelorarbeit von Ulrike Jaekel. Insgesamt neun verschiedene Haushaltsgene wurden dazu ausgewählt. Diese Gene kommen jeweils nur einmal im Genom vor und liegen verteilt auf dem gesamten Chromosom, damit keine direkte Beeinflussung der Gene aufeinander erfolgen kann. Zudem lag keines der Gene im Inversionsbereich des Genoms zwischen 0,0 und 0,4 Mbp. Die Primersequenzen mussten für *Rhodopirellula baltica* hoch spezifisch sein, was mittels BLAST überprüft wurde. Folgende neun Gene wurden für die MLSA ausgewählt: *acsA* (*Acetyl Coenzyme A Synthetase*), *guaA* (*GMP-Synthetase*), *trpE* (*Anthranilate Synthase Komponente 1*), *purH* (*Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamidase*), *glpF* (*Glycerol Facilitator Uptake Protein*), *fumC* (*Fumarate Hydratase*), *icd* (*Isocitrate Dehydrogenase*), *glyA* (*Serine Hydroxymethyltransferase*) und *mdh* (*Malate Dehydrogenase*). Für einige Gene wurden mehrere Primerpaare erstellt. Im Rahmen der Bachelorarbeit wurde zudem die Anwendbarkeit der entwickelten MLSA an *R. baltica* Stämmen der Kieler Stammsammlung getestet und die optimalen PCR-Bedingungen wurden ermittelt. Die Sequenzen der einzelnen Stämme zeigten bereits innerhalb der Spezies große

Unterschiede und phylogenetische Berechnungen der einzelnen Gene ergaben wiederkehrende Muster und Clusterbildung von Stämmen untereinander. Die Stämme SH26 und SH28 zeigten in allen Genen sehr ähnliche Sequenzen, während andere Stämme wie SH386 und SH398 fast immer mindestens 3 % Divergenz zur ermittelten Sequenz von *R. baltica* SH1 aufwiesen. Stamm SH155, der bereits in der Analyse des 16S rRNA-Gens Unterschiede aufzeigte, war dagegen nur bedingt mit den entwickelten Primern zu amplifizieren und erhaltene Sequenzen zeigten eine hohe Varianz zu allen anderen auf.

Nach erfolgreicher Etablierung der MLSA am Typstamm SH1 und weiteren Stämmen derselben Spezies konnte die Methode an den Neuisolaten getestet werden. Dabei zeigte sich, dass nicht alle Gene mit der gleichen Effizienz in der PCR amplifiziert werden können und dass sich auch die genetische Erreichbarkeit der einzelnen Isolate voneinander unterscheidet. Durch Variationen in der DNA-Isolierung, direkte Verwendung der Zellsuspension als Template, sowie Konzentrationsänderungen der einzelnen Komponenten konnte keine Verbesserung der Effizienz erreicht werden. Daher wurde mit den bisher erhaltenen Sequenzen für jedes Gen ein Alignment erstellt und neue Primer wurden in konservierten Regionen der Gene designt. Mit einer Kombination der verschiedenen Primer konnte ein Großteil der Stämme in Gruppe A und B erfolgreich sequenziert werden (Einteilung nach DNA-DNA-Hybridisierung). Die Gruppen C und D zeigten in nur 50 % der Gene eine Anwendbarkeit der erstellten Primer. Für die Gene *acsA*, *glyA* und *purH* in Gruppe C brachte die PCR auch je ein Amplicon hervor. Dieses zeigte aber eine vollkommen andere Sequenz als die erwartete. Die Primer haben in diesen Fällen ein anderes Gen von *R. baltica* in ähnlicher Größe amplifiziert. Einige Sequenzen, die sowohl von hoher Qualität als auch reproduzierbar waren, konnten mittels BLAST(N) und BLAST(X) keinem bekannten Gen bzw. Protein zugeordnet werden.

Insgesamt konnten 5026 bp in Amplicons der verschiedenen Gene amplifiziert und sequenziert werden. Einzelne Amplicon unterschieden sich in der Länge von 421 bp für *icd* bis zu 724 bp für *acsA*. Die Gene *glpF* (480 bp) und *mdh* (466 bp) konnten mit einem Großteil der untersuchten Stämme in ausreichender Qualität sequenziert werden.

Aus Genomanalysen ist bekannt, dass Stämme innerhalb einer Spezies eine durchschnittliche Nukleotid-Identität (ANI) von mehr als 94 % aufweisen (Konstantinidis & Tiedje, 2005). MLSA Studien an verschiedenen Isolaten von *Ensifer* und verwandten Taxa konnten diesen Wert als Speziesgrenze bestätigen (Martens et al., 2007). In weitergehenden Metagenomanalysen wurde außerdem herausgefunden, dass im Bereich zwischen 90 % und 94 % Identität in der Umwelt eine Unterrepräsentation von Genen vorliegt (Konstantinidis & DeLong, 2008). Demnach bildet der Wert von 94 % eine natürliche Grenze, die für verschiedene Phyla zur Speziesdefinition anwendbar ist.

Da nicht alle Stämme von der MLSA komplett erfasst wurden, erfolgte eine Analyse anhand der Kombination aller erhaltener Sequenzen, sowohl der 16S rRNA Gensequenz wie auch der der Haushaltsgene. Eine besondere Position nahmen dabei die Gene für das Glycerol Facilitator Uptake Protein (glpF) und die Malate Dehydrogenase (mdh) ein, da sie in fast allen untersuchten Stämmen erfolgreich amplifiziert und sequenziert wurden. Daher wurden die beiden Sequenzen in einem Amplicon vereint und so die Stämme mit einander verglichen. Insgesamt konnten 13 verschiedene genetische taxonomische Einheiten definiert werden, die die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierung bestätigten. Daher wurde die Bezeichnung mit OTU fortgesetzt und die Gruppen wurden mit OTU A bis OTU M benannt (siehe Manuskript 2). Innerhalb einer Einheit variierte die Sequenzidentität zwischen 94 % und 100 %. Einzig das Gen *acsA* zeigte eine höhere Variabilität mit 92 % bis 100 %. Zwischen den verschiedenen OTUs wurden jedoch nur Sequenzidentitäten von 77 % bis 94 % erreicht, was der Speziesgrenze von 94 % ANI entspricht. In Stamm CS70 von OTU B zeigte *trpE* eine Verdopplung des Codons CGG für die Aminosäure Arginin, womit die Sequenzlänge des Amplicons von 720 bp auf 723 bp verlängert wurde.

Zur Visualisierung dieser Aufteilung wurden die Amplicons von *glpF* und *mdh* in die Software ARB importiert und dort aligniert. Mittels verschiedener Methoden (Maximum Parsimony, Maximum Likelihood und Neighbour Joining) wurden phylogenetische Bäume berechnet. Aufgrund der nahen Verwandtschaft erfolgten alle phylogenetischen Analysen auf DNA-Ebene, da eine Translation in Proteinsequenz kaum Unterschiede aufzeigte. In Manuskript 2 wird in Abbildung 1 ein ML berechneter Baum dargestellt, der wie alle weiteren berechneten Bäume eine klare Abgrenzung der OTUs A und B von einander und der beiden von anderen OTUs zeigt. Einzig Stamm SWK7, isoliert aus einer schwedischen Probe des Skagerrak, fiel in der MLSA mit den Stämmen des OTU A zusammen, während die Analyse des 16S rRNA-Gens diesen Stamm als separates OTU F definiert hat. Diese Aufteilung scheint daher noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Neben den Stämmen, die die DNA-DNA-Hybridisierung den OTUs zugeordnet hat, konnten mittels MLSA noch weitere Stämme diesen Clustern zugeordnet werden. OTU A besteht laut MLSA nicht nur aus den bereits bekannten SH-Isolaten aus der Kieler Bucht sondern beinhaltet mit den Nordseestämmen WH46 und WH47 sowie dem schwedischen Stamm SWK14 auch Isolate außerhalb dieses geografisch doch sehr begrenzten Gebietes. Damit konnte gezeigt werden, dass die Spezies *Rhodopirellula baltica* auch außerhalb der Kieler Bucht vorkommt (bezogen auf MLSA). Die Isolate aus dem mediterranen Schwamm, die in Schlesner et al. von 2004 beschrieben werden, konnten nicht mit in diese Studie einbezogen werden. Daher kann auch keine Aussage diesbezüglich getroffen werden. Bisher scheinen Mitglieder des OTU A nur in nordeuropäischen Gewässern vorzukommen. In OTU B hingegen vereinigen sich Isolate aus ganz Europa. Neben Stämmen aus verschiedenen Teilen der Nordsee sind auch Isolate aus dem

Mittelmeer in dieser Einheit vertreten. Daher scheint diese Spezies oder Subspezies europaweit vorzukommen. Andere OTUs waren mit nur wenigen oder sogar nur einem Isolat im phylogenetischen Bau vertreten. In diesem Fall kann ein Mutationsereignis zu einer falschen Einordnung im Baum und damit auch zu einer falschen Aussage führen. So zeigen die drei untersuchten Stämme des OTU H, alle isoliert aus einer philippinischen Probe, eine Abtrennung des Stammes SM35 von den anderen beiden, obwohl die Analyse des 16S rRNA-Gens eine hohe Verwandtschaft suggeriert hat. Da in diesem Fall SM35 eine veränderte Sequenz in *mdh* aufweist, liegt ein Mutationsereignis in diesem Gen als Erklärung nah. Die Gene dieser Stämme ließen sich nur in wenigen Fällen mit der entwickelten MLSA analysieren. Um diese Besonderheit zu klären, bedarf es neuer spezifischer Primer für dieses Cluster. Auch innerhalb OTU I mit den Stämmen K249 und K833 kann eine ähnliche Separierung gesehen werden, die in diesem Fall in unterschiedlichen Sequenzen für *glpF* begründet liegen. Alle anderen untersuchten Haushaltsgene zeigen aber eine hohe Ähnlichkeit zwischen den beiden Stämmen, die in Island und Schottland isoliert wurden. Demnach vermittelt die Analyse von nur zwei Genen in diesen Fällen einen falschen Gesamteindruck. Eine höhere Anzahl an Stämmen in den Clustern, sowie die Betrachtung weiterer Gene kann falsche Aussagen verhindern. Sehr deutlich ist aber die Abgrenzung zum Typstamm SH1 und den Stämmen der OTU A, B und F zu beobachten. Somit kann mit einem kombinierten Amplicon für *glpF* und *mdh* eine ungefähre Einordnung von *Planctomyceten* der Gattung *Rhodopirellula* erfolgen.

Aufgrund des nahen verwandtschaftlichen Verhältnisses der OTU A und B erbrachte die MLSA mit fast allen Mitgliedern qualitative ausreichende Amplicons. Neun Stämme des Clusters A inklusive des Typstamms SH1 sowie 18 Stämme von OTU B, dabei alle Isolationsorte repräsentierend, wurden für eine vollständige Analyse ausgewählt und sequenziert. Die Sequenzen wurden auf eine einheitliche Länge gekürzt und in einer definierten Reihenfolge zusammengefügt. Einzelne Gene wurden zur besseren Erkennbarkeit mit dem Buchstaben N getrennt, der in Alignments eine Position ohne weitere Aussage darstellt. Die Gene wurden in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: *acsA*, *fumC*, *glpF*, *glyA*, *guaA*, *icd*, *mdh*, *purH* und *trpE*. Fehlende Sequenzinformation wurde mit einem N angedeutet, während Löcher in der Sequenz von einem "-" gekennzeichnet sind. Stamm J183 konnte nur in 8 verschiedenen Genen sequenziert werden und besitzt somit statt 588 bp für *glyA* nur 588 „N“. Die verknüpften Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 5034 bp wurden in die Software ARB importiert und zum Erstellen eines Alignments sowie zur Berechnung verschiedener phylogenetischer Stammbäume verwendet. Alle unterschiedlichen Berechnungsarten mit ML, MP und NJ zeigten eine klare Auftrennung der beiden OTUs A und B an. Das fragliche OTU F mit dem Stamm SWK7 konnte nicht in diese Analyse eingeschlossen werden, da es nicht in allen Genen ein positives Amplicon

erbracht hat. Obwohl Stamm J183 mit Sequenzinformationen für nur acht Gene in ein Alignment bestehend aus neun Genen eingefügt wurde, ordnete es sich korrekt in OTU B ein und zeigte Abweichungen, die innerhalb der für die Gruppe erreichten Werte lag. Auch die Analyse einzelner Gene dieser beiden Cluster zeigte stets eine Separierung des OTU B vom Typstamm SH1 der Spezies *Rhodopirellula baltica*.

Differenzierung innerhalb einzelner Gene

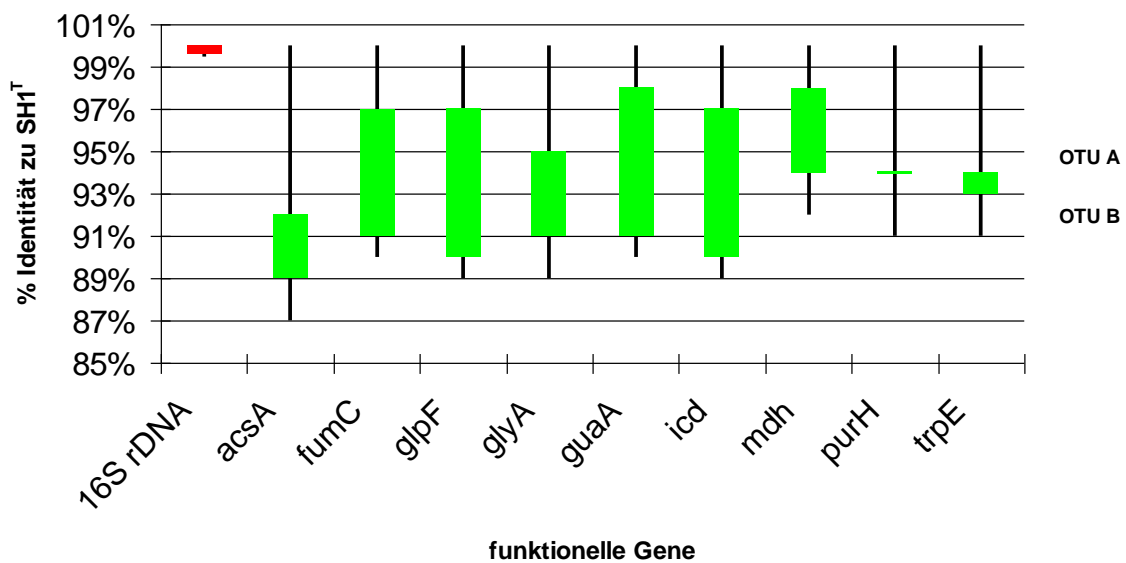


Abbildung 6: Graphik zur Verdeutlichung der Differenzierung zwischen OTU A und B innerhalb der verschiedenen funktionellen Gene, der Balken zeigt den Unterscheidungsbereich, grün zeigt eine mögliche Differenzierung, rot Überschneidungen.

Die entwickelte MLSA ist für *Rhodopirellula baltica* und sehr nah verwandte Stämme gut einsetzbar. Mit größerer phylogenetischer Entfernung sinkt die Effizienz der PCR aber rapide ab und nur wenige Gene sind in anderen OTUs mit den erstellten Primern amplifizierbar. In diesem Fall muss entweder eine Verallgemeinerung der Primer durch Nutzung degenerierter Basen erfolgen oder aber jedes OTU benötigt speziell darauf abgestimmte Primer. MLSA Studien an verschiedenen Taxa von *Ensifer*, *Pseudomonas* und *Vibrio* (Khan et al., 2008; Martens et al., 2007; Thompson et al., 2007) zeigten eine hohe Auflösung zur Speziesabgrenzung sowie große Anwendbarkeit. MLSA Studien nutzen in den meisten Fällen degenerierte Primer um mögliche Punktmutationen zu umgehen. Unsere entwickelten Primer sollten ursprünglich einer MLST dienen, also einer intraspezies-spezifischen Analyse. Erst im Verlauf der Anwendung stellte sich heraus, dass die Neuisolate aus verschiedenen

Spezies der Gattung *Rhodopirellula* bestehen und die entwickelten Primer daher vermutlich zu spezifisch sind, um alle Stämme zu untersuchen. Sie eignen sich aber dennoch zur Untersuchung nah verwandter Spezies oder Subspezies wie OTU A und B. Da bisher noch kein MLSA oder MLST Schema für *Planctomyceten* bekannt war, kann die hier entwickelte Methode nun als Vorlage für weitere, verbesserte Schemata dienen. Außerdem ermöglicht die Sequenzebene die Bildung einer Datenbank mit Primer- und Gensequenzen der einzelnen Typstämme. Somit kann ein Isolat einer Spezies zugeordnet werden unabhängig von der parallelen Untersuchung des Typstamms wie es DNA-DNA-Hybridisierungen erfordern.

5.2 BOX-PCR

Um eine genauere Analyse der beiden OTUs A und B zu erreichen, wurden unterstützend zur MLSA PCR-basierende Fingerprintmethoden angewendet. Die Anwendbarkeit verschiedener Methoden wurde anhand der Kieler Stammsammlung überprüft. Neben den rep-PCRs ERIC und BOX wurden auch sogenannte RAPD-Primer getestet, die mit sehr kurzen Sequenzen von 10 bp zufällig im Genom binden und so unterschiedliche Amplicongrößen und Muster erzeugen. Sowohl die ERIC-PCR als auch verschiedene zufällig erstellte RAPD-Primersequenzen zeigten keine konstant reproduzierbaren Bandenmuster in Gelelektrophoresen auf. Nur die Anwendung der BOX-PCR konnte mit allen Stämmen erfolgreich Fingerprint-Muster in einem Agarosegel erstellen. Die verschiedenen Stämme der Spezies *Rhodopirellula baltica* zeigten dabei sowohl wiederkehrende Banden als auch unterschiedliche Musterbildungen. Die Anwendbarkeit der BOX-PCR an Stämmen von *Rhodopirellula baltica* konnte somit bestätigt werden.

In weiterführenden Versuchen wurde die Analysesoftware Totallab TL120 von Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, UK) genutzt, die Banden in Gelbildern detektiert und Muster in binäre Matrixen umwandeln kann. Somit erfolgt eine automatische Berechnung von phylogenetischen Bäumen anhand der unterschiedlichen Musterbildung. Die in der Literatur allgemein anerkannte Darstellungsweise für Bäume dieser Art wird mit der `unweighted pair group` Methode mit `arithmetic mean` (UPGMA) berechnet. Trotz Unterstützung durch die Analysesoftware muss eine manuelle Kontrolle der detektierten Banden erfolgen und Referenzlinien müssen erstellt werden.

Die BOX-PCR vervielfältigt die Sequenzen zwischen den repetitiven Elementen der 154bp langen BOX-Sequenz, die mehrfach im Genom vorkommt. Daher ist diese PCR nicht Spezies- oder Stammspezifisch sondern amplifiziert unterschiedlich große Amplicons unabhängig von der Identität des Templates. Prinzipiell konnte mit fast jedem Isolat ein Bandenmuster im Agarosegel erstellt werden. Bei der Verwendung von weit entfernt

verwandten Isolaten wurde die Zuordnung der einzelnen Banden zu der jeweiligen Referenzlinie aber erschwert und Stämme wurden von der Software falsch in den phylogenetischen Baum eingeordnet. Die Reduzierung der zu untersuchenden Stämme auf die nah verwandten Cluster A und B führte zu weniger neuen Bandengrößen und erleichterte die Zuordnung. Somit konnten die Einteilung der Stämme in die OTUs A und B sowie das Ergebnis der MLSA bestätigt werden. Abbildung 7 zeigt ein solches Agarosebild und den daraus berechneten phylogenetischen Baum.

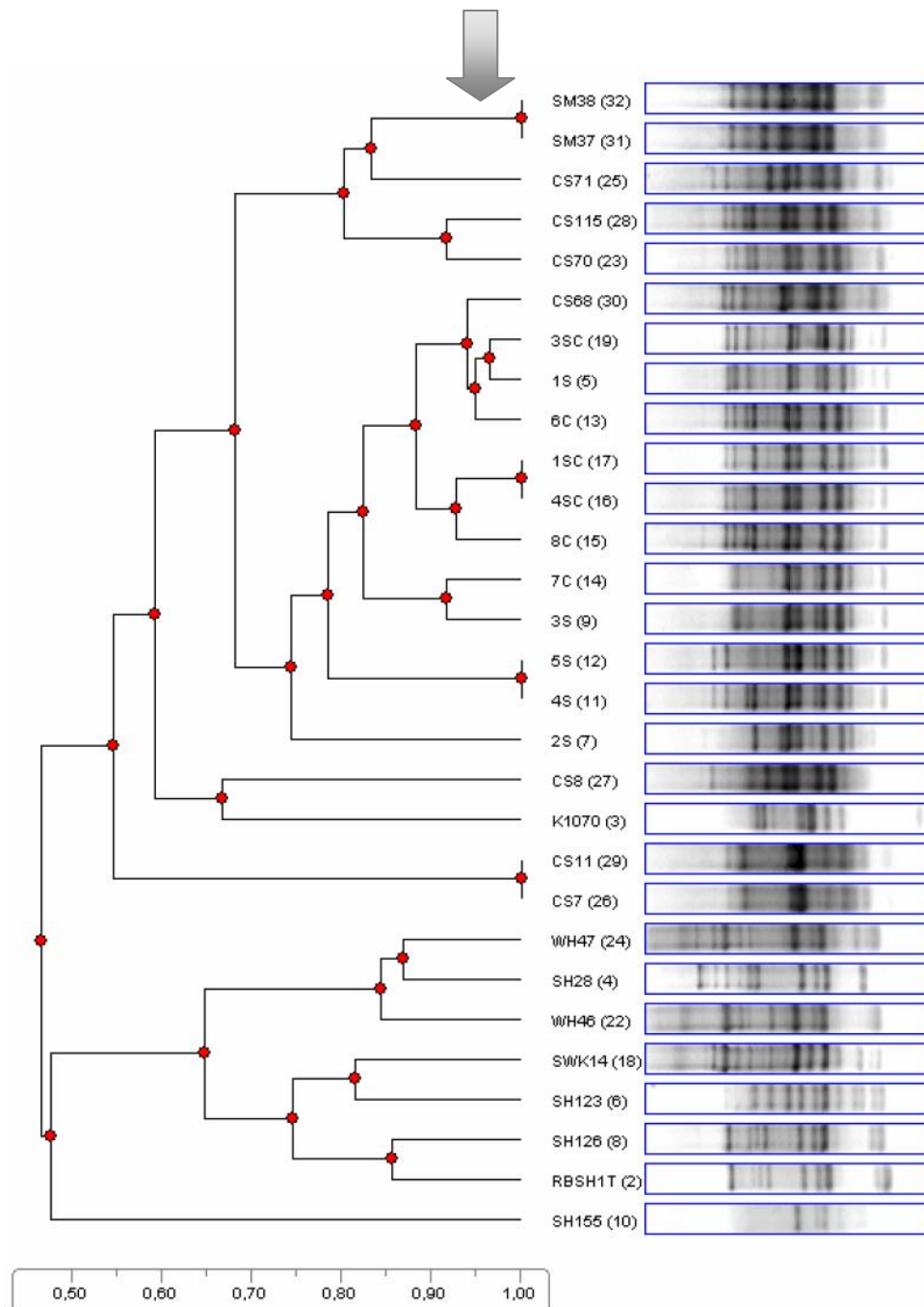
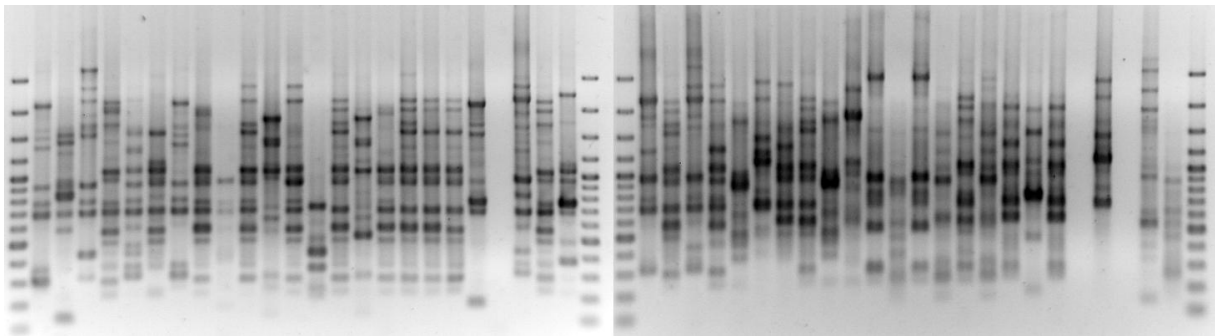


Abbildung 7: Zusammengefügtes Gel einer BOX-PCR und daraus resultierender phylogenetischer Baum, berechnet mit UPGMA inTotalLab TL120. Die Zahl in Klammern gibt die Spur an (Marker 100bp DNA Ladder Plus von Fermentas).

Die Stämme der OTUs A und B sind klar von einander getrennt. Stamm SH155 zeigt auch in dieser Analysemethode leichte Differenzen zu den anderen Stämmen der Hybridisierungsgruppe, wobei in diesem Fall die Effizienz der BOX-PCR zu gering war und nur wenige Banden zu sehen sind. Trotzdem ähnelt dieses schwache Muster dem der anderen Stämme aus OTU A, was die Einordnung rechtfertigt. Da dieser Stamm nur sehr schlecht auf allen versuchten Medien wuchs und schließlich sogar ganz das Wachstum einstellte, konnte nicht genügend DNA für weitere Versuche isoliert werden.

Die BOX-PCR erweist sich als nützliche Methode zur Aufteilung nah verwandter Spezies. Jede Spezies zeigt dabei bestimmte einmalige Bandenmuster, die andere Spezies nicht in dieser Form aufweisen. Lanoot und Kollegen untersuchten 2004 über 450 verschiedene Typstämme von *Streptomyces*-Spezies mittels BOX-PCR und konnten mittels einzigartiger Muster 30 verschiedene Cluster erstellen. Auch eine Korrelation von DNA-DNA-Hybridisierung und BOX-PCR Muster konnte gezeigt werden. Letztendlich konnten mit dieser Methode synonyme Spezies entlarvt und korrekt zugeordnet und beschrieben werden. Für die Gattung *Rhodopirellula* liegen weder so viele verschiedene Spezies vor, noch konnte die BOX-PCR Analyse allein die Clusterbildung bewältigen. Allerdings zeigt diese Methode in Kombination mit anderen eine hohe Auflösung innerhalb einer Gattung und erlaubt sogar weitere Unterteilungen innerhalb einer Spezies. Bei vorheriger grober Identifizierung des Stammes kann die BOX-PCR zur weiteren Einordnung genutzt werden.

6. Morphologische Untersuchungen

Zur Identifizierung eines Bakteriums spielen neben chemotaxonomischen und genetischen Untersuchungen auch die morphologischen Besonderheiten des Isolats eine besondere Rolle. Aufgrund der geringen Größe lassen sich Bakterien nur mit Mikroskopen beobachten. Zur Bestimmung der Zellform reicht häufig bereits das Lichtmikroskop. Für weitergehende Details sind die Strahlen des sichtbaren Lichts nicht ausreichend und Elektronen werden statt Photonen in Elektronenmikroskopen verwendet. Eine Vielzahl an Lichtmikroskopbildern aber vor allem elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Manuskript 3 und auch teilweise in Manuskript 2 zu sehen und ausführlich beschrieben. In diesem Teil werden nur die wichtigsten Aspekte zusammengefasst und kleinere Details gezeigt.

6.1 Lichtmikroskopie

Die neu isolierten Stämme wurden bereits per Screening-PCR als *Planctomyceten* der Gattung *Rhodopirellula* identifiziert. Mit Hilfe des Lichtmikroskops sollten im Phasenkontrast typische Eigenschaften von *Rhodopirellula* bestätigt werden. Die Zellformen variierten von runden Kugeln bis länglichen Zellen, die aber alle eine Neigung zur Rosettenbildung zeigten. Diese erfolgte in Abhängigkeit von der Kultur und der Wachstumsphase unterschiedlich. Birnenförmige Zellen lagerten sich am dünnen Zellpol zusammen, während die länglichen Zellen der Stämme CS14 und CS15 auch Zelladhesion an der Längsseite zeigten. Die Knospung wurde am der Rosettenmitte abgewandten Pol beobachtet. Einige Zellen zeigten eine Doppelknospung, das heißt, zur gleichen Zeit knospen zwei Tochterzellen an einer Mutterzelle. Diese Struktur erinnerte besonders bei runden Zellen an knospende Hefezellen. Schwärmerzellen konnten im Phasenkontrastbild als kleine schnell bewegliche Zellen erkannt werden. Ihre trudelnden Bewegungen ließen auf eine monopolare Begeißelung schließen, wobei eine Unterscheidung in monotrich und polytrich mit dem Lichtmikroskop nicht möglich ist. Laut Stammbeschreibung ist der Typstamm SH1 von *R. baltica* subpolar mit einem einzigen Flagellum beweglich. Im adulten Zustand verliert die Zelle die Fähigkeit der Fortbewegung. Ob dieses gleichbedeutet mit einem Verlust des Flagellums ist, kann ebenfalls nicht mit Lichtmikroskopie geklärt werden. Ab einem bestimmten Zellstadium bilden die verschiedenen Stämme eine klebrige Substanz an einem der Zellpole aus und heften sich mit dieser an Oberflächen und aneinander. In der stationären Phase des Wachstums konnte bei manchen Isolaten eine Aufteilung der Zellen in einen dunklen und einen hellen Bereich erkannt werden. Dieses kann ein Hinweis auf die intrazelluläre Kompartimentierung der Zellen sein. Eventuell schrumpft bei älteren Zellen das Pirellosom, das aufgrund der Ribosomen und des Nucleoids dunkler erscheint, und gibt so den Blick auf das lichtdurchlässigere Paryphoplasma frei. Dies ist allerdings nur eine Hypothese. Die Stämme K249 und K833 des OTUs I zeigten in dieser späten Wachstumsphase zudem die Ausbildung einer stielähnlichen Struktur, die im Durchfokussieren der Probe sichtbar wurde und von der daher keine Aufnahme vorliegt.

Lichtmikroskopie wurde eingesetzt um zunächst einen ersten Eindruck von den isolierten Kolonien zu erhalten und um Planctomyceten-spezifische Merkmale zu identifizieren. Später wurde die Lichtmikroskopie zur Kontrolle der Kulturen verwendet. Aktives Wachstum (Schwärmerzellen) und Reinheit konnten schnell und zeitnah kontrolliert werden. Aufgrund der heteromorphen Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus (siehe Abb. 3) erfordert diese Aufgabe einige Erfahrung. Bei Vermutung einer Verunreinigung wurden die Kulturen mit weiteren Methoden untersucht.

6.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM bzw. SEM)

Zur genaueren Analyse einzelner Details musste eine elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgen. Dazu wurden *R. baltica* Zellen des Typstamms SH1 und des Stammes SH398 mit dem Rasterelektronenmikroskop am UFT in Bremen untersucht. Da Präparation und Mikroskopie zusammen mit weiteren Mikroorganismen innerhalb eines elektronenmikroskopischen Praktikums erfolgte, konnten die Stämme nicht im gewünschten Maß untersucht werden. Es erfolgten nur wenige Aufnahmen des auf einem Fluoreszenzbildschirm dargestellten Bildes mit einer analogen Spiegelreflexkamera. Von diesen Bildern wurden nur vier Aufnahmen des Stammes SH398 entwickelt. Aufgrund der geringen Größen der Zellen wirkte sich ein Fehler in der Fokussierung der Kamera stark auf die Auflösung der SEM auf. Die Oberflächen der RB-Zellen wirken verzehrt und unscharf. Gleichzeitig durchgeführte SEM an Atemhöhlen des Wasserfarn *Azolla* und darin enthaltenen Cyanobakterien *Anabaena azollae* zeigten hingegen einigermaßen fokussierte Bilder. Eine zu hohe Vergrößerung des Objektes, wie es für *R. baltica* nötig gewesen wäre, führt zu einer starken Aufladung des Präparats und äußert sich in Blitzen auf dem Fluoreszenzschirm. Dieses erfolgte auch bei der Mikroskopie unserer Zellen. Daher ist die Abbildung 12 g in Manuskript 3 die höchstmögliche Auflösung mit diesem Mikroskop. Das Bild zeigt Zellen des Stammes SH398, die hauptsächlich als Rosetten vorliegen. Die Zellform ist birnenförmig und zwischen den einzelnen Zellen zweigen fädige Querverbindungen ab, die in ähnlicher Form auch bei dem Planctomycete *Schlesneria paludicola* zu beobachten sind, wenn dieser auf einem Polymer-reichen Substrat wächst (Kulichevskaya et al., 2007). Eventuell handelt es sich bei diesen fädigen Verbindungen um abgesonderte Enzyme wie Sulfatasen, um ein Polymer wie Chondroitinsulfat extrazellulär abbauen zu können. Weitere Details wie kraterförmige Strukturen oder sogar die Holdfastsubstanz konnten mit SEM nicht aufgelöst werden. Daher wurde von einer weiteren Untersuchung von Stämmen mit SEM abgesehen.

6.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Beobachtung der intrazellulären Kompartimentierung und weiterer subzellulärer Strukturen wurden der Typstamm SH1 von *Rhodopirellula baltica* und 10 Stämme der Neuisolate mittels TEM untersucht. Dazu wurden Dr. Reinhard Rachel von der Universität Regensburg und Dr. Dietmar Riedel vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Physik in Göttingen als Kooperationspartner gewonnen.

Dr. Rachel untersuchte die Stämme SH1^T, 6C und SM1 mit drei verschiedenen Präparationsmethoden: Platin-Bedampfung, Gefrierbruchverfahren und -ätzung sowie mit klassischen Ultradünnschnitten (UDS). Die angewandten Protokolle und Methoden sind in

Manuskript 2 und 3 im Detail beschrieben. Die Stämme SH1 und 6C bestehen aus birnenförmigen Zellen, während SM1 zumeist runde Zellen besitzt. Alle drei untersuchten Stämme zeigten eine intrazelluläre Strukturierung: neben Zellwand und Cytoplasmamembran konnte im Cytoplasma eine zweite Membran, die Intracytoplasmatische Membran (ICM) beobachtet werden. Sie unterteilte die Zellen in zwei Bereiche: eine dunkle Membran-umhüllte homomorphe, granuläre Masse mit einem noch dunkleren Bereich, dem Nucleoid, in der Mitte und in den umgebenden heteromorphen hellen Bereich, der mehrere kleine Membran-umhüllte Strukturen enthält, eventuelle Speichervesikel. Im Gefrierbruchverfahren konnten in allen drei Stämmen die Proliferation mittels Knospung verfolgt werden. Platin-Bedampfung visualisierte dagegen die äußere Zellform. Die Zellen zeigten lange fibrilläre Anhängsel, die unter anderem auch einen Zell-Zell-Kontakt zu weit entfernten Zellen herstellten. Auf einer Polseite konnten kleine hügelige Erhebungen beobachtet werden, die eventuell die in der Stammbeschreibung erwähnten kraterförmigen Strukturen darstellen. Andererseits könnte es sich dabei aber auch um Prosthecae handeln, ähnlich den Dornfortsätzen oder kleinen Hörnern, die in UDS Bildern zu sehen sind. Besonders Stamm 6C zeigt diese in der UDS-Präparation. An dem entgegengesetzten Pol der Zelle zeigt Abbildung E (Manuskript 3, Panel 2, 6C) einen kronenförmigen Auswuchs von haarigen Strukturen aus der Zellwand. Diese Strukturen konnten auch bei den Bildern aus TEM Präparationen in Göttingen gesehen werden. Im MPI BCP in Göttingen wurden gemeinsam mit Dr. Riedel frisch gewachsene Kulturen der Stämme SM35, SM24, SM41, WH49, K587, CS14 und SM38 chemisch fixiert, entwässert, eingebettet und geschnitten. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte durch Dr. Riedel. Zusätzlich fixierte er neue Zellen derselben Stämme sowie von Stamm SWK7 mit einer Hochdruckgefrieranlage und fertigte ebenfalls Dünnschnitte an. Die Bilder und die genaue Beschreibung der Methode und der Ergebnisse sind in Manuskript 3 ausführlich beschrieben. Alle Zellen weisen eine ICM und Kompartimentierung auf. Obwohl sich die Zellformen unterscheiden, zeigen alle Stämme an einem Pol haarähnliche Strukturen, die durch Zellwand und Cytoplasmamembran mit der ICM verbunden sind. Die fädigen Strukturen setzen sich relativ gerade fort und erinnern in ihrer Struktur an Flagellen, die Verbindung durch die Membranen erinnert an typische Abbildungen von Flagellenmotoren in Lehrbüchern. Stamm SM38 wurde daher auch mit Tomographie, einen dreidimensionalen bildgebenden Verfahren, am entsprechenden Zellpol untersucht. Die gefundenen Strukturen unterstützen eine Identifizierung als Flagellen. Am anderen Zellpol, der dem Pirellosom abgewandten Pol, zeigen die Zellen teilweise eine kurze, faserige Struktur, die beim Stamm CS14 fast $\frac{3}{4}$ der Zelloberfläche einnimmt. Eventuell stellt diese Struktur die Holdfastsubstanz dar, da Stamm CS14 mit einem hohen Anteil daran in der Präparation und in der Form der Rosettenbildung einige Besonderheiten aufwies, die sich so erklären lassen könnten. So war

eine chemische Fixierung der Zellen dieses Stammes kaum möglich und TEM Aufnahmen der Dünnschnitte zeigen eine amorphe Struktur an der Oberfläche. Durch die Hochdruckgefrierfixierung konnten diese inhibierenden Effekte anscheinend umgangen werden. Im lichtmikroskopischen Bild zeigten die Zellen dieses Stammes zudem eine Anhaftung aneinander auch auf ihrer Längsseite, was durch diese Holdfaststruktur erklärt werden kann.

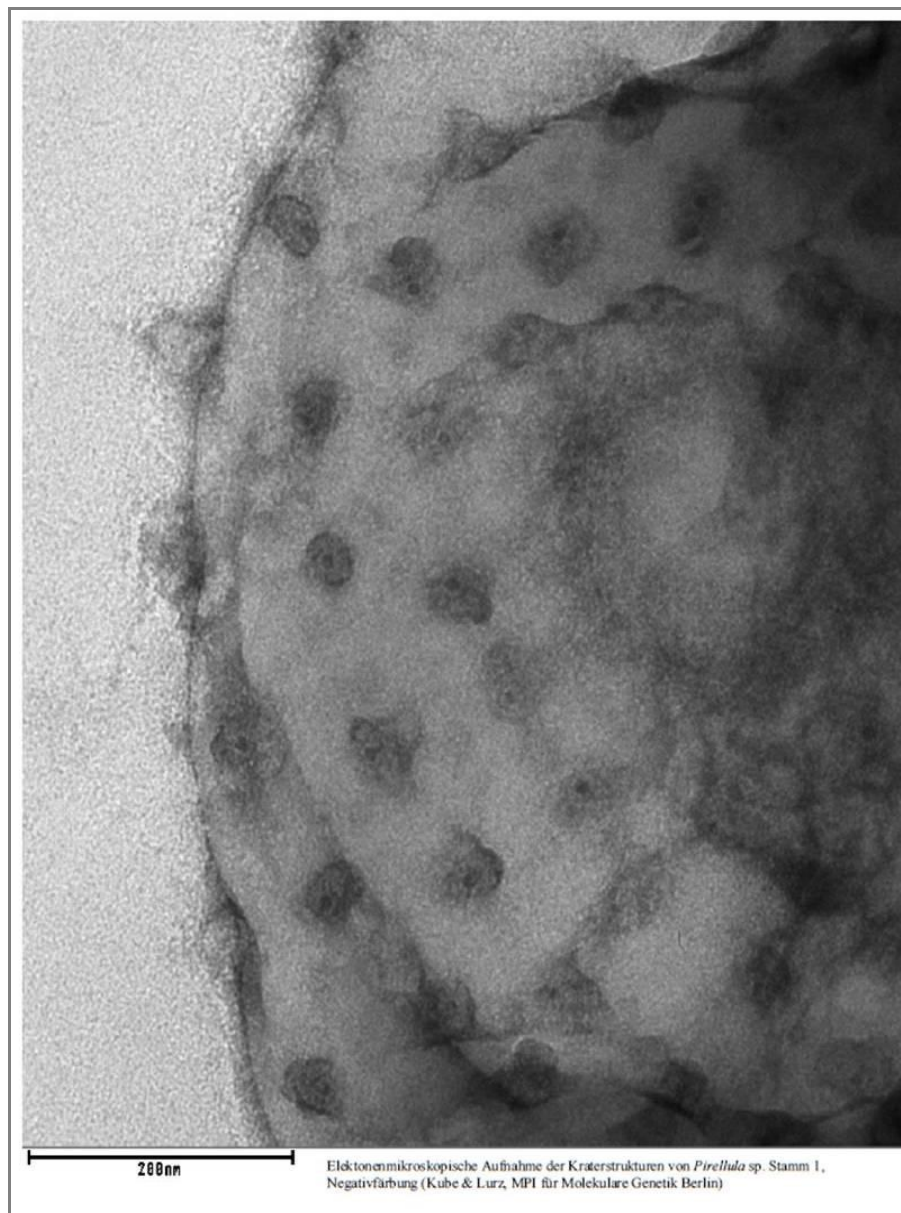


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme aus der Dissertation von Michael Kube (2003)

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Neuisolatze zeigten für alle untersuchte Stämme das Vorhandensein einer intracytoplasmatischen Membran, die die Planctomyceten-typische Zelleinteilung in Pirellulosom und Paryphoplasma verursachte.

Zudem wurden filamentöse Fortsätze an einem der beiden Zellpole als potenzielle Flagellen identifiziert, was der Speziesbeschreibung mit nur einem Flagellum widerspricht. Die in manchen Publikationen als kraterförmige Strukturen bezeichneten Punkte könnten dann ausgerissene Flagellen sowie Reste des Motors in der Zellwand darstellen.

In der Dissertation von Michael Kube (2003) wurde im Anhang eine solche elektronenmikroskopische Aufnahme des Typstamms SH1 vorgestellt, die diese Theorie unterstützt (Abb. 8).

Bei den Membran-umgebenen kleineren Vesikeln innerhalb des Paryphoplasmas handelt es sich vermutlich um Speichervesikel, wie sie von vielen verschiedenen anderen Bakterien bekannt sind (siehe Einleitung).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützen die Identifizierung der Neuisolate als *Planctomyceten* und vermutlich auch als *Rhodopirellula* sp.. Trotz der vielfältigen Zellformen ähneln sich die Strukturen der verschiedenen Stämme. Eine Funktionalität der ICM konnte aber auch mit dieser Studie nicht geklärt werden. Auch wurden keine transmembranen Kanäle der ICM entdeckt. Der Transport von Proteinen durch die Membran ist weiterhin ungeklärt.

7. Biogeographie der Gattung *Rhodopirellula*

Die ursprüngliche Intention dieser Studie war es, am Ende eine Aussage über die Biogeographie eines anhaftenden marinen Bakteriums treffen zu können. Dazu wurden 70 verschiedene Stämme der Gattung *Rhodopirellula* aus marinen Proben aus ganz Europa sowie auch außerhalb Europas isoliert. Diese Stämme wurden morphologisch und genetisch als Mitglieder der Gattung *Rhodopirellula* bestätigt. Entgegen anfänglicher Vermutungen gibt es neben der Spezies *R. baltica* noch weitere Spezies innerhalb dieser Gattung. Mittels einer Kombination von DNA-DNA-Hybridisierung, MLSA, BOX-PCR und 16S rRNA-Genanalyse konnte ein Großteil der Stämme auf insgesamt 13 verschiedene taxonomische Einheiten (OTUs) aufgeteilt werden. Diese Einheiten unterscheiden sich auf morphologischer und genetischer Ebene teilweise nur gering, aber dennoch stark genug, um nicht zu ein und derselben Spezies zu gehören. Die OTUs wurden mit A bis M benannt, wobei A den Typstamm für *R. baltica* sowie weitere Stämme dieser Spezies aus einer anderen Studie enthält (Schlesner et al., 2004). Zur Visualisierung sind die 11 verschiedenen europäischen OTUs dieser Studie in Abbildung 9 als verschiedenfarbige Sterne eingezeichnet. Mehrfarbige Sterne kennzeichnen einen Isolationsort mit mehreren OTUs. Kleine blaue Sterne stellen noch einmal die Probenorte ohne erfolgreiche Isolierung dar.

Wie in der Karte zu sehen ist, beschränkt sich *Rhodopirellula baltica* in OTU A (feuerrot) in dieser Studie auf einen geographisch eng gesteckten Bereich zwischen Ostsee, Skagerrak und östlicher Nordsee. Aufgrund einer weiteren Studien (Gade et al., 2004) ist aber noch ein weiteres Isolat der Spezies von der französischen Mittelmeerküste bekannt. Daher handelt es sich bei *R. baltica* nicht um eine endemische Spezies.

OTU B (hellblau) ist über ganz Europa verteilt und zeigt mit BOX-PCR und MLSA kleinere lokale Subpopulationen. Isolate aus Nordsee und Mittelmeer können so voneinander unterschieden werden und zeigen genetische Unterschiede in Bezug zu ihrer geographischen Entfernung. Aufgrund der niedrigen Zahl an Isolaten kann aber keine statistische Aussage getroffen werden.

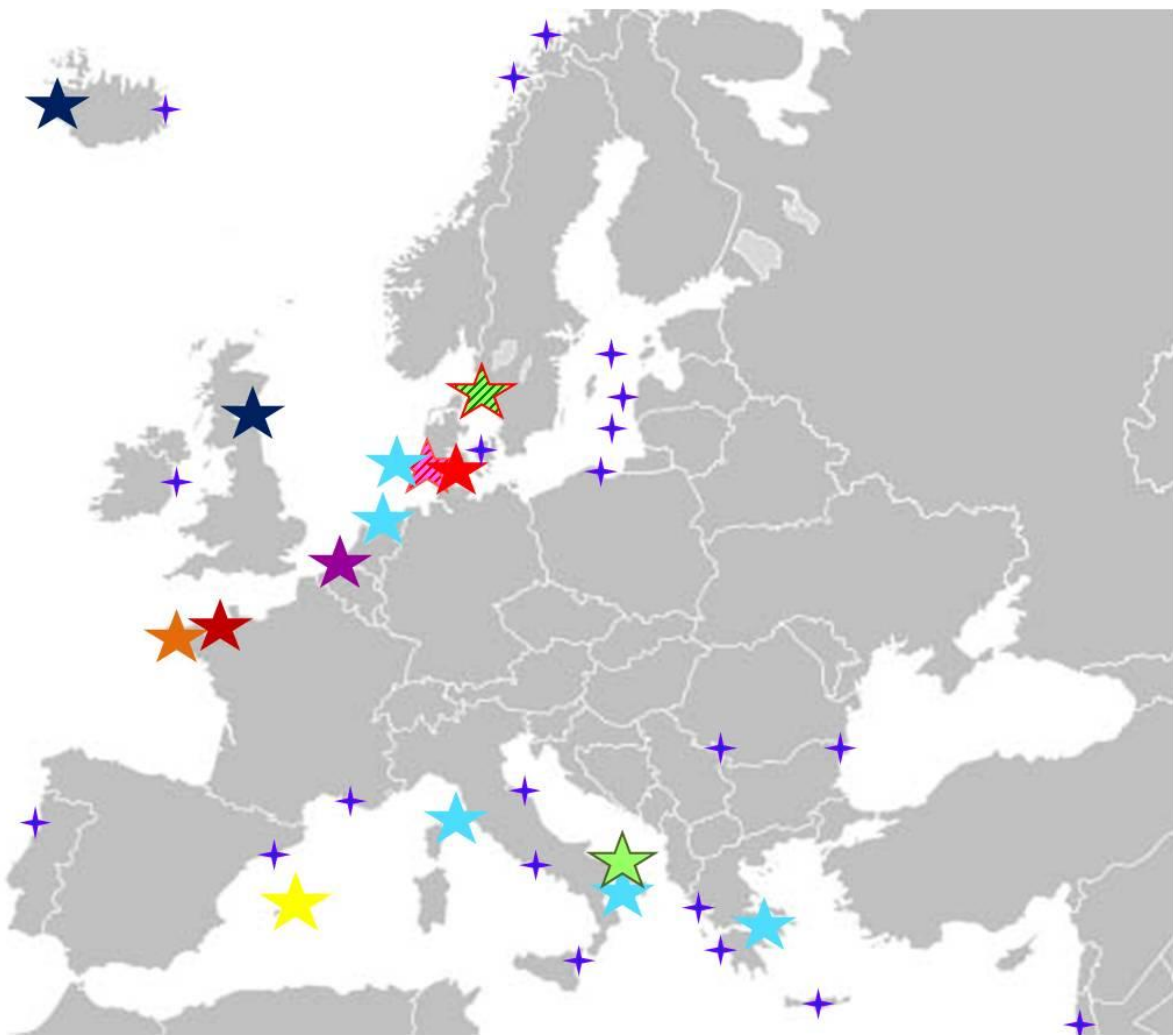


Abbildung 9: Europakarte mit Kennzeichnung der verschiedenen Isolationsorte der 11 europäischen OTUs, sowie der Darstellung von weiteren Probenorten ohne erfolgreiche Isolierung.

OTU C (lindgrün) scheint nach bisherigen Untersuchungen endemisch für die Adria zu sein. Bei nur zwei Isolaten in diesem Cluster kann sich diese Aussage noch ändern. Ein weiteres

Isolat aus der Adria, SM50, bildet unterdessen mit OTU M eine eigene Einheit, da der Stamm zu allen anderen Stämmen zu unähnlich ist. Auch OTU D (gelb) ist nur durch einen Stamm vertreten, SM1, und zeigte sich in keiner Analysemitmethode mit anderen Clustern vereinbar. OTU I (dunkelblau) und J (orange) bestehen aus je zwei Stämmen und sind auf nordeuropäische Gewässer beschränkt. Bis auf das nicht eingezeichnete OTU H mit den philippinischen Isolaten, bestehen alle anderen taxonomischen Einheiten aus nur einem Stamm. Aussagen zur Biogeographie einzelner Einheiten können also nicht getroffen werden.

Auf Genusebene kann aber postuliert werden, dass *Rhodopirellula* mit einer Vielzahl von Spezies in europäischen Gewässern vorkommt und das eine Population verschiedener Stämme in Südostasien gefunden wurde, sowie eine Spezies mit nur einem Stamm an der ostafrikanischen Küste. Obwohl Umweltbedingungen unterschiedlich waren und keine direkte und schnelle Verbindung der Meere besteht, ähneln sich die Isolate in morphologischer Sicht und auf 16S rRNA-Genebene. Nur genauere Untersuchungsmethoden wie DNA-DNA-Hybridisierung und MLSA konnten die Stämme voneinander separieren und in verschiedenen taxonomischen Einheiten bündeln.

Wie das Archaeon *Sulfolobus* besitzt auch *Rhodopirellula* eine Biogeographie, die sich anhand geographischer Entfernungen besser erklären lässt als mit Umweltbedingungen.

8. Ausblick

Die vorliegende Studie hat Einblicke in viele kleine Teilbereiche der Forschung an *Rhodopirellula* sp. gezeigt. Diese weisen ein hohes Potential auf und bergen interessante Ansatzpunkte für weitere Forschungsprojekte. Neben weiteren Feinstruktur-Analysen der Zellkompartimentierung und des Flagellenmotors, können auch Transportmechanismen und Aufbau von Membranen untersucht werden. Zur vollständigen und korrekten Beschreibung neuer Spezies sollten ausgewählte Stämme der einzelnen OTUs noch chemotaxonomisch untersucht werden. Neben der G+C-Gehalt-Bestimmung aller Isolate können die weiteren OTU mittels DNA-DNA-Hybridisierung bestätigt werden, dieses sollte aber nach erfolgreicher Anwendung der MLSA nicht mehr nötig sein. Analysen der Substratspektren, Reaktionen auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen und Toleranzgrenzen gegen Salinität und Temperatur gehören genauso zur vollständigen Stammbeschreibung wie auch die Bestimmung des Lipidgehalts und eine Fettsäureanalyse (FAME). Im Anschluss sollten die designierten Typstämme bei der DSMZ und einer weiteren Stammsammlung für Mikroorganismen hinterlegt werden.

Das MLSA Schema kann den neuen Bedingungen von mehreren verschiedenen Spezies angepasst werden: neue, degenerierte Primer, passend für alle Isolate sollten designet werden. Eventuell sollten auch andere Haushaltsgene bezüglich ihrer Eignung getestet werden. Wenn zwei oder drei spezifische Markergene ausgewählt sind, können diese für Metagenomstudien verwendet werden. *Rhodopirellula* sp. könnte kulturunabhängig in Umweltproben nachgewiesen werden und eine schnelle Aussage über Biogeographie wäre möglich. Um diese Aussagen zu bekräftigen wäre eine Erweiterung der Stammsammlung um weitere Stämme der Gattung wünschenswert. Zur Zeit kann aber bereits eine erste Analyse mit den Primerpaaren für die Gene *mdh* und *glpF* erfolgen. Ein Vergleich der Daten aus Kulturen und dem entsprechenden Standort kann Aussagen über die Diversität vor Ort geben und die Frage beantworten, ob diese Studie die *Rhodopirellula*-Population des jeweiligen Standortes repräsentiert. Durch die Anwendung an neuen Probenorten können zudem neue Daten über die Biogeographie des Genus gesammelt werden.

C Literatur

- Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., Krüger M., 2006. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environ. Microbiol.* 8, 574–590
- Baas-Becking, L.G.M., 1934. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Bauld, J., Staley, J.T., 1976. *Planctomyces maris* sp. nov.: A marine isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 97, 45–55.
- Brümmer, I.H.M., Fehr, W., Wagner-Döbler, I., 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., Felske, A.D.M., Wagner-Döbler, I., 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5094-5101.
- Cannon, G.C., Bradburne, C.E., Aldrich, H.C., Baker, S.H., Heinhorst, S., Shively, J.M., 2001. Microcompartments in Prokaryotes: Carboxysomes and Related Polyhedra, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5351–5361
- Cho, J.-Ch., Tiedje, J.M., 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5448–5456.
- Curtiss, R., Charamella, L.J., Berg, C.M., Harris, P.E., 1965. Kinetic and genetic analyses of D-cycloserine inhibition and resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 90, 1238-1250.
- Duncan, K.E., Istock, C.A., Graham, J.B., Ferguson, N., 1989. Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: variable hybrid stability and the nature of species. *Evolution* 43, 1585–1609.
- Eiler, A., Bertilsson, S., 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* 6, 1228-1243.
- Fuerst, J.A., 2005. Intracellular compartmentation in *planctomycetes*. *Ann. Rev. Microbiol.* 59, 299-328.
- Fuerst, J.A., Gwilliam, H.G., Lindsay, M., Lichanska, A., Belcher, C., Vickers, J.E., Hugenholtz, P., 1997. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 254-262.
- Gade, D., Schlesner, H., Glöckner, F.O., Amann, R., Pfeiffer, S., Thomm, A., 2004. Identification of *planctomycetes* with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. *Microb. Ecol.* 47, 243-251.

-
- Gade, D., Stührmann, T., Reinhardt, R., Rabus, R., 2005. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. Environ. Microbiol. 7, 1074-1084.
 - Gimesi, N., 1924. Hydrobiologiai Tanulmányok [Hydrobiological studies]. I. *Planctomyces Bekefii* Gim. nov. gen. et sp. [Hungarian with German translation]. Budapest: Kiadja a Magyar Ciszterci Rend, 1–8.
 - Giovannoni, S.J., Schabtach, E., Castenholz, R.W., 1987. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs. Arch. Microbiol. 147, 276-284.
 - Glöckner, F.O., 2006. Umweltgenomik: Schlüssel zum Verständnis mariner mikrobieller Diversität und Funktion, aus Jahrbuch 2006 des Max-Planck-Instituts für Marine Mikrobiologie, Bremen
 - Glöckner, F.O., 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.
 - Hohmann-Marriott, M.F., Blankenship, R.E., 2007. Hypothesis on chlorosome biogenesis in green photosynthetic bacteria, FEBS Lett. 581, 800–803
 - Horner-Devine, M.C., Carney, K.M., Bohannon, B.J.M., 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. Proc. R. Soc. Lon. B Biol. Sci. 271, 113-122.
 - Ivanova, A.O., Dedysh, S.N., 2006. High abundance of *Planctomycetes* in anoxic layers of a *Sphagnum* peat bog. Microbiology (Engl. Transl. of Mikrobiologija) 75, 716- 719.
 - Jaekel, U., 2006. Modified isolation methods and MLSA design for the *planctomycetes* species *Rhodopirellula baltica*. Bachelorarbeit, FH Bonn-Rhein-Sieg.
 - Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Huber, H., Rachel, R., 2008. *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. Arch. Microbiol. 190, 395-408.
 - Khan, N. H., Ahsan, M., Yoshizawa, S., Hosoya, S., Yokota, A., Kogure, K., 2008. Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6194-6205.
 - Konstantinidis, K.T., DeLong, E.F., 2008. Genomic patterns of recombination, clonal divergence and environment in marine microbial populations. Isme J. 2, 1052-1065.
 - Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. J. Bacteriol. 187, 6258-6264.
 - Kube, M., 2003. Sequenzierung und Strukturen von *Pirellula* sp. Stamm 1. Universität Bremen, Dissertation
 - Kuhlbrodt, T., Griesel, A., Montoya, M., Levermann, A., Hofmann, M., Rahmstorf, S., 2007. On the driving processes of the Atlantic meridional overturning circulation, Rev. Geophys., 45, RG2001.

- Kulichevskaya, I.S., Baulina, O.I., Bodelier, P.L., Rijpstra, W.I., Damsté, J.S.S., Dedysh, S.N., 2009. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata*-like planctomycete from a Siberian peat bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 357-364.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Damste, J.S.S., Dedysh, S.N., 2008. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1186-1193.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Belova, S.E., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Rijpstra, W.I.C., Damste, J.S.S., Zavarzin, G.A., Dedysh, S.N., 2007. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2680-2687.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J.L., Huang, Y., Liu, Z.H., Swings, J., 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 84-92.
- Liesack, W., König, H., Schlesner, H., Hirsch, P. 1986. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. *Arch. Microbiol.* 145, 361–366.
- Liesack, W., Stackebrandt, E., 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174, 5072-5078.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous, M., Jetten, M.S.M., Butler, M.K., Forde, R.J., Fuerst, J.A., 2001. Cell compartmentalisation in *planctomycetes*: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* 175, 413-429.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Fuerst, J.A., 1997. Pirellosomes - a new type of membrane-bounded cell compartment in *Planctomycete* bacteria of the genus *Pirellula*. *Microbiology* 143, 739-748.
- Lopez-Garcia, P., Lopez-Lopez, A., Moreira, D., Rodriguez-Valera, F., 2001. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 193–202.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains, generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2286-2295.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Rumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., List, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A.,

- Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J.J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing - a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145.
 - Marshall, K.C., 2006. Planktonic versus sessile life of prokaryotes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 3–15.
 - Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A., 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 489-503.
 - Martiny, J.B.H., Bohannon, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreas, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T., 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Rev. Microbiol.* 4, 102-112.
 - Modolell, J., Davis, B.D., 1969. Mechanism of inhibition of ribosomes by streptomycin. *Nature* 224, 345-348.
 - Mohan, S.B., Schmid, M., Jetten, M.S.M., Cole, J., 2004. Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 433-443.
 - Morris, R.M., Longnecker, K., Giovannoni, S.J., 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., Dodenhof, T., van Beusekom, J.E.E., 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.
 - Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.H., 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144, 3257-3266.
 - Neumann, H., 1983. Organization of the genes for ribosomal RNA in *Archaeobacteria*. *Mol. Gen. Genet.* 192, 66–72.
 - Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M., Ward, D.M., 2003. Geographic isolation in thermophilic cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5, 650-659.
 - Pimentel-Elardo, S., Wehrl, M., Friedrich, A.B., Jensen, P.R., Hentschel, U., 2003. Isolation of *planctomycetes* from *Aplysina* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 239-245.

-
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., Steinbüchel, A., 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148, 2413–2426.
 - Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188-7196.
 - Roberts, M.S., Cohan, F.M., 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* 49, 1081–1094.
 - Rossello-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39-67.
 - Schlesner, H., 1986. *Pirella marina* sp. nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 177–180.
 - 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, B.J., 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.
 - Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I.C., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damste, J.S.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M.S.M., Strous, M., 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.
 - Schüler, D., 2008. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 654–672
 - Sikorski, J., Rossello-Mora, R., Lorenz, M.G., 1999. Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 393-402.
 - Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33, 152-155.
 - Stackebrandt, E., Fischer, A., Hirsch, P., Roggentin, T., Schlesner, H., 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., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kampf, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043-1047.
 - Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni, S., Schlesner, H., 1992. The order *Planctomycetales* and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera*. In *The Prokaryotes*, vol. 4, pp. 3710–3731. Edited by A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer & H. G. Trüper. New York: Springer.
 - Staley, J.T., Gosink, J.J., 1999. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 189–215.
 - Staley, J.T., Marshall, K.C., Skerman, V.B.D., 1980. Budding and prosthecate bacteria from freshwater habitats of various trophic states. *Microb. Ecol.* 5, 245-251.
 - Tadonleke, R.D., 2007. Strong coupling between natural *Planctomyces* and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 543-555.
 - Taschke, C., Herrmann, R., 1986. Analysis of transcription and processing signals of the 16S-23S rRNA operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 205, 434–441.
 - Teeling, H., Lombardot, T., Bauer, M., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2004. Evaluation of the phylogenetic position of the planctomycete '*Rhodopirellula baltica*' SH 1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 791-801.
 - Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T., Sawabe, T., 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4279-85
 - van Niftrik, L., Geerts, W.J.C., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Yakushevskaya, A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2008. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *J. Struct. Biol.* 161, 401-410
 - Wagner, M., Horn, M., 2006. The *Planctomyces*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 241-249.
 - Wang, J., Jenkins, C., Webb, R.I., Fuerst, J.A., 2002. Isolation of *Gemmata*-like and *Isosphaera*-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 417–422.
 - Ward, N., Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni, S.J., Schlesner, H., Stackebrandt, E., 2006. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 757–793.

-
- Ward-Rainey, N., Rainey, F.A., Wellington, E.M., Stackebrandt, E., 1996. Physical map of the genome of *Planctomyces limnophilus*, a representative of the phylogenetically distinct planctomycete lineage. J. Bacteriol. 178, 1908–1913.
 - Whitaker, R.J., Grogan, D.W., Taylor, J.W., 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. Science 301, 976-978.
 - Whitman, W.B., 2009. The Modern Concept of the Procaryote. J. Bacteriol. 191, 2000-2005.
 - Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes - the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6578-6583.
 - Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18, 6531—6535.
 - Woebken, D., Teeling, H., Wecker, P., Dumitriu, A., Kostadinov, I., DeLong, E.F., Amann, R., Glöckner, F.O., 2007. From the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with *Planctomycete* genomes. ISME J. 1, 419-435.
 - Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090
 - Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., Rossello-Mora, R., 2008. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Syst. Appl. Microbiol. 31, 241-250.
 - Ziemke, F., Hofle, M.G., Lalucat, J., Rossello-Mora, R., 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens owens* genomic group ii as *Shewanella baltica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 179-186.

D Anhang

Anhang zur MLSA in Manuskript 2

Similarity Matrix aus ARB exportiert, berechnet mit NJ, Mitglieder verschiedener OTU mit den 2 Haushaltsgenen gIpF und mdh, Prozentzahl gibt Unterschied an

Similarity matrix table with 52 columns and 52 rows. The diagonal is all 1.0. Values represent similarity percentages. The table ends with row 52: K249 with similarity values 16.7, 15.3, 15.9, 15.9, 15.2, 15.2, 15.2, 15.6, 15.6, 15.9, 14.9, 16.0, 15.9, 15.7, 16.0, 25.1, 21.4, 22.2, 22.7, 25.7, 25.4, 11.4, 14.8, 14.8, 15.0, 15.0, 14.9, 14.9, 14.9, 14.9, 15.2, 15.9, 17.8, 15.6, 15.4, 17.9, 15.0, 14.8, 14.3, 14.9, 14.6, 15.2, 13.9, 14.1, 14.1, 14.1, 14.2, 13.9, 21.5, -0.2

Minimum Unterschied: 0.0

Maximum Unterschied: 25.7

E Publikationen

I. Publikationsliste mit Erläuterungen

1. **An improved isolation method for attached-living Planctomycetes of the genus *Rhodopirellula***

Nadine Winkelmann und Jens Harder

Journal of Microbiological Methods

Accepted for Publication

Durchführung der experimentellen Arbeiten und der Auswertung. Erstellung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Jens Harder.

2. **Diversity analysis of *Rhodopirellula* Isolates from European Seas applying a multilocus sequence analysis**

Nadine Winkelmann, Ulrike Jaekel, Carolin Meyer, Wilbert Serrano, Reinhard Rachel, Ramon Rossello-Mora und Jens Harder

Manuskript in Vorbereitung

Anzucht der verwendeten Stämme und Planung und Durchführung der Diversitätsuntersuchungen mittels MLSA und BOX-PCR. Durchführung der DNA-DNA-Hybridisierung zusammen mit Ramon Rossello-Mora. Auswertung der Daten und Erstellung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Jens Harder.

3. **Planctomycetes in electron microscopic pictures - a review and insights into the genus *Rhodopirellula***

Nadine Winkelmann, Carolin Meyer, Reinhard Rachel, Dietmar Riedel, Jens Harder

Manuskript in Vorbereitung

Anzucht der verwendeten Stämme, sowie chemische Fixierung und Einbettung der Präparate zur TEM in Göttingen. Auswertung der erhaltenen Aufnahmen mit Jens Harder und Reinhard Rachel. Erstellung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Jens Harder.

II. Publikationen

MIMET-D-09-00103, revised version

**An improved isolation method for attached-living
Planctomycetes of the genus *Rhodopirellula***

Nadine Winkelmann and Jens Harder

Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, D-28359 Bremen,
Germany

Corresponding author: Jens Harder, Max Planck Institute for Marine Microbiology,

Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany,

Tel.: +49 421 2028 750; fax: +49 421 2028 580;

E-mail-address: jharder@mpi-bremen.de

Abstract

Rhodopirellula baltica, an attached-living marine bacterium, was so far isolated as aerobic, heterotrophic bacterium forming pink-to-red colonies on ampicillin-containing plates. But many bacteria grow in the presence of ampicillin: marine samples from European Seas contained on average 10365 colony forming bacteria per ml water sample or sediment. Therefore we developed an improved enrichment protocol to isolate *Rhodopirellula* strains. To include attached-living bacteria, particles, plankton catches or sediment grains were spread on the plate surface. This was a necessity to reliably obtain new strains. Cycloserine or streptomycin served as additional selective agents. The number of colony forming cells resistant to ampicillin and cycloserine or streptomycin was low, 262 and 107 cfu per ml sample, respectively. *Rhodopirellula* colonies were identified with a newly-developed specific PCR reaction detecting a part of the 16S rRNA gene. The phylogenetic tree of over 60 isolates was established with new primers outside of the 16S rRNA gene and revealed a diversity on the species level in European Seas.

Keywords: benthic bacteria, *Pirellula*, *Planctomyces*

Introduction

Marine bacteria can be divided into free-living (planktonic) and attached-living (benthic) cells. Nutrients released from particle surfaces may attract the attachment of bacteria (Marshall, 2006). This colonization process can progress to a biofilm formation. The size of the surface is of small importance; even nanoparticles can serve as surface (Flemming, 2002). Glycoproteins and uncharacterized holdfast structures form temporal or permanent junctions to stabilize the biofilm that is under shearing forces, e.g. flow (Mueller et al., 2007). Thus biofilms cover a range of dynamic to stable habitats (Flemming, 2002; Marshall, 2006).

Attached-living bacteria often start their life as free-living offspring cells, in search for a suitable settlement place. Then they behave as “ordinary” free-living bacteria and may be isolated by traditional cultivation methods, e.g. plating of water samples or dilution-to-extinction series. However, most of their lifetime is spent in the attached-living stage. No universal technique is available to isolate new strains of attached-living bacteria. Special protocols have been developed for some groups, e.g. myxobacteria and vibrios (Farmer and Hickman-Brenner, 2006; Shimkets et al., 2006), but for every new organism a special isolation method has to be developed.

An attached-living marine bacterium is *Rhodopirellula baltica*. It belongs to the phylum of *Planctomycetes* within the PVC superphylum including the eponymous groups of *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* and *Chlamydiae* (Wagner and Horn, 2006). The cells proliferate by budding, hence Gimesi named the cells observed in a lake near to Budapest *Planctomyces* (Gimesi, 1924). *Planctomycetes* were observed in a large variety of different soil, freshwater and marine habitats (Liesack and Stackebrandt, 1992; Ward et al., 2006) including the deep-sea (Lopez-Garcia et al., 2001). They were even detected in the inner part of crustacean larvae and marine sponges (Pimentel-Elardo et al., 2003). The attached lifestyle served as explanation for blooms of *Planctomycetes* following algal blooms (Brümmer et al., 2004; Eiler and Bertilsson, 2004; Tadonleke, 2007). Several aerobic heterotrophic species are described: *Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*,

Gemmata, *Isophaera*, *Singulisphaera* and *Schlesneria* (Staley et al., 1980; Fuerst et al., 1997; Schlesner et al., 2004; Ward et al., 2006; Kulichevskaya et al., 2007; Kulichevskaya et al., 2008). All species share two special features: a peptidoglycan-less cell wall and an intracellular compartmentation. *Planctomycetes* are besides the *Chlamydiae* the only known bacteria with no peptidoglycan in their cell wall. It is stabilized by disulfide bonds of proteins. Due to this feature they are resistant to antibiotics interfering with the peptidoglycan synthesis. Cells are divided into the ribosomes and nucleic acid containing pirellulosom or riboplasm and the surrounding paryphoplasm. The intracellular compartmentation shows species-specific features (Lindsay et al., 1997).

In 2004 the genus *Pirellula* was divided into the genera *Pirellula*, *Blastopirellula* and *Rhodopirellula* (Schlesner et al., 2004). The genus *Rhodopirellula* consists of only one species, *Rhodopirellula baltica*. The type strain SH1 was isolated from the Bay of Kiel, a part of the Baltic Sea. Several isolates from this location over a long period of time demonstrated the permanent presence in this area (Schlesner et al., 2004). FISH studies counted up to 10^4 cells per ml of surface water (Gade et al., 2004). Other habitats of *Rhodopirellula baltica* were identified by FISH or clone library studies (Morris et al., 2006; Musat et al., 2006), but beside the strain collection of the Baltic Sea only one isolate was described, isolated from the inner part of the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* (Schlesner et al., 2004). An unknown pigment provides a red colour. The cells have a pear-like shape. Proliferation takes place by budding and the juvenile cell is motile by a flagellum. During maturation the cell loses the mobility and changes to a sessile lifestyle, enabled by the secretion of a holdfast substance at one cell pole (Gade et al., 2005).

Since genes close related to *Rhodopirellula baltica* were detected in different habitats all over the world (Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003; Woebken et al., 2007), we aimed to isolate new strains of *Rhodopirellula baltica* from European Seas. Only few isolates of this species were described, but details on the success rate of the isolation strategy were not provided (Schlesner, 1994; Schlesner et al., 2004; Gade et al., 2004). Therefore we tested

different approaches to develop an improved method for the isolation of the attached-living bacterium.

2. Materials and methods

2.1. Media

The following media were used with slight variations in salinity, carbon and nitrogen sources and antibiotics supplementation: M13a+AC (Schlesner, 1994; DSMZ medium 600a) contained peptone, yeast extract (both Difco Laboratories, Detroit, USA) and glucose (0.25 g/l of each) and was prepared with two times concentrated artificial sea water (Lyman and Fleming, 1940), pH 7.5 for liquid media and pH 8.5 for solid media. We used the metal salts solution 44 as originally published by Cohen-Bazire (1957). *Planctomycetes* media PLA-rich, PLA-NAcGI and PLA-BW were developed from media of Widdel and Bak (1992) and of Schlesner (1994). PLA-rich and PLA-NAcGI contained in 1l of medium: NaCl, 26.37 g; MgCl₂ x 6 H₂O, 5.67 g; MgSO₄ x 7 H₂O, 6.8 g; NaHCO₃, 0.19 g; CaCl₂ x 2 H₂O, 1.47 g; KCl, 0.72 g. The medium PLA-BW contained only half of these basal salts. All PLA-media included per l: KBr, 0.1 g; H₃BO₃, 0.02 g; SrCl₂, 0.02 g; NaF, 0.003 g, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 6.06 g; KH₂PO₄ solution (50 g/l), 10 ml; trace element solution (FeSO₄ x 7 H₂O, 2100 mg; Na₂-EDTA, 5200 mg; H₃BO₃, 30 mg; MnCl₂ x 4 H₂O, 100 mg; CoCl₂ x 6 H₂O, 190 mg; NiCl₂ x 6 H₂O, 24 mg; CuCl₂ x 2 H₂O, 10 mg; ZnSO₄ x 7 H₂O, 144 mg; Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 36 mg; double distilled H₂O, 1 l; pH adjusted to 6.0 with 5M NaOH), 2 ml; SeW solution (Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 18 mg; Na₂WO₄ x 2 H₂O, 18 mg; NaOH, 200 mg; double distilled H₂O, 1 l), 1 ml; 7-vitamin solution (after Widdel and Bak (1992) plus folic acid, 4 mg ; lipoic acid, 1.5 mg), 1 ml; vitamin B₁₂ solution (Widdel and Bak, 1992), 1 ml; riboflavin solution (5 mg in 100 ml 25 mM NaH₂PO₄ (pH 3.4)), 1 ml; thiamin solution (5 mg in 100 ml 25 mM NaH₂PO₄ (pH 3.4)), 1 ml; double distilled water, filled up to 1000 ml; as well as the antibiotics ampicillin and cycloheximide in a final concentration of 0.5 g/l. In PLA-rich and PLA-BW yeast extract,

peptone and glucose (each 0.25 g/l) were used as carbon and nitrogen source, in PLA-NAcGI 2.0 g/l of N-acetylglucosamine served as sole source for carbon and nitrogen. For solid medium 18 g of washed agar or Noble agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) were added and the pH was adjusted to 8.5, in liquid medium the pH was adjusted to 7.5. Sterile vitamin and additional solutions were added after autoclaving.

Before inoculation, the media received antibiotics: ampicillin and cycloheximide (0.2 g/l to 0.5 g/l), in addition streptomycin (0.5 g/l) or cycloserine (0.1 g/l) for isolation experiments.

2.2. Sampling procedure

One-hundred and thirty different samples of brackish and marine water, sediment and plankton samples were collected by members of the EU FP 6 NoE project MarBEF, colleagues from the Max Planck Institute and friends. Typically, 50 ml sterile plastic tubes were filled with samples, stored in the dark preferentially cold. Upon arrival in Bremen, samples were stored at 4°C in the dark. After arrival, sample containers were examined and aliquoted. For inoculation samples were stored at 4°C in original and in dilutions of 1:10 and 1:100 with ASW in smaller cups. Streaking on selective media was performed directly or after incubation at 4°C for two to 15 months.

2.3. Isolation procedure on plates

Solid media were inoculated with a sample volume of 50 µl and 200 µl (cycloheximide and ampicillin cultures) or of 100 µl. Plates were wrapped with Parafilm® to prevent evaporation and incubated at 24°C for approximately four weeks. A screening for light pink to dark red coloured colonies selected cells that were transferred by sterile toothpicks to a fresh plate of the same media. Remaining colony parts at the toothpick were used as template in a whole cell screening PCR with *Rhodospirellula* specific primers. After four weeks of incubation, grown colonies served as template for a second *Rhodospirellula* specific PCR. Colonies

showing a positive signal in one of the two PCRs were examined under a microscope and an isolation of strains was performed by streaking on plates with medium PLA-NacGI. All strains grew on N-acetylglucosamine and the intensity of the red colour was higher than on other media, simplifying the detection of contaminants. Only for permanently cold sample sites (Svalbard), additional plates were prepared and incubated at 12°C. All samples from the Baltic Sea were plated on PLA-BW plates.

2.4. High throughput isolation attempt

Petri dishes of a diameter of 150 mm were prepared with medium PLA-NAcGI and supplemented with ampicillin and cycloheximide. Water and sediment samples from Sylt were diluted with sterile artificial sea water (ASW) in 1:2, 1:4 and 1:8 dilutions and transferred with a 96-pin-holder; approximately 1 µl of liquid sample was transferred with one pin. Plates were dried for some minutes at room temperature to prevent mixing of liquid dots. After incubation at 24°C for four weeks, colonies were examined visually and screened with *Rhodopirellula*-specific PCR primers.

2.5. Microscopy

Cells of colonies were removed from the plate by a sterile toothpick and dispersed in a small volume of ASW. 20 µl of this suspension were then fixed on agar coated slides (Pfennig and Wagener, 1986) and examined and photographed under a microscope (Axioplan with AxioCam, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.6. PCR amplification of 16S rRNA gene sequence

For a fast screening of colonies, a PCR with specific primers for a part on the 16S rRNA gene of *Rhodopirellula* sp. was developed. Sequences of primers were modified after FISH

probes developed for *Rhodopirellula baltica* (Pir197F) and the *Planctomycetes* cluster with *Pirellula*, *Blastopirellula* and *Rhodopirellula* (Pla905R) (Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003). Amplifications were carried out in a final volume of 50 µl, containing 1 µl of template, 5 µl of 10x Buffer (100 mM Tris (pH 9.0), 500 mM KCl, 1.0% Triton-X-100, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT), 1 unit of *Taq* Polymerase, 1 µl of dNTPs (10 mM), 10 pmol of each primer and 40 µl of H₂O. PCR was performed with whole cells as template and reactions were carried out in a Eppendorf ThermoCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) with the following protocol: 4 min at 94°C for initial denaturation, followed by 30 cycles of 1 min 94°C, 1 min 55°C (ramp 3°C/s), 3 min 72°C and a final elongation for 10 min at 72°C. The amplicon was visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidiumbromide. Standard primer were applied to obtain the whole 16S rRNA gene sequence (Muyzer et al., 1995). Because of the low applicability of the general bacterial primer pair GM3 long (8-27F) (one mismatch) and GM4 (1507R) for *Planctomycetes*, new primers were developed for *Rhodopirellula baltica* covering the whole 16S rRNA gene by starting 114 bp in front of 16S rRNA gene and ending 86 bp after this gene sequence (Glöckner et al., 2003). The PCR conditions aforementioned were applied and the amplicons were sequenced. The reactions were analysed on a 3130XL system (Applied Biosystems, Foster City, USA). The sequences were manually examined with Applied Biosystems Sequencing Analysis 5.2. Sequence fragments were assembled with DNASTar Lasergene V6 SeqMan (DNASTAR, Madison, USA) and orientated at the 16S rRNA gene sequence of the type strain SH1^T. The sequences of the new isolates were imported into and aligned with the SILVA dataset (Pruesse et al., 2007) in the ARB software package (Ludwig et al., 2004) to construct phylogenetic trees.

2.7 Source of strains

Rhodopirellula baltica strains were kindly provided by Heinz Schlesner and were used for development and testing of new primers. The complete 16S rRNA gene sequences were deposited at GenBank database (Tab. 2).

3. Results

Schlesner (Schlesner, 1994) recommended for the isolation of *Rhodopirellula baltica* aerobic, heterotrophic growth on plates with a pH of 8.5 and ampicillin to suppress the growth of peptidoglycan-containing bacteria. Applying this strategy, samples from 59 locations were plated on PLA-rich (2, 20 and 200 μ l sample) and PLA-NAcGI (200 μ l sample). After four weeks of incubation, the samples revealed an average cultivable population of 10365 cfu/ml sample on PLA-rich and of 1018 cfu/ml sample on PLA-NAcGI, with a range of 0 to 117400 cfu/ml sample for the rich medium and 0 to 8800 cfu/ml sample with the medium with a single carbon and nitrogen source (Tab. 3). Samples with sediment revealed larger populations than sediment-free water samples (14462 cfu/ml versus 7920 cfu/ml and 1340 cfu/ml versus 930 cfu/ml, respectively). The *Rhodopirellula baltica* strain collection from the Baltic Sea showed a shade of colour in light pink to red. Hence, 917 colonies were selected from over 10000 colonies based on the pink to red colony colour for transfer on PLA-NAcGI in the presence of ampicillin. 875 colonies grew, but the PCR screening for *R. baltica* revealed only six candidates. The partial 16S rRNA gene sequence revealed three new isolates of *Rhodopirellula*. The screening of additionally 600 colonies yielded only one new isolate. Partial sequencing of the 16S rRNA gene of over 500 randomly selected ampicillin-resistant colonies indicated a dominance of *Gammaproteobacteria*, followed by *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* (data not shown).

A molecular study had detected an abundant population of *Planctomycetes* in the sandy sediments of Sylt, an island in Northern Germany (Musat et al., 2006). Our initial study revealed one ampicillin-resistant colony per μ l sample; hence a high throughput method was tested with a 96-pin holder and large 150mm plates. Two out of three 1 μ l-spots developed a colony, often a mixture of two colonies. Although many colonies from this sample site and from other sample sites were tested, no isolate of *Rhodopirellula* was obtained. We hypothesized that the absence of solid material in the inoculum, a one mikroliter drop, may

have excluded the transfer of the desired bacteria. In subsequent experiments, the inoculation with a large portion of sediment particles together with other antibiotics resulted in the isolation of strains from these samples.

Under the isolation conditions, the inhibitory effect of ampicillin on plates was undetectable, if the plates with the ampicillin were stored for 10 days at room temperature or 20 days at 4°C before inoculation (data not shown). Thus ampicillin is stable for a limited time and has likely no effect on slowly growing bacteria. To improve the selective pressure, cycloserine and streptomycin were tested as additional antibiotics on PLA-NAcGI. Cycloserine inhibits the enzymes of the cell wall synthesis (Curtiss et al., 1965). Streptomycin targets the small subunit of ribosomes in bacteria (Modolell and Davis, 1969). Both antibiotics reduced the colony-forming units per 100µl-sample with many sediment grains to 1 to 69 colonies per plate. On average 262 cfu per ml sample were obtained on plates with cycloserine and 107 cfu per ml sample grew in the presence of streptomycin. In total 145 cycloserine and 54 streptomycin-resistant, pink-to-red colonies yielded 25 and 33 new strains of the genus *Rhodopirellula*, respectively. The combined action of cycloserine and streptomycin also yielded 25 candidates and finally 8 new strains. The highest observed number of *Rhodopirellula baltica*-like colonies on one plate with 100 µl inoculum was 12 colonies from sample NW 104, Porto Cesareo, Italy. This plate yielded finally the strains CS65 to CS72, CS108 to CS110 and CS126.

The surface structure of the colonies varied with the isolation method and cultivation conditions. Strains isolated in the presence of streptomycin showed sometimes a smoother and stickier surface than the ones isolated with cycloserine. Whole cell PCR amplifications were rarely successful for cells grown in the presence of streptomycin and the yields of genomic DNA preparations were below average.

In summary, we obtained 70 new strains with characteristics similar to *Rhodopirellula baltica* from 19 of 130 samples. European isolates originated from Iceland to Greece with sample salinities from 21 to 38 PSU and *in situ* water temperatures from 5.2°C to 21°C. All new

strains were isolated on solid PLA-medium with N-acetylglucosamine as single C- and N-source, with the exception of strains K249 and K587. These were isolated on PLA-rich medium. The 16S rRNA gene sequences of the new isolates (above 1500 nucleotides) showed identities of 94% to 99% to the gene of the type strain *R. baltica* SH1^T. The phylogenetic analysis showed *Rhodopirellula baltica* as the closest taxonomically fully described relative to all isolates. So the 16S rRNA gene analysis suggests that all isolates can be classified within the genus *Rhodopirellula*. The new strains represent at least 6 species based on 3% 16S rRNA gene diversity. However, the recent change of the criterion for the species border from 97% to 98.7% identity (Stackebrandt and Ebers, 2006) supports the existence of at least 9 species in our isolates.

A comparison of 6 isolates from three samples of one site in Tjärnö, Sweden, and 25 isolates originating from one sample in Porto Cesareo, Italy, indicated a high local diversity. The 25 Italian strains from sample NW 104 had a 16S rRNA gene similarity of 96.7 to 99.94%. The 6 strains from Tjärnö had a 16S rRNA gene diversity of 0.2 to 5.4%. At this sample site several species of *Rhodopirellula* were present, whereas further studies are required to reveal the genetic differences between the Italian strains.

The newly developed screening-PCR worked fine for most of the control strains from the Schlesner collection. Only strain SH155 from the Bay of Kiel showed no PCR product, likely due to three sequence mismatches in the binding site of the forward primer Pir197F. Several sequences of isolated strains originating from Portugal (GenBank Accession No. DQ851134, EF589346, EF589348, EF589350-EF589353, EF421447-EF421450) showed the same mismatches. Thus the primer may be too specific and may eventually circumvent the isolation of more *Rhodopirellula* strains.

Microscopic analyses confirmed the genetic information. Phase contrast microscopy revealed the typical morphology of *Rhodopirellula* with pear shaped cells which attached to each other building rosettes. Budding cells were observed at the broader cell pole and motile cells were detected. Cell size varied between 1.0 - 1.5 μm and 2.0 - 3.0 μm . Cells in the

stationary phase grown on solid medium exhibited intracellular structures, visible by phase contrast microscopy (Fig. 2).

4. Discussion

Isolation procedures for attached-living bacteria have to include the environmental conditions of the sample and the physiology and cell cycle of the bacteria. For the isolation of soil living myxobacteria, attached by a slime matrix to compounds like bark and wood, inoculation of dilution-to-extinction series is unsuitable since the cells are not dispersed in water. Plating to obtain colony forming units usually underrepresent the myxobacterial population. Fungi may overgrow them, due to the slow growth rate of myxobacteria. Therefore the application of growth inhibitors of eukaryotes is recommended, e.g. cycloheximide. Formation of fruit bodies is one possibility for enrichment and isolation, but also baiting techniques were described (Shimkets et al., 2006). The isolation of *Vibrio fischerii* from marine habitats is unusual: the bacteria are attached to fishes, mollusks or squids. Parts or even whole animals are inoculated in sea water and light emitting surface parts indicate a successful enrichment. These parts are transferred for isolation (Farmer and Hickman-Brenner, 2006). Our high throughput approach for the isolation aimed at the free-living swarmer cells of *Rhodopirellula baltica*. The enrichment failed, likely because the concentration of swarmer cells was too low for a successful isolation. The intentional plating of particles provided a reliable access to *Rhodopirellula* isolates.

Apparently ampicillin-resistant bacteria were isolated in high numbers. One reason for the large populations is the limited stability of ampicillin in solution. Slow growing bacteria may endure the ampicillin in the first week of incubation. Most of the previous studies used an incubation time of 24 h, suitable only for fast growing bacteria, and obtained e.g. around 3000 ampicillin-resistant cfu per ml freshwater in average (Ash et al., 2002; Esiobu et al.,

2002). However, *Rhodopirellula* is slowly growing and needs long incubation times of up to four weeks.

The original isolation process of *Rhodopirellula* was performed by intensive microscopy of enrichment cultures and colonies. For the high throughput analyses of samples, we developed a specific PCR based on the 16S rRNA gene. Microscopy was applied as confirmatory tool to reveal the typical cell morphology and attachment of cells in rosettes. The low selectivity of ampicillin suggested experiments with other antibiotics. Cycloserine and streptomycin showed an excellent selectivity, reducing the cfu to 262 and 107 per ml sample, respectively. Both substances are synthesized by *Streptomyces* and occur naturally. Streptomycin-based isolations showed a higher efficiency, with 33 new isolated strains out of 54 tested colonies. These strains showed a slower growth and a higher phylogenetic variation than the isolates from cycloserine-treated cultures. Overall, the 16S rRNA gene sequences indicated a high relatedness of the isolates to the type strain of *Rhodopirellula baltica*. Further physiological and genetic studies are required to reveal the subtle differences between the strains and establish new species in the genus.

Conclusion

This study developed more selective conditions and a PCR-based screening method to obtain a large number of *Rhodopirellula* strains. A cornerstone is the incorporation of solid material in the inoculum. Ampicillin and cycloheximide together with cycloserine or streptomycin enabled the isolation on solid medium after incubation times of four weeks.

Acknowledgement

We would like to thank all sample contributors and Johanna Eden and Michael Roggenbruck for support in the laboratory. The project has received funding from the MarBEF Network of Excellence 'Marine Biodiversity and Ecosystem Functioning' which is funded by the Sustainable Development, Global Change and Ecosystems Programme of the European

Community's Sixth Framework Programme (contract no. GOCE-CT-2003-505446) and the Max Planck Society. This publication is contribution MPS-09016 of MarBEF.

References

- Ash, R.J., Mauck, B., Morgan, M., 2002. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 713-716.
- Brümmer, I.H.M., Felske, A.D.M., Wagner-Döbler, I., 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5094-5101.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R., Stanier, R.Y., 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol* 49, 25–68.
- Curtiss, R., Charamella, L.J., Berg, C.M., Harris, P.E., 1965. Kinetic and genetic analyses of D-cycloserine inhibition and resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 90, 1238-1250.
- Eiler, A., Bertilsson, S., 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* 6, 1228-1243.
- Esiobu, N., Armenta, L., Ike, J., 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. *Int. J. Environ. Health Res.* 12, 133-144.
- Farmer, J., Hickman-Brenner, F., 2006. The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 508-563.

- Flemming, H.C., 2002. Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 629-640.
- Fuerst, J.A., Gwilliam, H.G., Lindsay, M., Lichanska, A., Belcher, C., Vickers, J.E., Hugenholtz, P., 1997. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 254-262.
- Gade, D., Stührmann, T., Reinhardt, R., Rabus, R., 2005. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. *Environ. Microbiol.* 7, 1074-1084.
- Gade, D., Schlesner, H., Glöckner, F.O., Amann, R., Pfeiffer, S., Thomm, A., 2004. Identification of planctomyces with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. *Microb. Ecol.* 47, 243-251.
- Gimesi, N., 1924. Hydrobiologiai Tanulmányok [Hydrobiological studies]. I. *Planctomyces Bekefii* Gim. nov. gen. et sp. [Hungarian with German translation]. Budapest: Kiadja a Magyar Ciszterci Rend, 1–8.
- Glöckner, F.O., 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.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Damste, J.S.S., Dedysh, S.N., 2008. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1186-1193.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Belova, S.E., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Rijpstra, W.I.C., Damste, J.S.S., Zavarzin, G.A., Dedysh, S.N., 2007. *Schlesneria paludicola*

- gen. nov., sp nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2680-2687.
- Liesack, W., Stackebrandt, E., 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174, 5072-5078.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Fuerst, J.A., 1997. Pirellosomes - a new type of membrane-bounded cell compartment in *Planctomycete* bacteria of the genus *Pirellula*. *Microbiology* 143, 739-748.
- Lopez-Garcia, P., Lopez-Lopez, A., Moreira, D., Rodriguez-Valera, F., 2001. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 193–202.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Rumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., List, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- Lyman, J., Fleming, R.H., 1940. Composition of sea water. *J. Marine Research* (Sears Foundation) 3, 134–146.
- Marshall, K.C., 2006. Planktonic versus sessile life of prokaryotes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 3–15.
- Modolell, J., Davis, B.D., 1969. Mechanism of inhibition of ribosomes by streptomycin. *Nature* 224, 345-348.

- Morris, R.M., Longnecker, K., Giovannoni, S.J., 2006. *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environ. Microbiol.* 8, 1361-1370.
- Mueller, R.S., McDougald, D., Cusumano, D., Sodhi, N., Kjelleberg, S., Azam, F., Bartlett, D.H., 2007. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *J. Bacteriol.* 189, 5348-5360.
- Musat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., van Beusekom, J.E.E., 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.
- Muyzer, G., Teske A, Wirsén C.O., Jannasch H.W., 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164, 165-172.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.H., 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144, 3257-3266.
- Pfennig, N., Wagener, S., 1986. An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 4, 303-306.
- Pimentel-Elardo, S., Wehrl, M., Friedrich, A.B., Jensen, P.R., Hentschel, U., 2003. Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 239-245.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188-7196.

- 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, B.J., 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.
- Shimkets, L., Dworkin, M., Reichenbach, H., 2006. The Myxobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 31-115.
- Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33, 152-155.
- Staley, J.T., Marshall, K.C., Skerman, V.B.D., 1980. Budding and prosthecate bacteria from freshwater habitats of various trophic states. *Microb. Ecol* 5, 245-251.
- 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.
- Wagner, M., Horn, M., 2006. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 241-249.
- Ward, N., Staley, J., Fuerst, J., Giovannoni, S., Schlesner, H., Stackebrandt, E., 2006. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and

-
- Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 757–793.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- Widdel, F., Bak, F., 1992. Gram-negative mesophilic sulphate-reducing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 3352–3378.
- Wobken, D., Teeling, H., Wecker, P., Dumitriu, A., Kostadinov, I., DeLong, E.F., Amann, R., Glöckner, F.O., 2007. From the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with *Planctomycete* genomes. *ISME J.* 1, 419-435.

Fig. 1: Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of new isolates and the SILVA database references, calculated with the maximum likelihood method (RaxML). Bar = 10% of estimated sequence divergence.

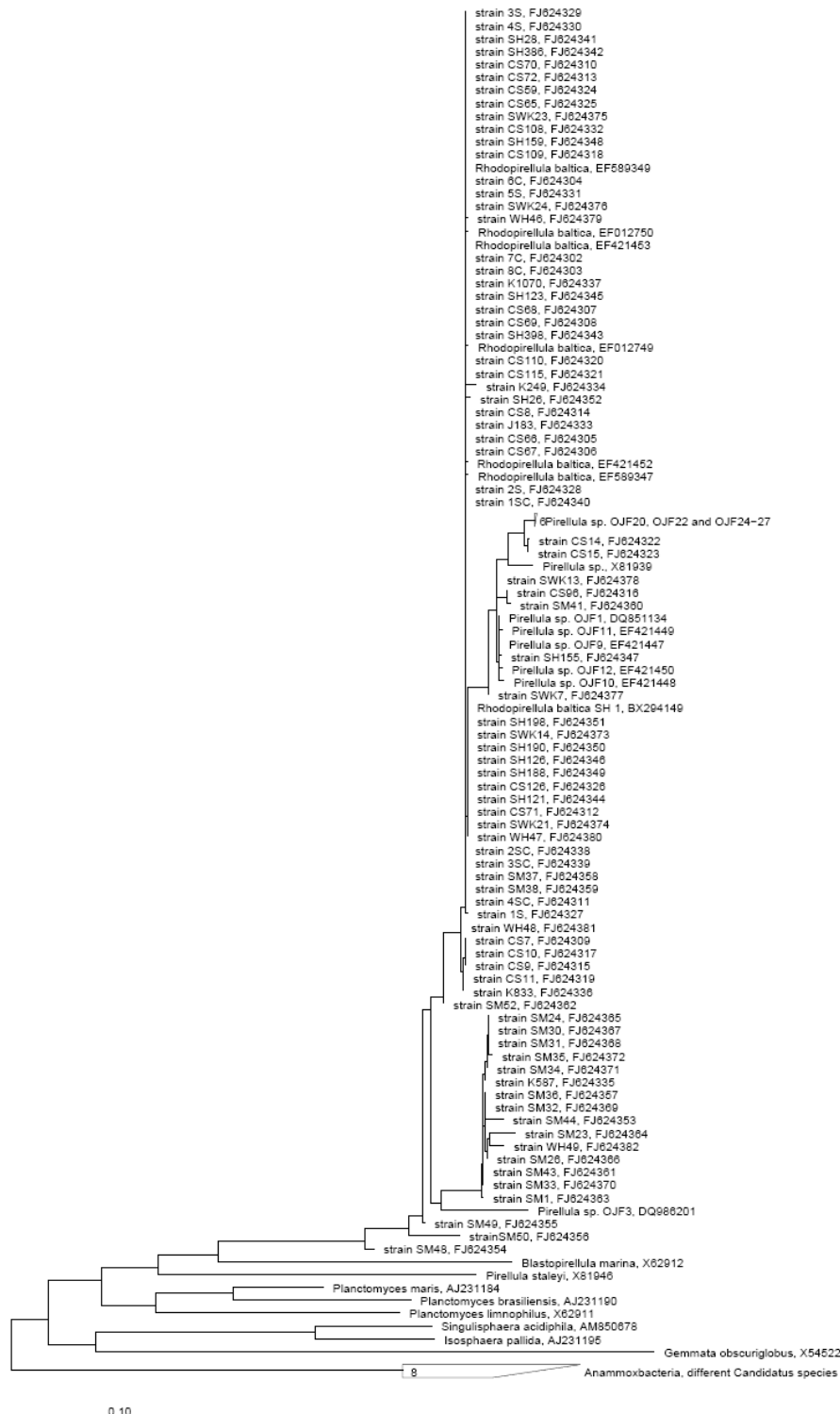
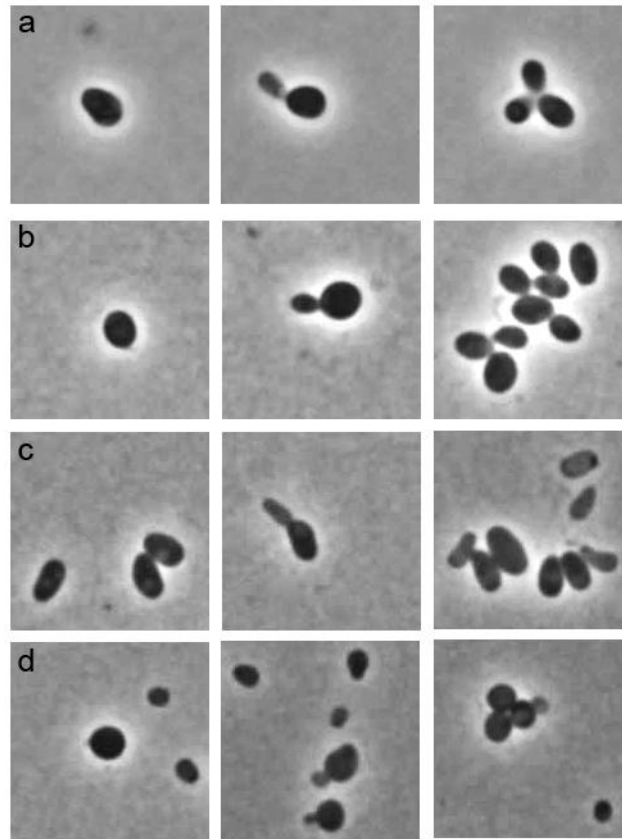


Fig. 2: Microscopic pictures of *Rhodopirellula baltica* strain SH26 (a) and the new isolates 6C (b), CS14 (c) and K587 (d). Each picture represents 10.3 x 10.3 μm .



Tab. 1: Primer used in this study

Name	Sequence	16S rRNA gene position in <i>Escherichia coli</i>	Source
<i>Universal 16S rRNA gene primer</i>			
GM1	GCCAGCAGCCGCGGTAAT	517-534F	Muyzer et al., 1995
GM3 long	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8-27F	Weisburg et al., 1991
GM4	TACCTTGTTACGACTT	1507-1492R	Muyzer et al., 1995
<i>Primer specific for R. baltica</i>			
Pir197F	ATGGTGAGATTCCGCTCGAG	197-216F	Pimentel-Elardo et al., 2003
Pla905R	GCCTTGCGACCATACTCCC	904-886R	Neef et al., 1998
Rb-114	CGAATCGCGGGGTCTTTTAC	(-98)-(-80)F	This study
Rb+206	TTCTGTTGAGTGGTTGCGAGTGTC	(+83)-(+59)R	This study
Rb771	AGCGCATCACTGGGTCTTTTCT	730-751F	This study
Rb560	TGGGCTTTCACATCTCACCTTCT	614-592R	This study

Pla905R is specific for all described *Planctomycetes*

Tab. 2: Strains in this study, listed by their type of isolation. Abbreviations in names indicates the selective conditions: CS or only C isolated with cycloserine, SM or only S or J streptomycin, SC streptomycin and cycloserine, K only ampicillin and cycloheximide, SWK is for Swedish colonies isolated with streptomycin, WH isolated with streptomycin and cycloserine, SH strains originate from the strain collection Heinz Schlesner, described in Schlesner et al., 2004.

Sample types indicate S for sediment sample, W for water, S+W for a mixture of sediment and water, P for planktonic sample and A for algae surface.

Strain	Sample	Type	Sampling date	Place	Accession No. NCBI
CS7	23	S	'03.2005	Yerseke, Netherlands	FJ624309
CS8	23	S	'03.2005	Yerseke, Netherlands	FJ624314
CS9	23	S	'03.2005	Yerseke, Netherlands	FJ624315
CS10	23	S	'03.2005	Yerseke, Netherlands	FJ624317
CS11	23	S	'03.2005	Yerseke, Netherlands	FJ624319
CS14	21	S	'03.2005	Brest, France	FJ624322
CS15	21	S	'03.2005	Brest, France	FJ624323
CS59	93	S	29.12.2005	Pireaus, Greece	FJ624324
CS65	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624325
CS66	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624305
CS67	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624306
CS68	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624307
CS69	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624308
CS70	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624310
CS71	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624312
CS72	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624313
CS96	107	S+W	11.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624316
CS108	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624332
CS109	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624318
CS110	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624320
CS115	93	S	29.12.2005	Pireaus, Greece	FJ624321
CS126	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624326

SM1	9	S	05.03.2005	Mallorca Pt Andratx, Spain	FJ624363
SM23	95	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624364
SM24	95	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624365
SM26	95	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624366
SM30	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624367
SM31	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624368
SM32	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624369
SM33	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624370
SM34	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624371
SM35	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624372
SM36	102	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624357
SM37	116	W	06.06.2006	Elba, Italy	FJ624358
SM38	116	W	06.06.2006	Elba, Italy	FJ624359
SM41	107	S+W	11.05.2006	San Cataldo, Italy	FJ624360
SM43	95	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624361
SM44	95	S	17.02.2006	Panglao Island, Philippines	FJ624353
SM48	89	S+W	09.09.2005	Port-de-mer Cancale, France	FJ624354
SM49	97	W	'03.2006	Dar Es Salaam, Tanzania	FJ624355
SM50	107	S+W	11.05.2006	San Cataldo, Italy	FJ624356
SM52	116	W	06.06.2006	Elba, Italy	FJ624362
1S	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624327
2S	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624328
3S	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624329
4S	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624330
5S	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624331
6C	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624304
7C	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624302
8C	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624303
1SC	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624340
2SC	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624338
3SC	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624339
4SC	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624311
K249	16	W	'03.2005	St. Andrews, UK	FJ624334
K587	34	P	15.03.2005	Oostende, Belgium	FJ624335
K833	54	W	18.05.2005	Sandgerdi, Iceland	FJ624336

K1070	67	W	06.07.2005	Helgoland, Germany	FJ624337
SWK7	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624377
SWK13	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624378
SWK14	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624373
SWK21	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624374
SWK23	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624375
SWK24	122	A	'09.2006	Tjörn, Sweden	FJ624376
J183	104	W	10.05.2006	Porto Cesareo, Italy	FJ624333
WH46	124	S	'10.2006	Sylt, Germany	FJ624379
WH47	124	S	'10.2006	Sylt, Germany	FJ624380
WH48	124	S	'10.2006	Sylt, Germany	FJ624381
WH49	124	S	'10.2006	Sylt, Germany	FJ624382
SH26 (=IFAM 1429)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624352
SH28 (=IFAM 1430)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624341
SH121 (=IFAM 1433)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624344
SH123 (=IFAM 1434)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624345
SH126 (=IFAM 1435)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624346
SH155 (=IFAM 1436)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624347
SH159 (=IFAM 1455)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624348
SH188 (=IFAM 1580)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624349
SH190 (=IFAM 1582)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624350
SH198 (=IFAM 1735)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624351
SH386 (=IFAM 3184)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624342
SH398 (=IFAM 3246)		Schlesner et al., 2004		Kiel Fjord, Germany	FJ624343

Tab. 3. Sample site description, apparently ampicillin-resistant population sizes and isolation success.

ID of sample site	geographic location		sample type	salinity (PSU)	temperature (°C)	population (cfu per ml)		total inoculated volume ^a	number of isolates
	latitude	longitude				on PLA-rich	on PLA-NAcGI		
1	39°31'02'' N	2°28'41'' O	W	37.6	14	2089	2170	1392µl	0
2	39° 22'06'' N	3°13'57'' O	W	37.3	14	125	15	1392µl	0
3	39°32'46'' N	2°23'10'' O	W	37.6	14	2498	208	1392µl	0
4	39°31'03'' N	2°32'26'' O	W	37.6	14	5088	895	1392µl	0
5	39°22'06'' N	3°13'57'' O	W	37.3	14	200	5	1392µl	0
6	39°22'06'' N	3°13'57'' O	S	37.3	14	388	815	1392µl	0
7	39°31'02'' N	2°28'41'' O	S	37.6	14	746	198	1392µl	0
8	39°31'03'' N	2°32'26'' O	S	37.6	14	2688	1415	1492µl	0
9	39°32'46'' N	2°23'10'' O	S	37.6	14	735	333	1492µl	1
10	45°21'30'' N	26°42'46'' O	S	40	12	0	0	1492µl	0
11	69°39'19'' N	18°52'02'' O	W	33.8	3	1245	0	572µl	0
12	69°39'19'' N	18°52'02'' O	S	33.8	3	3463	10	672µl	0
13	54°27'01'' N	18°34'21'' O	W	7.4	2	412	25	572µl	0
14	54°27'01'' N	18°34'21'' O	S	7.4	2	650	5	672µl	0
15	56°20'07'' N	2°46'45'' W	W	33.9	5	280	65	672µl	0
16	56°20'07'' N	2°46'45'' W	W	33.9	5	278	0	572µl	1
17	56°20'07'' N	2°46'45'' W	S	33.9	5	2725	55	672µl	0
18	56°22'09'' N	2°49'42'' W	S	33.8	5	82500	20	572µl	0
19	48°21'25'' N	4°31'57'' W	W	34.3	9	2597	70	572µl	0
20	48°21'25'' N	4°31'57'' W	W	34.3	9	1430	0	672µl	0
21	48°21'25'' N	4°31'57'' W	S	34.3	9	50	190	572µl	2
22	51°29'40'' N	4°03'30'' O	W	21.6	6	150	125	572µl	0
23	51°29'40'' N	4°03'30'' O	S	21.6	6	14177	45	572µl	5
24	51°29'40'' N	4°03'30'' O	P	21.6	6	4700	0	672µl	0
25	41°09'37'' N	8°41'13'' W	W	35.7	14	318	1440	672µl	0
26	41°09'37'' N	8°41'13'' W	S	35.7	14	4325	120	672µl	0
27	41°09'37'' N	8°41'13'' W	W	35.7	14	155	0	572µl	0
28	41°09'37'' N	8°41'13'' W	S	35.7	14	20	420	572µl	0
29	35°20'00'' N	25°14'13'' O	W	39	16	200	0	572µl	0
30	35°20'00'' N	25°14'13'' O	W	39	16	123	0	572µl	0
31	35°20'00'' N	25°14'13'' O	W	39	16	53	225	672µl	0
32	51°13'38'' N	2°53'53'' O	W	33.2	6	60	205	572µl	0
33	51°13'38'' N	2°53'53'' O	S	33.2	6	1500	110	572µl	0
34	51°13'38'' N	2°53'53'' O	P	33.2	6	725	40	672µl	1
35	53°41'54'' N	7°34'14'' O	W	28.6	4	33	0	572µl	0
36	53°41'54'' N	7°34'14'' O	S	28.6	4	6000	170	672µl	0
37	57°19'43'' N	10°32'07'' O	S	25.7	5	5	40	672µl	0
38	55°40'16'' N	12°34'52'' O	W	12.4	2	5002	1800	894µl	0
39	55°40'16'' N	12°34'52'' O	W	12.4	2	16543	0	794µl	0
40	37°36'54'' N	15°10'28'' O	W	38.2	14	13	210	572µl	0
41	37°36'54'' N	15°10'28'' O	S	38.2	14	2180	700	572µl	0
42	53°46'52'' N	7°41'29'' O	S	28.6	4	1827	5	572µl	0
43	52°58'40'' N	4°44'29'' O	P	32.5	5	0	0	~800µl	0
44	52°58'40'' N	4°44'29'' O	P	32.5	5	0	0	~800µl	0
45	22°40'34'' S	14°31'11'' O	P	35.2	17	0	0	~800µl	0
46	43°37'22'' N	13°29'17'' O	W	37.1	11	0	0	~800µl	0
47	40°47'40'' N	14°11'37'' O	P	37.4	14	0	0	~800µl	0
48	32°08'49'' S	52°05'34'' W	W	26	24	0	0	~800µl	0
49	42°45'05'' S	65°01'13'' W	W	34	17	0	0	~800µl	0
50	38°57'21'' N	20°45'39'' O	W	38	16	12780	4760	572µl	0
51	38°57'21'' N	20°45'39'' O	S	38	16	98450	3280	672µl	0
52	65°45'11'' N	14°11'37'' W	W	34.3	2	117400	2720	572µl	0
53	65°45'11'' N	14°11'37'' W	S	34.3	2	11127	1960	672µl	0
54	64°02'08'' N	22°41'55'' W	W	34.6	7	7283	400	672µl	1
55	64°02'08'' N	22°41'55'' W	S	34.6	7	26353	5140	572µl	0

56	54°22'53''N	13°43'42''O	W	7.7	13	23760	8800	572µl	0
57	54°22'53''N	13°43'42''O	S	7.7	13	60160	5140	572µl	0
58	54°16'30''N	13°40'60''O	W	7.4	11	13747	3140	572µl	0
59	54°16'30''N	13°40'60''O	S	7.4	11	15630	1400	672µl	0
60	53°15'35''N	6°06'37''W	W	34	12	nd	nd	672µl	0
61	53°15'35''N	6°06'37''W	S	34	12	nd	nd	572µl	0
62	43°17'43''N	5°21'20''O	W	37	19	nd	nd	572µl	0
63	43°17'43''N	5°21'20''O	W	37	19	nd	nd	572µl	0
64	43°17'43''N	5°21'20''O	S+W	37	19	nd	nd	672µl	0
65	54°10'38''N	7°53'36''O	P	32.7	10	nd	nd	672µl	0
66	54°10'38''N	7°53'36''O	A	32.6	16	nd	nd	572µl	0
67	54°10'38''N	7°53'36''O	W	32.6	16	nd	nd	572µl	1
68	54°10'38''N	7°53'36''O	P	32.7	10	nd	nd	572µl	0
69	80°01'50''N	18°01'10''O	W	34	-0.4	nd	nd	572µl	0
70	80°01'50''N	18°01'10''O	S	34	-0.4	nd	nd	572µl	0
71	75°40'08''N	31°48'07''O	S	34.7	0.4	nd	nd	672µl	0
72	75°40'08''N	31°48'07''O	W	34.7	0.4	nd	nd	572µl	0
73	58°20'13''N	16°48'47''O	W	6.7	16	nd	nd	572µl	0
74	58°20'13''N	16°48'47''O	S	6.7	16	nd	nd	672µl	0
75	58°15'00''N	11°27'06''O	W	27.7	9	nd	nd	572µl	0
76	58°15'00''N	11°27'06''O	S	27.7	9	nd	nd	672µl	0
77	58°19'22''N	16°54'19''O	W	6.7	16	nd	nd	672µl	0
78	58°19'22''N	16°54'19''O	S	6.7	16	nd	nd	572µl	0
79	42°35'22''N	10°05'48''O	W	37.9	24	nd	nd	572µl	0
80	42°35'22''N	10°05'48''O	S	37.9	24	nd	nd	672µl	0
81	42°35'22''N	10°05'48''O	W	37.9	24	nd	nd	572µl	0
82	42°35'22''N	10°05'48''O	S	37.9	24	nd	nd	572µl	0
83	41°22'44''N	2°11'41''O	W	37.8	21	nd	nd	572µl	0
84	41°22'44''N	2°11'41''O	S	37.8	21	nd	nd	672µl	0
85	68°22'09''N	14°21'34''O	S+W	33.1	8	nd	nd	572µl	0
86	36°59'00''N	7°58'24''W	S+W	36.2	20	nd	nd	100µl	0
87	37°42'48''N	8°47'45''W	S+W	36.2	19	nd	nd	200µl	0
88	48°38'59''N	1°30'32''W	S+W	35.1	17	nd	nd	100µl	0
89	48°41'58''N	1°50'57''W	S+W	35.1	17	nd	nd	200µl	1
90	49°29'35''N	0°05'18''O	W	34.6	17	nd	nd	100µl	0
91	49°29'35''N	0°05'18''O	S	34.6	17	nd	nd	200µl	0
92	37°56'17''N	23°37'25''O	W	38.2	16	nd	nd	100µl	0
93	37°46'23''N	23°33'35''O	S	38.2	16	nd	nd	200µl	2
94	9°32'53''N	123°46'45''O	S	34.2	26	nd	nd	100µl	0
95	9°32'53''N	123°46'45''O	S	34.2	26	nd	nd	200µl	5
96	6°48'48''S	39°18'2''O	W	35	29	nd	nd	100µl	0
97	6°48'48''S	39°18'2''O	W	35	29	nd	nd	200µl	1
98	6°48'48''S	39°18'2''O	W	35	29	nd	nd	100µl	0
99	29°32'19''N	34°57'3''O	W	40.7*	21.5*	nd	nd	200µl	0
100	29°33'42''N	34°58'8''O	W	~359*	20.5*	nd	nd	100µl	0
101	29°33'42''N	34°58'8''O	W	190*	20.5*	nd	nd	200µl	0
102	9°32'53''N	123°46'45''O	S	34.2	26	nd	nd	200µl	7
103	9°32'53''N	123°46'45''O	S	34.2	26	nd	nd	100µl	0
104	40°15'35''N	17°53'28''O	W	38	21	nd	nd	400µl	25
105	40°15'41''N	17°53'21''O	W	38	21	nd	nd	200µl	0
106	40°23'04''N	18°18'18''O	S+W	38	18	nd	nd	400µl	0
107	40°23'04''N	18°18'18''O	S+W	38	18	nd	nd	200µl	3
108	54°60'0''N	19°09'90''O	W	6.9*	4.0*	nd	nd	200µl	0
109	54°83'3''N	19°31'40''O	W	7.4*	3.1*	nd	nd	200µl	0
110	55°60'0''N	18°43'10''O	W	7.2*	3.0*	nd	nd	200µl	0
111	55°21'40''N	16°94'50''O	W	7.4*	3.2*	nd	nd	200µl	0
112	55°66'70''N	15°66'90''O	W	7.3*	3.6*	nd	nd	200µl	0
113	55°66'80''N	14°72'8''O	W	7.2*	3.3*	nd	nd	200µl	0
114	54°66'90''N	15°00'0''O	W	7.3*	4.2*	nd	nd	200µl	0
115	54°43'52''N	8°41'40''O	W	29.9	14	nd	nd	200µl	0
116	42°43'55''N	10°09'16O	W	37.8	21	nd	nd	200µl	4
117	42°43'55''N	10°09'16O	W	37.8	21	nd	nd	100µl	0
118	42°43'55''N	10°09'16O	W	37.8	21	nd	nd	200µl	0

119	42°43'55''N	10°09'16O	W	37.8	21	nd	nd	100µl	0
120	53°06'20''N	4°43'32''O	W	33.3	16	nd	nd	100µl	0
121	53°06'20''N	4°43'32''O	S	33.3	16	nd	nd	100µl	0
122	58°52'35''N	11°08'41''O	W+A	27.7	15	nd	nd	2400µl	6
123	53°52'46''N	8°41'31''O	W+A	28.4	16	nd	nd	200µl	0
124	55°02'36''N	8°24'57''O	S+W	31	15.7*	nd	nd	1000µl	4
125	37°39'22''N	24°01'14''O	W	38.3	23	nd	nd	200µl	0
126	45°21'14''N	29°39'45''O	W	FW	nd	nd	nd	200µl	0
127	45°11'31''N	28°47'10''O	W	FW	nd	nd	nd	200µl	0
128	48°10'28''N	17°09'36''O	W	FW	nd	nd	nd	200µl	0
129	37°44'07''N	20°58'16''O	S+W	38.5	26	nd	nd	200µl	0
130	54°10'50''N	12°04'26''O	S+W	11*	2	nd	nd	200µl	0

^a without samples used in the 96-pin-high throughput approach

FW indicates freshwater, nd indicates not determined

Sample 122 was divided into several subsamples, including algae.

Data for salinity and temperature were interpolated by the software World Ocean Atlas (WOA05) Extractor (<http://www.megx.net/gms/tools/woa.html>), only *data were measured.

Diversity analysis of *Rhodopirellula* isolates from European Seas applying a multilocus sequence analysis

Nadine Winkelmann (1), Ulrike Jaekel (1), Carolin Meyer (2), Wilbert Serrano (3), Reinhard Rachel (2), Ramon Rossello-Mora (4) and Jens Harder (1)

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

(2) University of Regensburg, Center for EM (NWF III, Institute for Anatomy), D-93053 Regensburg, Germany

(3) University of Bremen, Department for Marine Microbiology, UFT, D-28359 Bremen, Germany

(4) Marine Microbiology Group at IMEDEA, E- 07190 Esporles, Illes Balears, Spain

Corresponding author: Jens Harder, Max Planck Institute for Marine Microbiology,

Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany,

Tel.: +49 421 2028 750; fax: +49 421 2028 580;

E-mail-address: jharder@mpi-bremen.de

Manuscript in preparation

Keywords: MLSA, *Planctomyces*, intracellular compartmentation

Abstract

In the biogeography of microorganisms, the habitat size of an attached-living bacterium has never been investigated. We approached this theme by the isolation of 70 new strains of *Rhodopirellula* sp., an attached-living *planctomyces*. To overcome the limited taxonomic resolution of the 16S rRNA gene, we developed a multi locus sequence analysis (MLSA) for *R. baltica* to characterize the strains genetically on the species level. The alleles of the nine housekeeping genes acetyl coenzyme A synthetase (*acsA*), GMP-synthetase (*guaA*), anthranilate synthase component 1 (*trpE*), phosphoribosylaminoimidazolecarboxamidase (*purH*), glycerol facilitator uptake protein (*glpF*), fumarate hydratase (*fumC*), isocitrate dehydrogenase (*icd*) serine hydroxymethyltransferase (*glyA*) and malate dehydrogenase (*mdh*) indicated the presence of 13 genetically defined operational taxonomic units (OUT) in our culture collection. DNA-DNA hybridizations confirmed the overlap of the MLSA-based OTUs with the species concept. BOX-PCR was applied to two closely related units and supported the MLSA-based differentiation. Electron microscopy revealed morphological differences and common features, e.g. the intracytoplasmic compartmentation which is typical for *Planctomyces*. This genetic study established a high cultivable diversity of *Rhodopirellula* species in European Seas, with one new species present from the North Sea to the Mediterranean and several species with an apparently local occurrence.

Introduction

The biogeography of microorganisms is describing the habitat size and the distribution of microorganisms on Earth. The experimental approaches are vastly different. Environmental microbiologists often apply genetic fingerprints with up to 200 bands or fragments representing the whole community. Although the taxonomic resolution of these operational taxonomic units (OTU) is limited, differences in the populations suggested local populations (Martiny et al., 2006). Medical microbiologists analyze the alleles of genes of microorganisms to gain insight into the epidemiology of the pathogens (Achtman, 2008). This strain-specific fine-scale taxonomic resolution within a species is well suited to observe recent dispersal events. On the species level, the multi locus sequence typing (MLST) or analysis (MLSA), which were developed for intra-species and intra-genus specific studies, respectively, consists of the sequence of several, at least seven housekeeping gene fragments concatenated to an approximately five kilo base alignment (Maiden et al., 1998). Recent MLSA studies revealed the applicability to marine isolates: an epipelagic clade of *Alteromonas macleodii* isolates exists beside an abyssal clade (Ivars-Martinez et al., 2008), and coastal isolates are genetically well separated from oceanic strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Khan et al., 2008). The technique MLSA was shown to be comparable with DNA-DNA hybridizations, the traditional technique to assign strains to species. Several studies used this technique for delineation of new species, e. g. for *Vibrio* and *Ensifer* species (Martens et al., 2007; Thompson et al., 2007).

In the biogeography of microorganisms, the experimental proof for a local genetic evolution was revealed first on sample sites that were physically separated over 18000 km (Whittaker et al., 2003). Large populations and the small size of microbes have been considered as facilitators for a dispersal over long distances, eventually finally establishing cosmopolitan microbial populations. To the opposite, the smallest spatial scale of a microbial species in an open system with a good dispersal has not been investigated. Attached-living bacteria

disperse only during a distinct short time span in their life. This limitation stimulated this study on the biogeography of *Rhodopirellula baltica* in European Seas.

Rhodopirellula baltica is a *planctomycete* with the typical morphological features. The peptidoglycan less bacteria have an intracellular compartmentation, the riboplasm with the nucleoid is separated by a membrane from the surrounding paryphoplasm. Cells attach with a hold fast substance to surfaces or in culture to themselves forming typical rosettes. Proliferation occurs by budding and offspring cells live planktonic, motile with a flagellum, until they settle on the sediment (Gade et al., 2004).

We recently isolated seventy strains of *Rhodopirellula* sp. from European, Asian and African water samples (Winkelmann and Harder, 2009). Sequencing of 16S rRNA gene revealed a high similarity and a close relationship to the type strain SH1 of *Rhodopirellula baltica*. To gain insight into the genetic structure of the isolates, we developed a multilocus sequence analyses and applied it to the strain collection. The MLSA results were calibrated with a DNA-DNA hybridization study. The closely related strains were additionally characterized by BOX-PCR, a fingerprint method (Louws et al., 1997). Transmission electron microscopy was performed on some isolates to support the identification as *Planctomycetes*.

Materials and Methods

***Rhodopirellula* strain collection.** Strains included in this study were the type strain of *R. baltica*, SH1T (DSM 10527T = IFAM 1310T = NCIMB 13988T), a collection of *Rhodopirellula baltica* from the Bay of Kiel (obtained from H. Schlesner) and isolates from Europe, Tanzania and the Philippines (Winkelmann and Harder, 2009). Biomass was obtained from liquid cultures or colonies on plates grown on N-acetylglucosamine (Winkelmann and Harder, 2009).

DNA isolation. Genomic DNA was isolated according to Marmur (1961) or with a genomic DNA isolation spin kit (Qiagen, Hilden, Germany).

MLSA design and performance. Candidate housekeeping genes were taken from established MLSA schemes for *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bordetella pertussis* and *Haemophilus influenza* (www.mlst.net, Aanensen and Spratt, 2005). The gene presence as single copy in the genome of *R. baltica* SH1T and its position outside of the inversion region between 0.0 to 0.4 Mb (Glöckner et al, 2003) were confirmed. Primers were designed in Lasergene 6.0 (DNASStar, Madison, USA) (Tab. 1) and the primer specificity was established by BLAST searches against the nucleotide database and the genomes of *R. baltica* and *Blastopirellula marina*. The primers were tested with genomic DNA of the type strain SH1 and strains SH190, SH198 and SH286. Amplifications were performed in a final volume of 50 µl, containing 1 to 2 µl of template (approx. 50 to 200 ng DNA), 5 µl of 10x Buffer (100 mM Tris (pH 9.0), 500 mM KCl, 1.0% Triton-X-100, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT), 1 unit of *Taq* Polymerase, 1 µl of dNTPs (10 mM), 10 pmole of each primer and up to 40 µl of H₂O. The cycler programme was: 4 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min 94°C, 1 min 60°C (ramp 1°C/s), 3 min 72°C and a final elongation for 10 min at 72°C. The amplicons were visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidiumbromide for quantification. Gradient PCRs determined optimal annealing temperatures. Amplicons were purified by size exclusion chromatography and sequenced. The reactions were separated on Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzers. Sequences were manually examined with Applied Biosystems Sequencing Analysis 5.2 and assembled in Lasergene with the assistance of corresponding gene sequence of the type strain SH1T. Sequences were imported to the ARB software packages (Ludwig et al., 2004) and aligned by ClustalW. Maximum Likelihood, Maximum Parsimony and Neighbour Joining were performed to calculate trees of single gene loci or concatenated sequences of two or 9 housekeeping genes. Similarity matrices were calculated in ARB on the nucleotide level, since the resolution on amino acid level is too low for closely related organisms.

G+C content determination. DNA was isolated using the classical method of Marmur (1961) modified by a final dialysis on a 0.025 μm pore size membrane (Millipore, Billerica, USA) against 0.1x SSC buffer. The mol % G+C of genomic DNA was determined by thermal denaturation in 0.1x SSC buffer according to Marmur and Doty (1962) using a model DU-640 Beckman spectrophotometer equipped with a thermostated multicell changer and a temperature controller. Genomic DNA from *E. coli* K12 (G+C content, 51 mol%), and *Bacillus subtilis* DNA (G+C content, 43 mol%) were used as standards.

DNA-DNA-hybridization. DNA-DNA-hybridization was performed according to the protocol of Ziemke (1998).

BOX-PCR. The method described by Sikorski and colleagues (1999) was performed. PCR products were visualized on a 1.5% agarose gel, stained with ethidiumbromide and documented by a UV-light detection system. Amplicon pictures were analysed in the Totallab TL120 v2006e packages (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne, UK) to obtain binary matrices and calculate trees according to the unweighted pair group method of analysis (UPGMA).

Electron microscopy. Cells were prepared for transmission electron microscopy as described in detail elsewhere (Junglas et al., 2008; Rachel et al., 2002). In brief, for visualizing whole cells, cells in suspension were chemically fixed by adding glutaraldehyde (final conc.: 2%), concentrated by brief centrifugation, applied onto carbon-coated copper grids, and shadowed with 1 nm Pt/C (angle: 15 deg). For freeze-etching, unfixed, concentrated cells were quickly frozen in liquid nitrogen, fractured in a high-vacuum chamber (CFE 50, Cressington, Watford, England), etched for 4 min, and shadowed with 1 nm Pt/C (45 deg) and 10 nm C (90 deg). For ultrathin sections, a pellet of unfixed cells was immobilized by high-pressure freezing (Leica EM-PACT2), freeze-substituted in acetone / 2% OsO₄ / 5% H₂O, and embedded in Epon. All electron micrographs were recorded digitally (slow-scan CCD camera; TVIPS, Gauting, Germany) on a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 120 kV.

Nucleotide sequence accession number. The gene sequences were deposited in GenBank under following Accession No. XXXXXXXXXX

Results

Over sixty recently isolated strains affiliated according to the 16S rRNA gene analysis with *Rhodopirellula baltica* SH1^T as the closest, validly described species (Winkelmann and Harder 2009). The 16S rRNA gene sequences do not offer sufficient information to describe new species. A dissimilarity of this gene of more than 3%, recently reduced to 1.3% (Stackebrand and Ebers, 2006), indicates that the strains under consideration belong to two species. These thresholds yielded in our strain collection six or nine operational taxonomic units beside the species *Rhodopirellula baltica* (Winkelmann and Harder, 2009). To explore the genetic diversity of the strains on the species level, we analysed a representative group with the classical methods of G+C content determination and DNA-DNA hybridization and developed a multi locus sequence analyses scheme.

Rhodopirellula baltica strain SH1^T has a guanine and cytosine content of 55 mol% in the DNA, and a collection of *Rhodopirellula baltica* strains from the Baltic Sea had values of 53 to 57 mol% (Schlesner et al., 2004). These strains formed one DNA-DNA-hybridization group with the type strain and the range of G+C values is within the recommended values for a species (Rossello-Mora and Amann, 2001). For the strains SH1^T, SH155 and SH398, reported to have a G+C content of 55 mol%, we determined 54.9, 56.6 and 53.7 mol%, respectively. These values were within the uncertainty of the method. The G+C content of 16 new isolates ranged between 53.9 and 56.5 mol% (Tab.2 and supplements Tab.2), supporting the affiliation to the genus *Rhodopirellula*.

DNA-DNA-hybridizations are the experiment to define on the genetic basis, whether one strain belongs to the species of a type strain or represents a novel species. We used the type strain SH1^T and strain SH126 to confirm the results of Schlesner and colleagues (2004) and

included 14 isolates in the DNA-DNA hybridization experiment. Applying the protocol introduced by Ziemke and colleagues (1998) to separate hybridized and non-hybridized labeled fragments of one strain, we observed a nearly complete hybridization of the DNA of strain SH1^T with that of strain SH 126. Only 38 to 63.8% of the type strain DNA associated with the DNA of the isolates (Tab. 2). Experiments with labeled DNA from the isolate strains 6C, CS11 and CS96 revealed four genetically defined OTUs: OTU A represented the type strain SH1^T and SH126, and OTU B comprised strains 2S, 6C, 1SC, 3SC, 4SC, CS7, CS8, CS11, CS70, CS115 and SM38. Strain CS96 formed a hybridization group with SM41 (OTU C). DNA of strain SM1 had low association values with any labeled DNA and thus SM1 represented OTU D. Interestingly, around 60% of the DNA of SH1^T associated with the DNAs of OTU B, whereas close to 80% of the DNA of strains 6C and CS11 of OTU B associated with the DNA of OTU A (Tab. 2).

Multilocus sequence analysis (MLSA) is currently under consideration as equivalent to whole genome hybridizations. Following the suggestions of Maiden and colleagues (1998), we developed a MLSA with 5026 bp comprising of amplicons for the genes acetyl coenzyme A synthetase (*acsA*, 724 bp), guanosine monophosphate synthetase (*guaA*, 722 bp), anthranilate synthase component 1 (*trpE*, 720 bp), phosphoribosylaminoimidazole carboxamidase (*purH*, 419 bp), glycerol facilitator uptake protein (*glpF*, 480 bp), fumarate hydratase (*fumC*, 486 bp), isocitrate dehydrogenase (*icd*, 421 bp), serine hydroxymethyltransferase (*glyA*, 588 bp) and malate dehydrogenase (*mdh*, 466 bp). The MLSA is a taxonomically valuable tool for closely related strains, but not all species in a genus are expected to allow successful amplifications. We could amplify *glpF* and *mdh* from all strains with a functional sequence of the desired gene, but some other genes could only be amplified from few strains or the amplicon had a sequence affiliating with another gene (Tabl. 3). Analysis of genomes of related strains revealed that the average nucleotide identity in conserved genes within a species is above 94 % (Konstantinidis and Tiedje, 2005) and recently published MLSA studies on *Ensifer* and related taxa (Martens et al., 2007) confirmed this 94% identity threshold for the species border. According to metagenomic analyses there

seems to be an underrepresentation of genes with 90% to 94% identity in the environment (Konstantinidis and DeLong, 2008). The 16S rRNA genes and the *glpF* and *mdh* amplicon sequences defined 13 genetic taxonomic units, named OTU A to OTU M. Within a unit, the sequence similarity was in the range 94% to 100% identity, only the *acsA* gene showed a higher variability with a range of 92% to 100%. Between different units, the identities of the genes ranged from 77% to 94%. The gaps of identity between taxonomic units were at least 1% for each amplicon, only *purH* sequences within and between taxonomic units reached 94% identity. However, the groups exhibited unit-specific base insertion and deletions, which enabled a clear assignment to a genetic taxonomic unit (Tab. 3).

The diversity of the genetic taxonomic units was visualized by the calculation of a phylogenetic tree for the *glpF* and *mdh* amplicon sequences (Fig. 1). The type strain of *Rhodopirellula baltica* affiliated with strains from the Bay of Kiel, the Swedish Skagerak and the German North Sea (OTU A) and one Swedish strain, SWK 7. This isolate was placed based on the 16S rRNA gene sequence dissimilarity in a separate unit (OTU F), however, the MLSA results questioned this separation. Isolates from Helgoland in the North Sea, Yerseke at the Scheldt estuary at the English Channel and Mediterranean sites in Italy and Greece formed OTU B. The other units were represented by few isolates. All tree calculation methods (neighbour joining, maximum parsimony and maximum likelihood) showed a clear division between OTUs A and B. The overall structure of the tree resembled the tree of the 16S rRNA gene (Winkelmann and Harder 2009).

For the strains of the closely related cluster A, including the type strain SH1T, and B, we obtained from all housekeeping genes sequences. Nine strains from OTU A and eighteen strains from OTU B, representing all sampling sites from which strains of these OTUs were obtained, were used for alignment and tree reconstruction (Tab. 3 and supplement Tab. 1). The concatenated sequences had a length of 4780 bp. Calculation of different trees with ML, MP and NJ resulted always in a clear separation of two groups, reflecting the cluster A and B. This result was also observed in gene-specific trees (data not shown). Only the 16S rRNA gene tree did not resolve these two clusters. A BOX-PCR analysis of these strains confirmed

the separation. Pattern of the BOX-amplicons served to calculate an UPGMA tree that showed a divergence of 50% between the two clusters (supplement Fig. 1).

A unique feature of *Planctomycetes* is the intracellular compartmentation of the prokaryotic cells. Therefore, we employed transmission electron microscopy of cells from liquid cultures in logarithmic growth phase. After EM preparation using three different techniques, we elucidated the structural characteristics of the type strain SH1^T and the isolates 6C and SM1. Cells of all three strains occurred singly, in pairs or in aggregates. They were round to ovoid, their average diameter was in the range of 1 to 2 µm. The type strain revealed an intracellular compartmentation clearly visible in freeze-etched samples: the riboplasm is surrounded by the paryphoplasm that contained small structures, likely vesicles or storage compounds (Fig. 3c). This image shows a small cell, likely a freshly budded cell, in contact with the large cell close to the riboplasm. Strain 6C, a member of the OTU B, had a similar appearance: a large paryphoplasm with internal structures surrounded the riboplasm and a new cell was in the budding process (Fig. 3d). A surface coating with platinum (Fig. 3a) revealed the polar structure of the cell: one pole has a smooth surface, whereas the other pole hosts thin filamentous structures. These structures were found frequently in the platinum-shaded images and usually established a physical link between the cells. More details were visible in the ultrathin section images (Fig. 3e). The pole at the riboplasm had short, pilli-like structures and an extracellular matrix. The smooth pole has several cellular appendages, prosthecae, in this image. These are also visible on the surface of the cell in the platinum-shaded image (Fig. 3a). Prosthecae covered also one pole of cells of strain SM1 (Fig. 3b). The middle part of the cell had apparently collapsed due to air-drying. Ultrathin sections of cells of this strain revealed an unusual intra-nucleosomal fibrillar structure (Fig. 3f). Such a structure was also observed in cells of *Blastopirellula marina* (Lindsay et al., 1997). The intracellular membrane is visible as thin line, dividing a light grey and a dark grey area with a black spot, the nucleoid. The outer membrane is often seen to be asymmetric: the outer leaflet is sharp, while the inner leaflet appears "fuzzy". The micrographs supported the identification of strains 6C and SM1 as members of the

Planctomycetes. The similarity of the images of strain 6C and the type strain suggest a close kinship, whereas the round-shaped morphology of strain SM1 suggests a distant relatedness.

Discussion

The sequencing of several housekeeping genes known as MLSA or MLST has become a rapid and reliable technique to identify microbial species and strains, especially in clinical microbiology. Here we developed a MLSA approach to characterize strains of *Rhodopirellula* from European Seas. For strains with a 16S rRNA gene similarity of less than 99.0 % to *R. baltica* SH1^T, the experiments indicated a low applicability of the designed MLSA primers. Only the amplicons for the glycerol facilitator uptake protein (glpF) and the malate dehydrogenase (mdh) were useful in the whole genus. Other studies have successfully applied MLSA on *Ensifer*, *Pseudomonas* and *Vibrio* taxa (Martens et al., 2008; Thompson et al., 2007; Cladera et al., 2006) not only for intraspecies purpose but also to several distantly related species. The development of such a genus-wide MLSA scheme can use the glpF and mdh primer pairs, but needs additional genomic information on several strains to develop a genus-wide MLSA. Previous studies, e.g. on *Vibrio* (Thompson et al., 2007), had established a clear correlation between the results of DNA-DNA hybridization studies and MLSA studies and it has been suggested to replace the former with the later technique, but we still tested our MLSA results with DNA-DNA hybridization experiments and applied additionally a BOX-PCR for a high taxonomic resolution. Electron microscopy provided morphological evidence for differences between the OTUs. Together with the 16S rRNA phylogeny, we obtained a congruent picture of the genetic diversity in the strain collection.

MLSA and MLST studies identify genetic identities and provide insight into the biogeography and epidemiology of microorganisms. In the genetically designated PVC superphylum of *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* and *Chlamydiae* (Wagner and Horn, 2005), MLST approaches were applied to reveal the history of pathogenic *Chlamydiae* strains (Klint et al., 2007; Mohamad et al., 2008; Pedersen et al., 2009). *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Salinibacter* are marine microorganisms that were recently studied with MLSA. Thompson and colleagues (2007) reported a clear separation of *Vibrio* species by MLSA and showed the recovery of results obtained by DNA-DNA-hybridization and 16S rRNA phylogeny. The MLST study of Khan and colleagues (2008) identified distinct clusters of oceanic strains inside the species

Pseudomonas aeruginosa, reflecting the geographic location of the isolation sites. A MLST study on the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber* (Rossello-Mora et al., 2008) revealed the absence of a biogeography among the isolates from the Mediterranean Sea, the Atlantic Ocean and the Peruvian upwelling region. The application of a high-resolution mass spectrometry (ICR-FT) revealed a fine-scale diversity in association with geographical patterns. This result implicates a biogeography outside of the housekeeping genes, in the secondary metabolism or on regulatory levels in accordance to environmental conditions. To the opposite, a study on *Sulfolobus* isolates from hot acidic and neutral lakes in Kamschatka, East Africa and North America found a biogeography with an MLSA approach (Whitaker et al., 2003). We hypothesized that an attached-living bacterium may be hampered in its dispersal and, hence, a biogeography may be detectable by MLSA. So far, biogeographical studies focused on free-living bacteria from various environments.

The genetic analysis of *Rhodopirellula* sp. showed evidence for a biogeography in European Seas. Isolates of OTU A, including *Rhodopirellula baltica* strains from the Bay of Kiel, were restricted to parts of the Baltic Sea, Skagerrak and the east coast of the North Sea. Strains of OTU B were isolated from the southern North Sea till the Mediterranean Sea. Isolates from Scotland and Island indicated a North Atlantic habitat. The other OTUs were present with a low number of isolates in the strain collection. Therefore, their habitat size can not be predicted. The presence of several genomovars in same sample sites indicates that different niches exist. Thus many species may have evolved. We detected 13 OTUs in 60 strains from 19 sample sites. The cultivated genetic diversity together with the presence of genes closely related to *Rhodopirellula baltica* in different habitats all over the world (Morris et al., 2006; Musat et al., 2006; Neef et al., 1998; Pimentel-Elardo et al., 2003; Woebken et al., 2007) are in agreement with a recent ecological hypothesis of Kirchman and colleagues (2005): bacterial groups in aquatic systems which appear to be more widespread are more diverse.

Theoretically, biogeographical distributions may have evolved from environmental variations or historical events (Kahn et al., 2007). Without a large dataset of *Planctomycetes* strain diversity and consequently a gene-based tree of the development, we can only highlight

some environmental factors. Temperature at the sample sites varied between 5.2 °C in the North Sea and 21.5 °C in the Mediterranean Sea, while Non-European isolates were obtained from sites with 26.3 °C in Asia or 28.9 °C at the coast of Africa (environmental data were published in Winkelmann and Harder, 2009). These warm water strains build the OTUs H and K and differ from European strains. Salinity values varied from 21 to 38.2 PSU, which is in the range of salinity tolerance published for *Rhodopirellula baltica* SH1^T. Temperature and salinity together showed no correlation with the OTU biogeography.

A large number of taxa-area relationships is often achieved by cultivation-independent methods. However, genetic fingerprint methods, e.g. DGGE, ARISA and T-RFLP, as well as 16S rRNA gene clone libraries have a low taxonomic resolution above the species level. Sequences of housekeeping genes provide the desired genetic resolution on the species level. The MLSA characterization of *Rhodopirellula* isolates has revealed a broad genetic diversity in European Seas and provided first evidence for a limited habitat size of attached-living bacteria. In the future cultivation-independent studies within the genus applying the *gfpF* and *mdh* primer will allow more precise determinations of the habitat size.

References

- **Aanensen, D. M., and B. G. Spratt.** 2005. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research* **33**:W728-W733.
- **Achtman, M.** 2008. Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens. *Annual Review of Microbiology* **62**:53-70.
- **Cladera, A. M., L. D. C. Sepulveda-Torres, M. Valens-Vadell, J. M. Meyer, J. Lalucat, and E. Garcia-Valdes.** 2006. A detailed phenotypic and genotypic description of *Pseudomonas* strain OX1. *Systematic & Applied Microbiology* **29**:422-430.
- **Dolan, J. R.** 2005. An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquatic Microbial Ecology* **41**:39-48.
- **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.

- **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.
- **Glöckner, 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.
- **Ivars-Martinez, E., G. D'Auria, F. Rodriguez-Valera, C. Sanchez-Porro, A. Ventosa, I. Joint, and M. Muhling.** 2008. Biogeography of the ubiquitous marine bacterium *Alteromonas macleodii* determined by multilocus sequence analysis. *Molecular Ecology* **17**:4092-4106.
- **Junglas, B., A. Briegel, T. Burghardt, P. Walther, R. Wirth, H. Huber, and R. Rachel.** 2008. *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Archives of Microbiology* **190**:395-408.
- **Khan, N. H., M. Ahsan, S. Yoshizawa, S. Hosoya, A. Yokota, and K. Kogure.** 2008. Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean. *Applied & Environmental Microbiology* **74**:6194-6205.
- **Kirchman, D. L., A. I. Dittel, R. R. Malmstrom, and M. T. Cottrell.** 2005. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnology & Oceanography* **50**:1697-1706.
- **Klint, M., H. H. Fuxelius, R. R. Goldkuhl, H. Skarin, C. Rutemark, S. G. E. Andersson, K. Persson, and B. Herrmann.** 2007. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:1410-1414.
- **Konstantinidis, K. T., and E. F. DeLong.** 2008. Genomic patterns of recombination, clonal divergence and environment in marine microbial populations. *The Isme Journal* **2**:1052-1065.
- **Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje.** 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology* **187**:6258-6264.
- **Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje.** 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current Opinion in Microbiology* **10**:504-509.
- **Kuhnert, P., and B. M. Korczak.** 2006. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology* **152**:2537-2548.
- **Lindsay, M. R., R. I. Webb, and J. A. Fuerst.** 1997. Pirellulosomes - a new type of membrane-bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *pirellula*. *Microbiology* **143**:739-748.
- **Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. T. Stephens, and F. J. Debruijn.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *xanthomonas* and *pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and pcr. *Applied & Environmental Microbiology* **60**:2286-2295.

- **Ludwig W, S. O., Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, et al.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**::1363–1371.
- **Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3140-3145.
- **Marmur, J.** 1961 A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208–218.
- **Marmur, J. Doty, P.** 1962 Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* **4**, 93–103.
- **Martens, M., M. Delaere, R. Coopman, P. De Vos, M. Gillis, and A. Willems.** 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **57**:489-503.
- **Martens, M., P. Dawyndt, R. Coopman, M. Gillis, P. De Vos, and A. Willems.** 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **58**:200-214.
- **Martiny, J. B. H., B. J. M. Bohannan, J. H. Brown, R. K. Colwell, J. A. Fuhrman, J. L. Green, M. C. Horner-Devine, M. Kane, J. A. Krumins, C. R. Kuske, P. J. Morin, S. Naeem, L. Ovreas, A. L. Reysenbach, V. H. Smith, and J. T. Staley.** 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*. **4**:102-112.
- **Mohamad, K. Y., S. M. Roche, G. Myers, P. M. Bavoil, K. Laroucau, S. Magnino, S. Laurent, D. Rasschaert, and A. Rodolakis.** 2008. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydomonas* strains. *Infection, Genetics & Evolution* **8**:764-771.
- **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.
- **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 & 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* **144**:3257-3266.
- **Pedersen, L. N., B. Herrmann, and J. K. Moller.** 2009. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **55**:120-130.
- **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.

- **Rachel, R., I. Wyschkony, S. Riehl, and H. Huber.** 2002. The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* **1**: 9-18
- **Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:39-67.
- **Rossello-Mora, R., M. Lucio, A. Pena, J. Brito-Echeverria, A. Lopez-Lopez, M. Valens-Vadell, M. Frommberger, J. Anton, and P. Schmitt-Kopplin.** 2008. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *The Isme Journal* **2**:242-253.
- **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 & Evolutionary Microbiology* **54**:1567-1580.
- **Sikorski, J., R. Rossello-Mora, and M. G. Lorenz.** 1999. Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. *Systematic & Applied Microbiology* **22**:393-402.
- **Stackebrandt, E., and J. Ebers.** 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**:152-155.
- **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 & Evolutionary Microbiology* **52**:1043-1047.
- **Staley, J. T., and J. J. Gosink.** 1999. Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* **53**:189-215.
- **Thompson, F. L., B. Gomez-Gil, A. T. R. Vasconcelos, and T. Sawabe.** 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Applied & Environmental Microbiology* **73**:4279-4285.
- **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.
- **Whitaker, R. J., D. W. Grogan, and J. W. Taylor.** 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**:976-978
- **Winkelmann, N., and J. Harder.** An improved isolation method for attached-living Planctomycetes of the genus *Rhodopirellula*. *Journal of Microbiological Methods* **In Press, Accepted Manuscript.**
- **Woebken, 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. *The Isme Journal* **1**:419-435.

- **Ziemke, F., M. G. Hofle, J. Lalucat, and R. Rossello-Mora.** 1998. Reclassification of *shewanella putrefaciens* owens genomic group ii as *shewanella baltica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:179-186.

Figure 1

Phylogenetic tree of different cluster with concatenated sequences of the 2 housekeeping genes *mdh* and *glpF*, calculated in arb with RAxML and a 50% base frequency filter



Figure 2

Phylogenetic tree of cluster A and B with concatenated sequences of 9 different housekeeping genes, calculated in arb with AxML

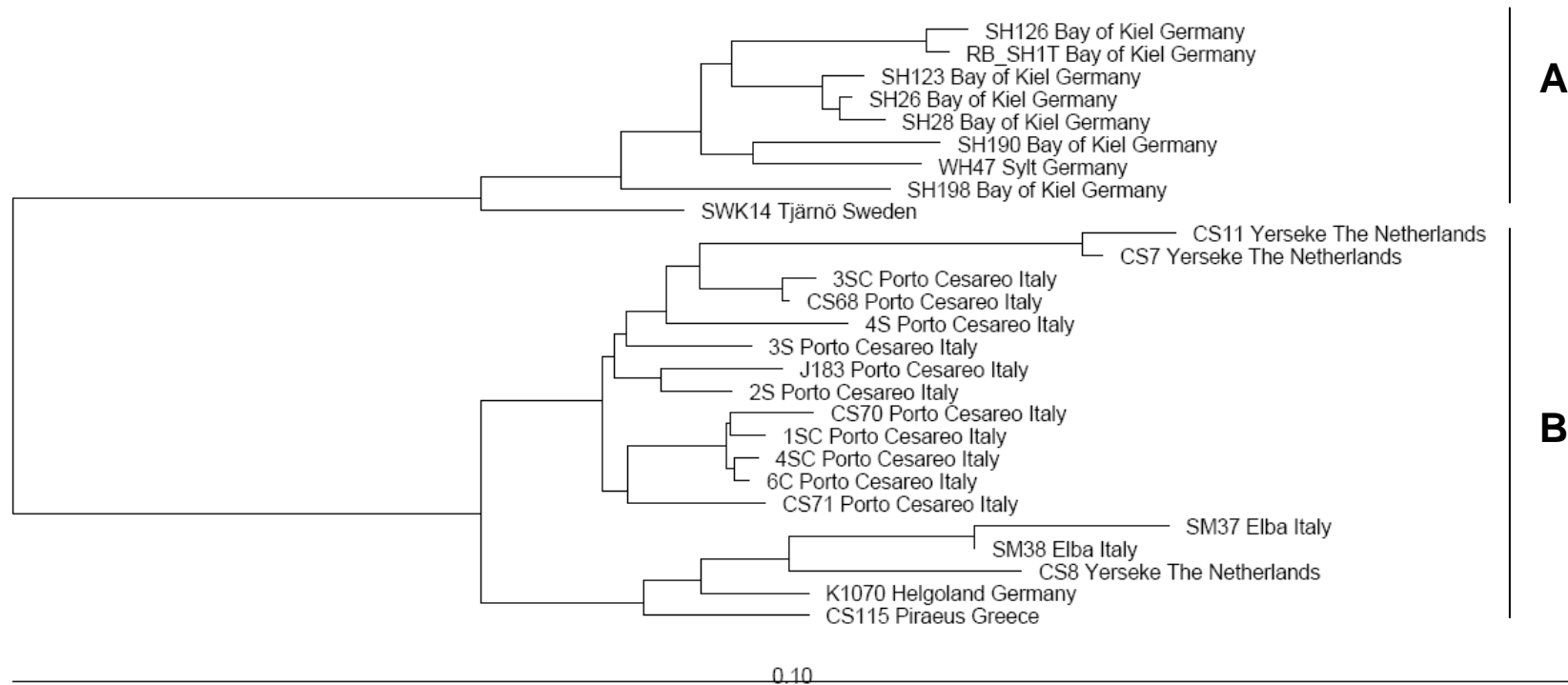


Figure 3
TEM microscopy

Micrographs of *Rhodopirellula baltica* SH1^T (c), *Rhodopirellula* sp. strain 6C (a, d and e) and strain SM1 (b and f). Images a and b show Pt-shadowed cells, c and d freeze-etch preparations and e and f ultra thin sections (UDS) of embedded cells. Bar is 0.5 μ m.

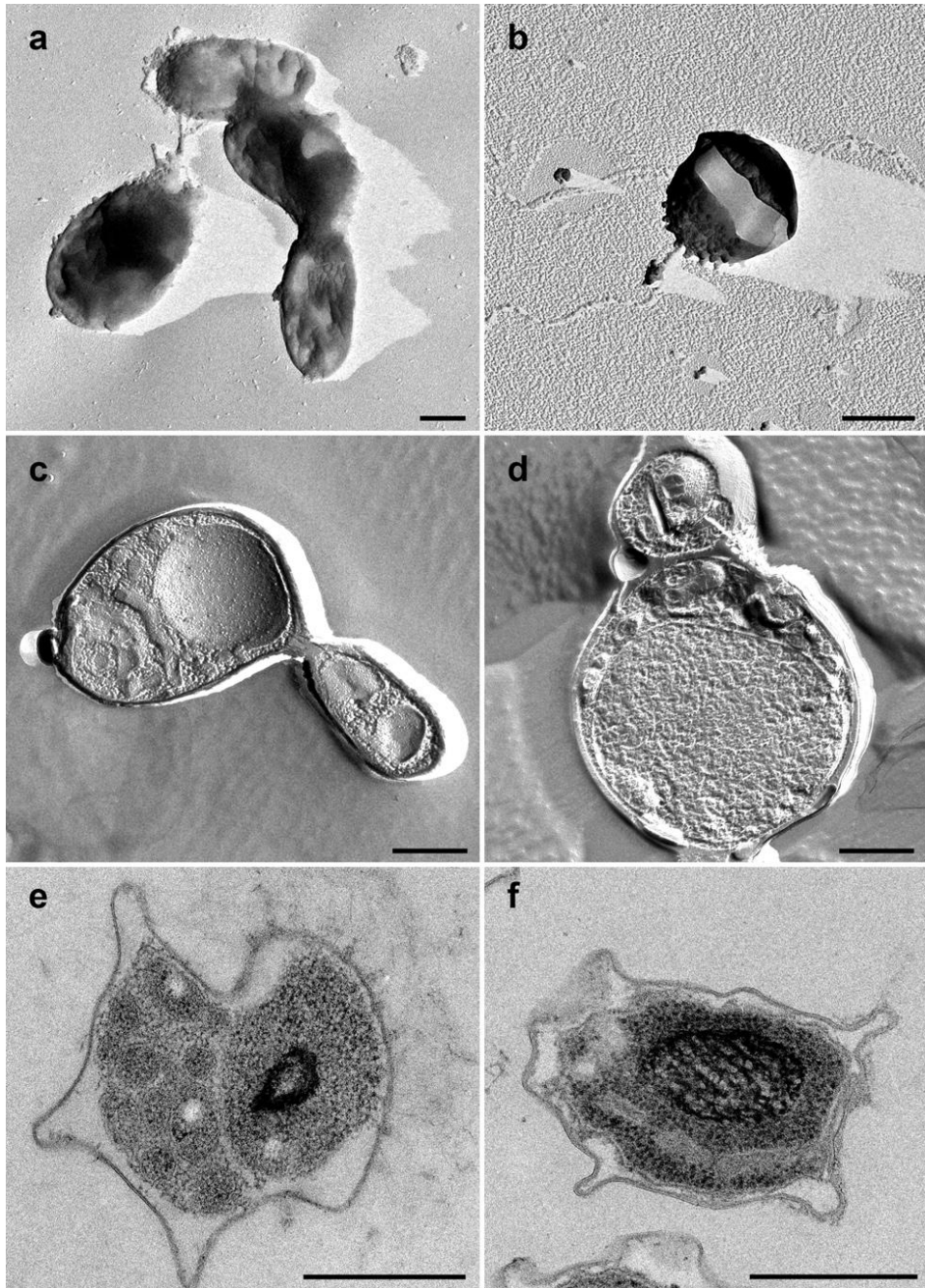


Table 1

Primer table for MLSA approach

Gene	Forward primer (f1 and f2)	Reverse Primer (r1 and r2)	Used amplicon size (gene pos)
acsA (RB13264)	ACAACCTTGTGGGCTAAACGGAC	GTGCCCGCGGTCATTGGAAGT	1025
	GCTATGTTGTGTACGGACCTTTGT*	GGAAGCGCCGCGTGAAGC	-1748
fumC (RB7623)	TCGAACCGAACGCGACTCGAT	CACATCACCGGATTGACCTTTC	496
	CGCTTACTACGGTGCCAGACTCA	TGACACCACCGCCAACAACACT	-981
glpF (RB8872)	GTGGAACCATGCATCCGTACG	CGGGTAGCAACCCGATCGAG*	127
	TGGCGGTCAAACGAATACTG	CCTTGTTTCCCTTTGATTGGTAGC	-606
glyA (RB6215)	CCGAAACGACTCGTCAGCAAG	ACCCAGATCCACAGCGGTGA	273
	GTGACACCGTGCTGGGATTGG*	CAGCATCAGGTGGTTGTCGGTTCC	-860
guaA (RB8374)	GACATCTCGGCCGAACGCATTG	TTTGAACAAGTCTCGCAGAGGTT	417
	ACAGCGTTTACGAAGAAGGTG	TTCAAACCCCAATTCTTCAGG	-1138
icd (RB1593)	TTGGCAGAACTTGGCGAGTTG	TGGCATCCGCAATTTGCTCCG	260
	CCGGTCGGATTTTGGCTGGTTTT	ATAGCAACGATCGGGAATGA	-680
mdh (RB7652)	ACATTCGCCGAACCGAAGACAT	CCTTGCGAGTCCGGTCAACG*	166
	TTGTCCGAGCCGGAATGTTGG	CAGTATGCGGCGACAGGGATGAC	-631
purH (RB10113)	CCAGCCTTGTGCGAGCGGC	GGAAGAACGCATCGGACGCG	465
	ATGTCGCGATCGCTACCAGT	GCTCTGCGGCTTTCTTGAT	-880
trpE (RB7967)	GAAGACCAACGCCAGCCGCT	CGCGGGCCTTGTTGAGGGTT	852
	GCAAGCCGCGGCCGAAGAAGT	AGGCGTTGCGGGATTCTC	-1571

* indicates primer position inside used amplicon

Table 2
DNA-DNA-hybridization

DNA \ labeled DNA	A*	C*	B*	B*	G+C content in mol% (measured by W. Serrano)
	Rb SH1	CS96	CS11	6C	
Rb SH1 ^T	100	54,2	79,1	77,7	54.88
SH126	99,3	41,5	62,9	69,2	55.396
SM41	nd	97,9	24	26,4	54.51
CS96	38,1	100	54,9	34,9	55.65
CS7	63,8	61,4	118,3	97,7	55.61
CS11	61	57,2	99,9	82,6	54.51
6C	55	42,1	84	100	55.16
CS8	60,8	43	83	95,8	53.90
3SC	61,2	nd	70,3	79,5	54.72
CS115	nd	50,5	74,3	81,9	nd
SM38	54,8	51,9	68,3	76,2	55.00
CS70	56,3	42,4	nd	86	55.39
2S	52,6	44,7	nd	90,3	55.24
1SC	48,7	41,2	46,2	76,7	55.64
4SC	51,5	nd	36,1	78,3	54.44
SM1	38	56,9	52,8	52,7	nd
Pooled SD	0.26-0.68	0.26-0.68	0.6-1.0	0.6-1.0	0.14-1.62

G+C content of *Rhodopirellula baltica* SH1^T from lit.: 55 % (Schlesner et al., 2004)

Table 3
MLSA Overview

OTU	16S rRNA identity	Genes (% identity to <i>Rhodopirellula baltica</i> sequence)								
		acsA	fumC	glpF	glyA	guaA	icd	mdh	purH	trpE
A	99.6-100	92-100	97-100	97-100	95-100	98-100	97-100*91	98-100	94-100	94-100
B	99.5-100	87-89	90-91	89-90	89-91	90-91	89-90*	92-94	91-94	91-93
C	97.7-97.9	+/-	80 +/-	89	+/-*	--	--	81-82	+/-	92 +/-
D	96.1	~	--	90	--	--	--	76	99*	96
E	95.8	99	--	99	--	--	--	78	--	87
F	98.6	--	88	99	96	--	--	96	~	93
G	96.6	--	--	--	--	--	--	--	+/-	--
H	95.2-96.3	89-97	76-78	88-90	--	--	--	77-81	94-100	91-93*
I	99.3-99.5	85	85	82-89	89-90	88	82-83	92	+/-	91
J	96.2-96.4	+/-	79 +/-	89	78-79	--	--	78-80	+/-	--
K	96.9	76	~	--	+/-	--	--	--	--	~
L	94.6	+/-	--	88	--	--	--	--	--	--
M	93.6	+/-	75	88	--	--	--	--	--	--

OTU A including typestrain *R. baltica* SH1

+/- amplicon of an other gene

- no amplicon at all

~ too short

* unusual aberration

Supplement Table 1

Table of hybridization groups after MLSA, strains in X were not assignable, 16S rRNA identities by BLAST(N) results in GenBank.

OTU	Strain	16S rRNA gene identity %	Isolation site		Type strain
		+ means 99 and higher			
A	RB SH1 ^T	+	Bay of Kiel	Germany	XXX
A	SH26	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH28	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH123	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH126	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH155	97	Bay of Kiel	Germany	
A	SH159	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH188	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH190	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH198	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH386	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SH398	+	Bay of Kiel	Germany	
A	SWK14	+	Tjärnö	Sweden	
A	WH46	+	Sylt	Germany	
A	WH47	+	Sylt	Germany	
B	1S	+	Porto Cesareo	Italy	
B	2S	+	Porto Cesareo	Italy	
B	3S	+	Porto Cesareo	Italy	
B	4S	+	Porto Cesareo	Italy	
B	5S	+	Porto Cesareo	Italy	
B	6C	+	Porto Cesareo	Italy	XXX
B	7C	+	Porto Cesareo	Italy	
B	8C	+	Porto Cesareo	Italy	
B	1SC	+	Porto Cesareo	Italy	
B	2SC	+	Porto Cesareo	Italy	
B	3SC	+	Porto Cesareo	Italy	
B	4SC	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS7	+	Yerseke	The Netherlands	
B	CS8	+	Yerseke	The Netherlands	
B	CS9	+	Yerseke	The Netherlands	
B	CS10	+	Yerseke	The Netherlands	
B	CS11	+	Yerseke	The Netherlands	
B	CS65	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS66	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS67	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS68	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS69	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS70	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS71	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS72	+	Porto Cesareo	Italy	
B	SM37	+	Elba	Italy	
B	SM38	+	Elba	Italy	
B	CS59	+	Piraeus Kavos	Greece	
B	CS115	98	Piraeus Kavos	Greece	
B	K1070	+	Helgoland Port	Germany	
B	CS109	+	Porto Cesareo	Italy	
B	CS126	+	Porto Cesareo	Italy	
B	J183	+	Porto Cesareo	Italy	
C	CS96	97	San Cataldo	Italy	

C	SM41	97	San Cataldo	Italy	XXX
D	SM1	95	Pt Andratx Mallorca	Spain	XXX
E	K587	95	Oostende	Belgium	XXX
F	SWK7	98	Tjörnö	Sweden	XXX
G	WH49	96	Sylt	Germany	XXX
H	SM23	94	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM24	96	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM26	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM30	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM31	94	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM32	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM33	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM34	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM35	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	XXX
H	SM36	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM43	95	Bohol Panglao Beach	Philippines	
H	SM44	94	Bohol Panglao Beach	Philippines	
I	K249	97	St. Andrews	UK	
I	K833	98	Sandgerdi	Iceland	
J	CS14	96	Brest	France	XXX
J	CS15	96,7	Brest	France	
K	SM49	96	Dar es Salaam	Tanzania	XXX
L	SM48	96	Cancale	France	XXX
M	SM50	93	San Cataldo	Italy	
X	CS108	+	Porto Cesareo	Italy	
X	CS110	+	Porto Cesareo	Italy	
X	SM51	89	Elba	Italy	
X	SM52	98	Elba	Italy	
X	SWK13	97,3	Tjörnö	Sweden	
X	SWK21	+	Tjörnö	Sweden	
X	SWK23	+	Tjörnö	Sweden	
X	SWK24	+	Tjörnö	Sweden	
X	WH48	+	Sylt	Germany	

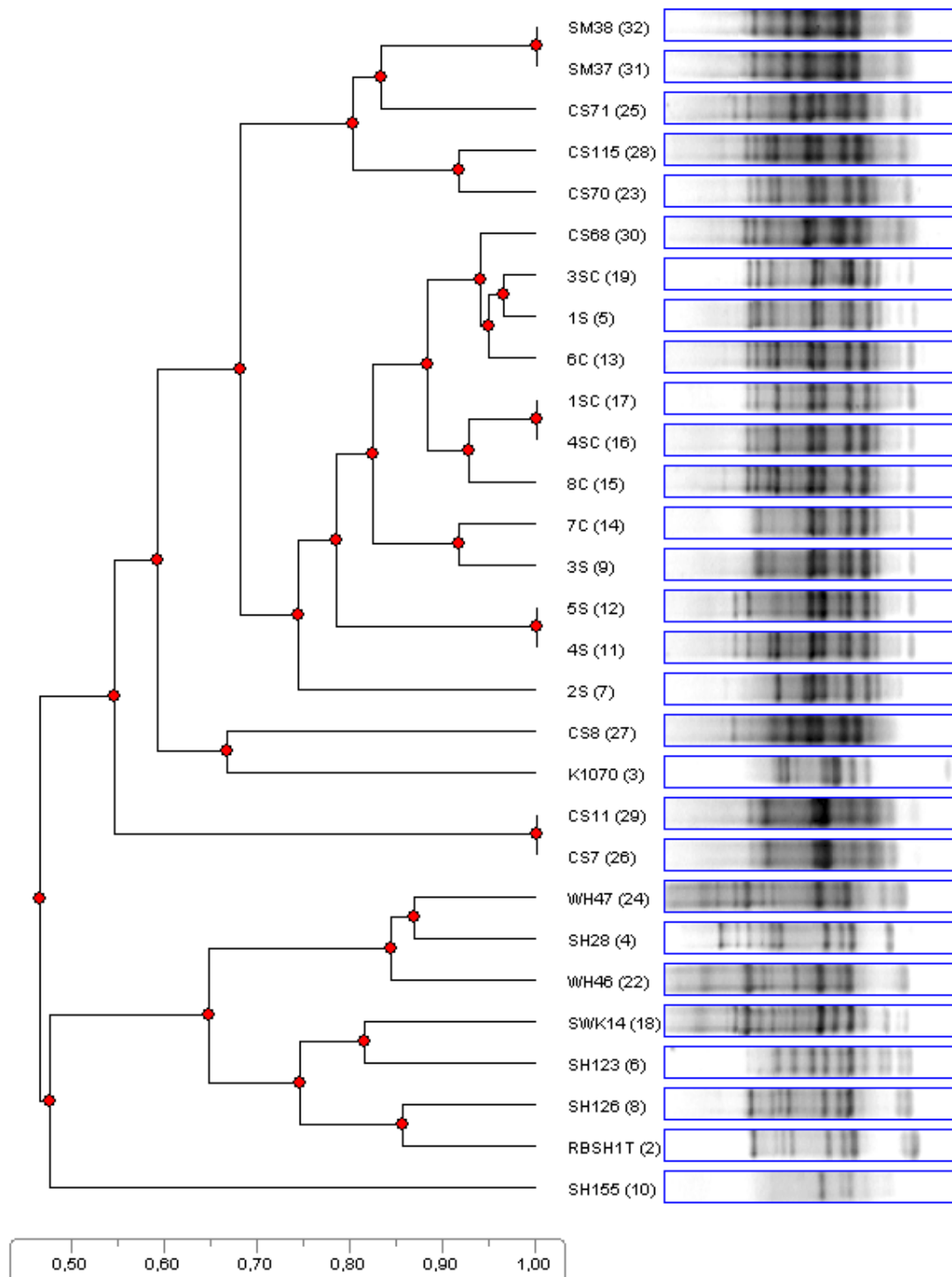
Supplement Table 2

G+C content

Analyzed strains	Measurements by W. Serrano	From Schlesner et al., 2004
RB SH1 ¹	54.878	55
SH126	55.396	nd
SH155	56.463	55
SH198	54.451	nd
SH386	55.366	nd
SH398	53.659	55
2S	55.244	
4S	54.756	
6C	55.163	
1SC	55.640	
3SC	54.715	
4SC	54.439	
CS7	55.610	
CS8	53.902	
CS11	54.512	
CS68	56.342	
CS70	55.390	
CS96	55.650	
SM38	55.000	
SM41	54.512	
K833	56.463	
K1070	54.960	

Supplement Figure 1

BOX-PCR analysis of OTU A and B, calculated by Totallab TL120 (Nonlinear Dynamics Inc.), represented in UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).



Planctomycetes* in electron microscopic pictures - a review and insights into the genus *Rhodopirellula

Nadine Winkelmann¹, Carolin Meyer², Reinhard Rachel², Dietmar Riedel³, Jens Harder^{1*}

1. Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, D-28359 Bremen, Germany;

2. University of Regensburg, Center for EM (NWF III, Institute for Anatomy), D-93053 Regensburg, Germany

3. EM Service Department, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, D-37077 Göttingen, Germany

*Corresponding author: Jens Harder, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany,

Tel.: +49 421 2028 750; fax: +49 421 2028 580;

E-mail-address: jharder@mpi-bremen.de

Manuscript in preparation

Keywords: TEM, *Planctomyces*, intracellular compartmentation

Abstract

Electron microscopy

Since in 1945 the first image of a cell was obtained by Porter, Claude and Fullam, electron microscopy became an important visualization approach in biology. The further development of better lenses and the increase of resolution made this technique even interesting for microbiologists. The wave length of visible light limits the resolution and magnification of light microscopes: interior structures of prokaryotic cells can be observed if the size is larger than 0.3 μm . Electron microscopy enables a view into the cell and on details of the intracellular organization. Special features of cell wall construction and organelles are accessible. The resolution of a transmission electron microscope (TEM) is around 0.2 nm, for a Field Emmision scanning electron microscope (FE-SEM) it is even lower. Since an electron microscope uses an electron beam in a vacuum environment, the samples need to be prepared in a special treatment: Objectives need to be free of water and organic samples consisting mainly of C, O, H and N have to be stained with heavy metals for a better contrast. Dehydration has to be performed with caution to prevent structural artifacts due to shrinking processes. In scanning electron microscopy (SEM) the surface of a sample can be observed in detail. The sample is before coated by a thin layer of gold or carbon. Electrons are reflected by the coated sample and backscattered electrons are detected by special sensors which enables the processing of an electron micrograph. In transmission electron microscopy (TEM) the electron beam passes the sample and because of this the sample needs to be sliced. In principle three different techniques are used for TEM preparation. To observe cell appendages and cell shape cells are dried and shadowed with platinum in a distinct angle. The obtained micrograph gives suggestions about cell shape, size and appendages. For a closer look into the cell ultra thin sections (UDS) of embedded cells are performed or freeze etching is applied. For UDS preparation cells are embedded into a resin, stained with heavy metals and sliced by a microtome into 50 to 100 nm thick slices. In freeze etch preparation the cells are quickly frozen and fractured randomly by knife. The obtained surfaces are coated by 1 nm of platinum and coal. Organic material is etched of and the Pt/C coat can be observed in the electron microscope to provide a 3-dimensional view into the cell.

The phylum Planctomycetes and its members

Planctomycetes are a phylum of bacteria that is still scarcely studied. Since their discovery in a lake near Budapest in 1924 by Gimesi, a limited number of new isolates was characterized to the species level. All isolates of the order *Planctomycetales* share common features. The most impressing is an intracellular membrane, which divides the cell into two distinct compartments. This for a prokaryotic cell very unusual construction occurs in different shapes inside the different genera and has served as a discriminative marker. In this study, the characterization of *Planctomycetes* by electron microscopical techniques is reviewed and new isolates of the genus *Rhodopirellula* were investigated with light and electron microscopic methods.

Introduction

The three domains of life consist of cells divided into prokaryotic and eukaryotic cell structures. *Bacteria* and *Archaea* can be distinguished from unicellular Eukaryotes by essential features, most of them internal compartments. The structural organization of the eukaryotic cell is the main argument for this strict differentiation, since prokaryotic cells possess in principle no separation of major subunits of cellular function by individual membranes (Fuerst, 2005). The double membrane of the nucleus can be used as essential morphological features for the discrimination. Certainly the differences are manifold, but for the electron microscopic identification this is an essential criterion. In evolutionary biology the origin and development of the eukaryotic nucleus is a highly discussed topic and theories of endosymbiotic models (Martin and Muller, 1998) have also been introduced to the scientific community like in contrast the endogenous or the karyogenic theory (Lake, 1994; Taylor, 1976). The missing link between Prokaryotes and Eukaryotes has not been found so far.

In 1924 the Hungarian scientist Gimesi discovered a new organism in a lake next to Budapest which he identified as fungus. He chose the name *Planctomyces bekefii* to describe his observation, but he was not able to isolate it. The first pure culture belonging to the renamed bacterial phylum *Planctomycetes* was obtained by Staley in 1973.

The phylum *Planctomycetes* share with the *Chlamydiae* a common structure. These bacteria are the only free-living bacteria without peptidoglycan in their cell wall. In *Planctomycetes* the cell wall is stabilized by disulfide bridges in the proteinous layer and is not sensitive to β -lactam antibiotics. A morphological feature is the intracellular compartmentation, where a membrane inside the cytoplasm divides the cell into a nucleic acid and ribosome containing riboplasm and the paraplasm. Some species have additional intracellular structures. These were summarized in 2001 by Lindsay and colleagues in a scheme on the principle cell construction of members of the *Planctomycetes* (Fig. 1).

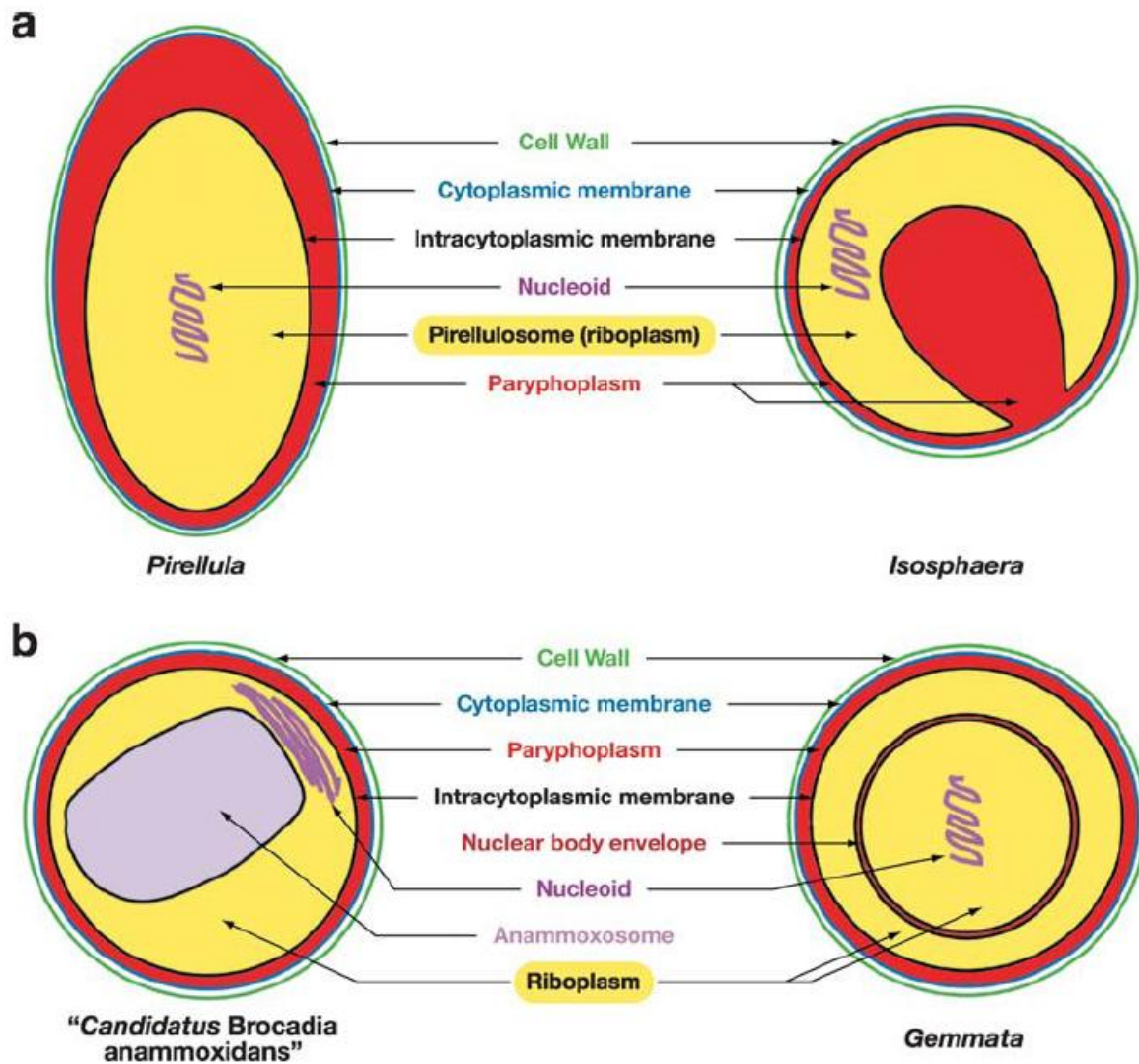


Figure 1: Diagrams of cell organization and compartmentation in (a) *Pirellula* (e.g., *Pirellula staley*) and *Isosphaera* (e.g., *Isosphaera pallida*; plan also applies to *Planctomyces maris*) and (b) "*Candidatus Brocadia anammoxidans*," and *Gemmata* (e.g., *G. obscuriglobus*). The varieties of cell compartmentalization found in different planctomycetes, as well as the underlying similarities in topology of their internal organization (i.e., possession of paryphoplasm compartment and intracytoplasmic membrane), are shown From Fuerst (2005), in colour; originally from Lindsay et al. (2001).

Pirellula*, *Blastopirellula* and *Rhodopirellula

The simplest form is the compartmentation in the three genera *Blastopirellula*, *Rhodopirellula* and *Pirellula*. Cells of the *Pirellula*-type share a pear-shape of the whole cell and also of the intracytoplasmic membrane (ICM). The highly condensed nucleoid and the majority of ribosomes are inside the membrane surrounded riboplasm. Even in light microscopy this division could be observed (Fig. 2).

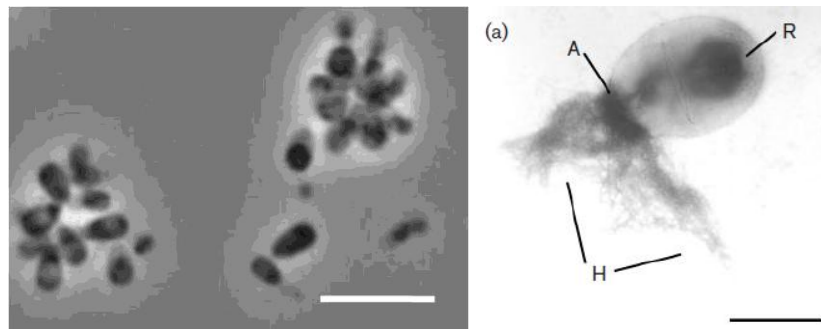


Figure 2: Phase contrast microscopic picture of *Rhodopirellula* sp. strain CS9, isolated from Yerseke, Netherlands, showing intracellular compartmentation. Bar is 5 µm. (a) Electron micrograph of a single cell of *Rhodopirellula baltica* SH1^T displaying the polar organization. R, Reproduction pole; A, attachment pole; H, holdfast substance. Bar, 0,5 µm. From Schlesner et al. (2004).

All three cell type show a polar structure with a polar cap at one site formed by the paryphoplasm. *Blastopirellula marina* and *Pirellula staleyi* have only one compartment inside the cytoplasm, the pirellulosom, as *Rhodopirellula baltica* shows several small vesicle-like structures inside the paryphoplasm, surrounded by a single membrane.

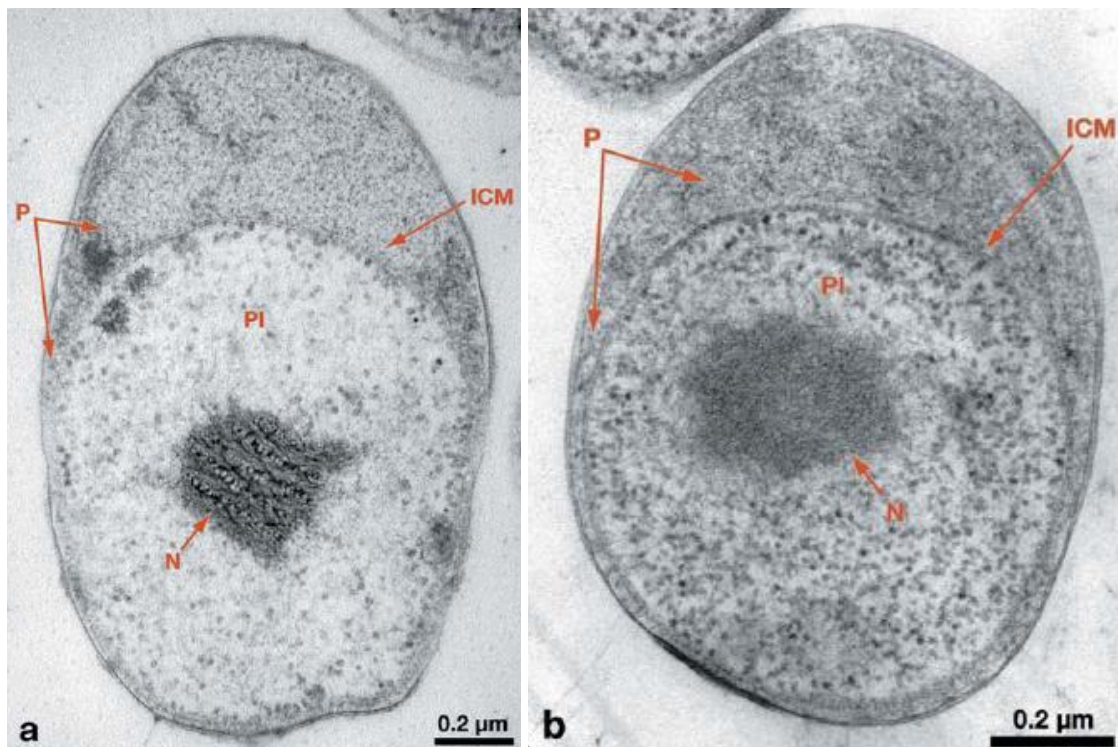


Figure 3: Transmission electron micrographs of a thin section of a cryosubstituted cell of A) *Pirellula marina* and B) *Pirellula staleyi* displaying compartmentation into pirellulosome (PI) and paryphoplasm (P) separated by the intracytoplasmic membrane (ICM). The nucleoid (N) is contained within the pirellulosome and thus compartmentalized and surrounded by the single ICM. Bar is 0.2 µm. From Lindsay et al. (1997).

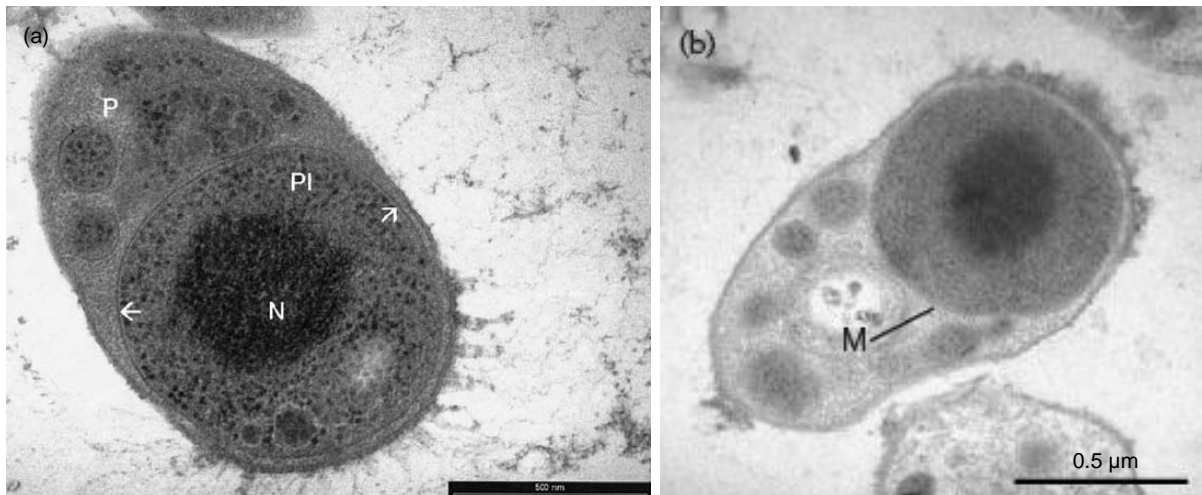


Figure 4: Transmission electron micrographs of thin sections of (a) *Pirellula* sp. Strains SH796 isolated from the marine sponge *Aplysina aerophoba* (belonging to *Rhodopirellula baltica* by DNA-DNA-hybridization, Schlesner et al., 2004) and (b) *Rhodopirellula baltica* type strain SH1^T. From Gade et al. (2004) and Schlesner et al. (2004).

Two special electron micrographs are found in “The Prokaryotes” chapter of the order *Planctomycetales* (Ward et al., 2006) on page 766 and 780. Extracellular appendages were identified with apparently Pt-sputtered samples. *Pirellula marina* (= *Blastopirellula marina* = IFAM 1313) (page 780) and *Pirellula* sp. IFAM 1358 (page 766) exhibit a number of thin hair-like appendages. Rotation by 180 degree revealed a high similarity of these pictures, they look identical.

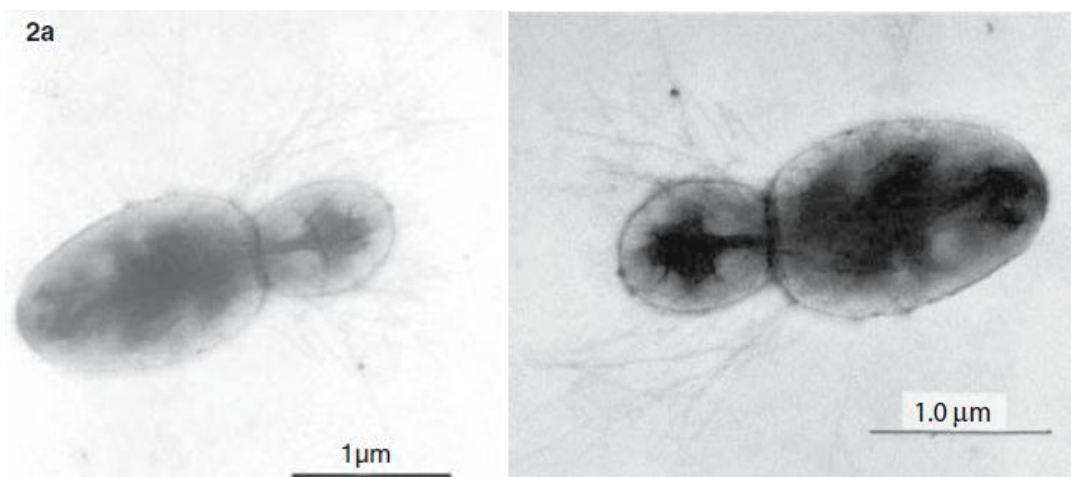


Figure 5: Electron micrograph of supposed two different strains presented in one article. From Ward et al. (2006)

Isosphaera and *Singulisphaera*

A more complex cell construction is present in the thermophile *Isosphaera pallida*, which has been isolated from hot springs in USA and Europe. The round cells have apparently an invagination of the ICM and the paryphoplasm occupies up to 60 % of the cytoplasmic volume. Beside this special shape, the riboplasm is similar to that of the pirellula-type. Close related to *I. pallida* is the filamentous bacterium "*Nostocoida limicola*" with different morphotypes. But they also show an intracytoplasmic compartmentation by a membrane. *Isosphaera* cells show different kind of inclusions inside the pirellulosom like polyhedral structures, paracrystalline inclusions, wall body and gas vesicle. These vesicles have an unknown function, but occur most often in single cells. Freshly isolated cells produce gas vesicles. Wildtype cells are normally arranged in unbranched filaments of unknown length. These filaments disappear by repeated transfer during isolation procedure. In 2008 a close related new planctomycete was isolated and described. *Singulisphaera acidiphila* shows the same invagination of the paryphoplasm and is by this morphological feature and 16S rRNA gene sequence the closest relative to *Isosphaera pallida*.

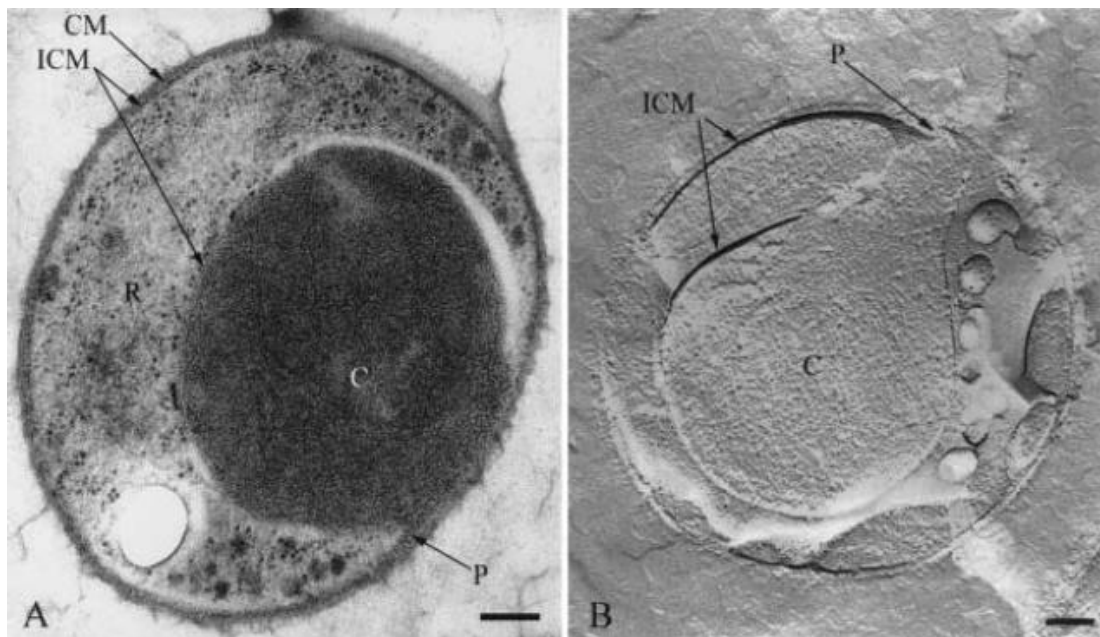


Figure 6: Transmission electron micrograph of a thin section of a cryosubstituted cell of *Isosphaera pallida* displaying a central single intracytoplasmic membrane (ICM)-bounded invagination of the relatively electron-dense paryphoplasm (P and C); the other cell compartment, equivalent to a pirellulosome, contains ribosome-like particles (R). Bar is 0.2 μ m. From Lindsay et al. (2001).

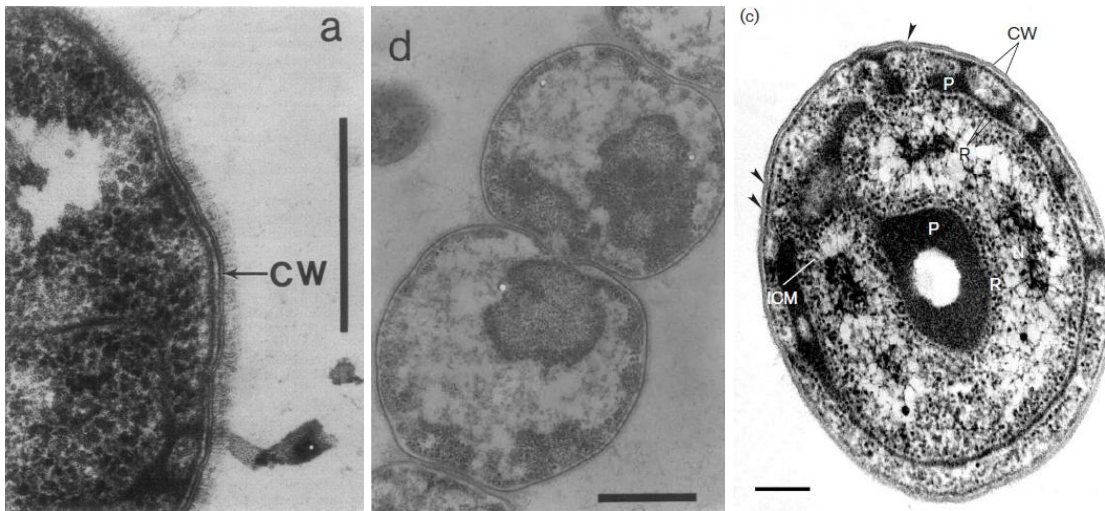


Figure 7: Electron micrographs of the cell wall of *I. pallida* IS1B. Thin sections showing (a) ultrastructure of the cell wall (CW) in profile and (d) stage of budding process. Bar 1 μm . From Giovanonni et al. (1987a and 1987b); Electron micrograph (c) showing an ultrathin section of a cell of *Singuliphaera acidiphila* strain MOB10T with special shape of pirellulosome (CW, Cell wall; ICM, intracytoplasmic membrane; P, paryphoplasm; R, ribosome-like particles; N, nucleoid. Black arrowheads indicate pit-like invaginations of the cell wall). Bar, 0.2 μm . From Kulichevskaya et al. (2007)

Gemmata

Gemmata obscuriglobus is a freshwater bacterium with spherical to ovoid cells, isolated from surface water in Australia. The relative large cells of 5 μm in diameter proliferate by budding like other planctomycetes and show crateriformed structures on the cell surface. These features support the close relationship to the former described genera. But *Gemmata* is different by its inner compartmentation. The paryphoplasm is reduced since the riboplasm took over 90% of the volume. Inside the riboplasm a second ICM, composed of two membranes, surrounds the nucleoid like a nucleus core membrane like structure of eukaryotic cells. A relatively electron-transparent perinuclear space could be seen between the double membrane. This membrane-bound nuclear body contains all of the DNA and ribosome-like particles. DNA and RNA were visualized by anti-DNA immunogold-labeling and RNase gold labeling. TEM pictures of thin sections imply gaps of the nuclear envelope containing a double membrane. These gaps seem to be a proof for the theory of a folded single membrane. The origin of the nuclear envelope is still in discussion. An endogenous membrane invagination is suggested by Fuerst. Next to the nuclear body further membrane-surrounded compartments were detected inside the riboplasm. TEM of freeze-fracture preparations showed several smaller vesicles with unknown function inside the cytoplasm. The process of transportation through the nuclear envelope is not clarified,

but the discovery of sterol inside *Gemmata* could give a first hint of possible membrane fluidity. But the Eukaryote like spatial separation of transcription and translation is until today not experimentally proven.

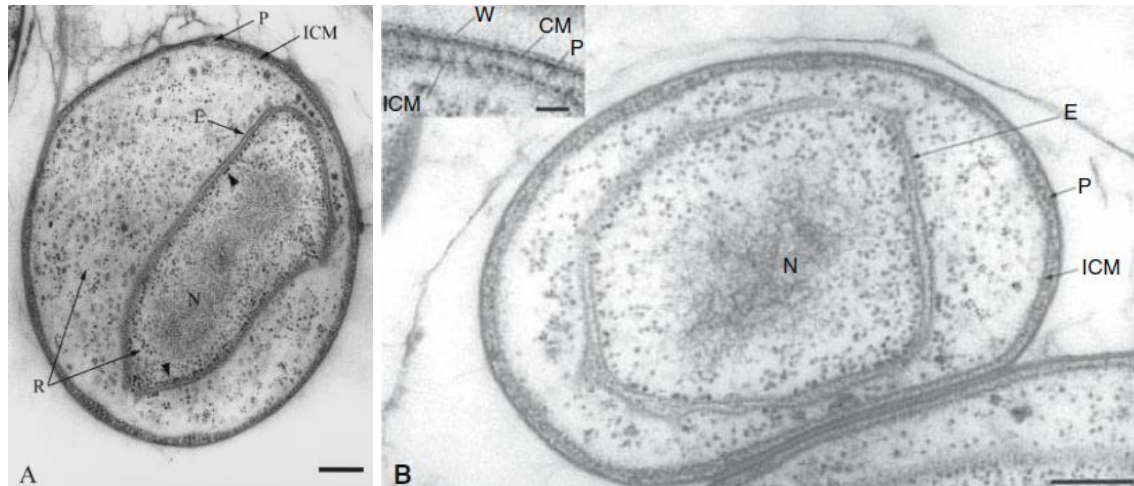


Figure 8: Transmission electron micrograph of a thin section of a cryosubstituted *Gemmata obscuriglobus* cell (A) and a bud cell (B) with large nuclear body containing an extensive fibrillar nucleoid (N) bounded by nuclear envelope (E) consisting of two membranes between which is a clear electron-transparent space. The nuclear body contains ribosomelike particles as well as the nucleoid. It is surrounded by cytoplasm which contains superficially similar ribosome-like particles and is bounded by a single ICM. The cell external to this ICM is rimmed by a paryphoplasm containing relatively electron dense cytoplasm (P). Bar is 0.2 μm . Inset: enlarged view of envelope of a bud cell showing a bilayered cytoplasmic membrane (CM) underneath the cell wall (W) but closely apposed to that wall. Paryphoplasm (P) is bounded peripherally by the cytoplasmic membrane (CM) and internally by the ICM. Bar is 20 nm. From Lindsay et al. (2001)

Anammox bacteria

The most impressive form of intracellular compartmentation inside the phylum *Planctomycetes* was found in the anaerobic Anammox-bacteria. These very slow growing planctomycetes perform an anaerobic ammonium oxidation with nitrate as electron acceptor. During the reduction of nitrite by ammonium to dinitrogen gas the toxic intermediates hydrazine and hydroxylamine are transiently produced in a special compartment called anammoxosom, which is surrounded by a single membrane. This membrane consists of special ladderanes, unique for these bacteria and by this used as biomarker in different studies. The organelle anammoxosome is located inside the riboplasm and is composed of a single membrane. It is also the first purified organelle from *Planctomycetes* (Sinninghe Damste et al., 2002). Isolated and intact anammoxosome membrane fractions showed a majority of 53% for ladderane in total lipid composition. Since ladderanes contain an

arrangement of up to five fused cyclobutane rings in a linearly concatenated chain, the fluidity of the anammoxosome membrane is limited by this rigidity. Due to this impermeability images with fluorophores do not show the inside of the compartment and it was suggested that this is also true for hydrazine. The nucleoid also lies highly condensed inside the riboplasm and is often in direct contact to the anammoxosome membrane. The closeness of the possible DNA-damaging intermediate hydrazine and the genomic DNA is of high risk for the cell and different models formulated for the anammox catabolism try to explain the process and the localization of the different compounds during the process. Also the tubule structure of the interior of the anammoxosome is of unknown function. Even a role in the cell division was discussed. At the moment five different *Candidatus* genera are described in literature, divided into ten different species (Vossenberg et al., 2008; Woebken et al., 2008; NCBI taxonomy browser). But none of them is available in pure culture, even so enrichments up to purity of 97.6% (van der Star et al., 2008) were reached in a membrane bioreactor with coculture of aerobic nitrifying bacteria (*Nitrosomonas*-species, oxidizing ammonia to nitrite) Members of the Anammox-bacteria share a common cell formation, but their origin and source conditions are different. Next to the freshwater bacteria *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* and *Candidatus Brocadia anammoxidans* from wastewater treatment plants, marine isolates like *Candidatus Scalindua sorokinii* could be found all over the world in anoxic habitats.

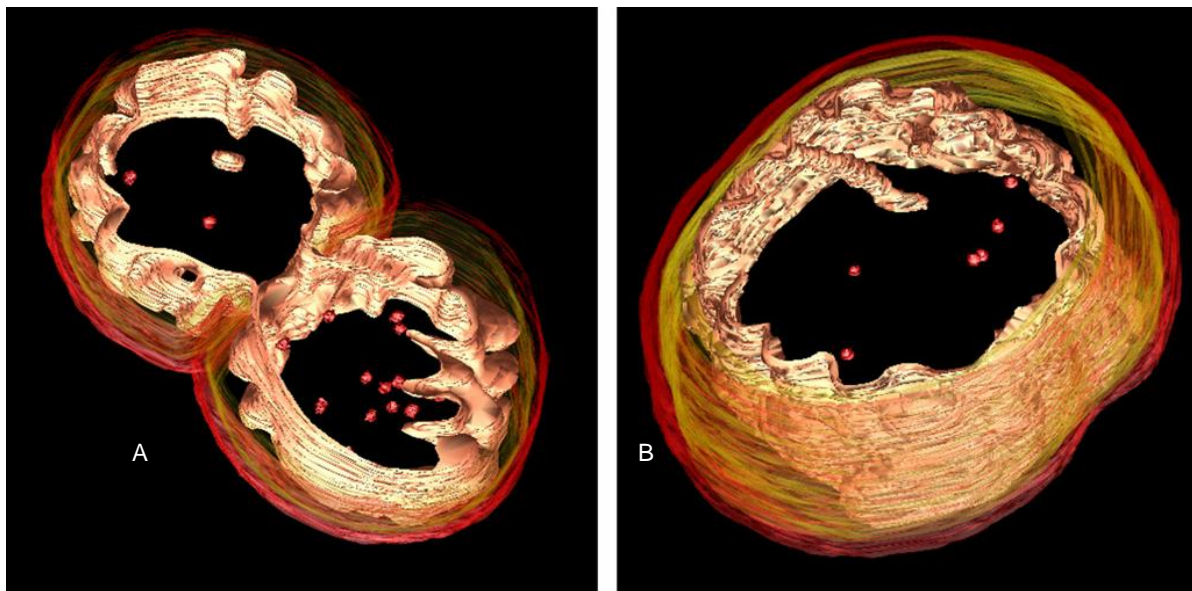


Figure 9: Snapshots of "*Candidatus K. stuttgartiensis*" electron tomography models showing the curved anammoxosome membrane and iron particles inside the anammoxosome. (A) Dividing anammox cell. (B) Single cell with deep protrusions of the anammoxosome membrane into the anammoxosome. Models show (from out- to inside) cell wall (in transparent red), intracytoplasmic membrane (in transparent yellow), anammoxosome membrane (in pink), and anammoxosome particles (in red). From Niftrik et al. (2008).

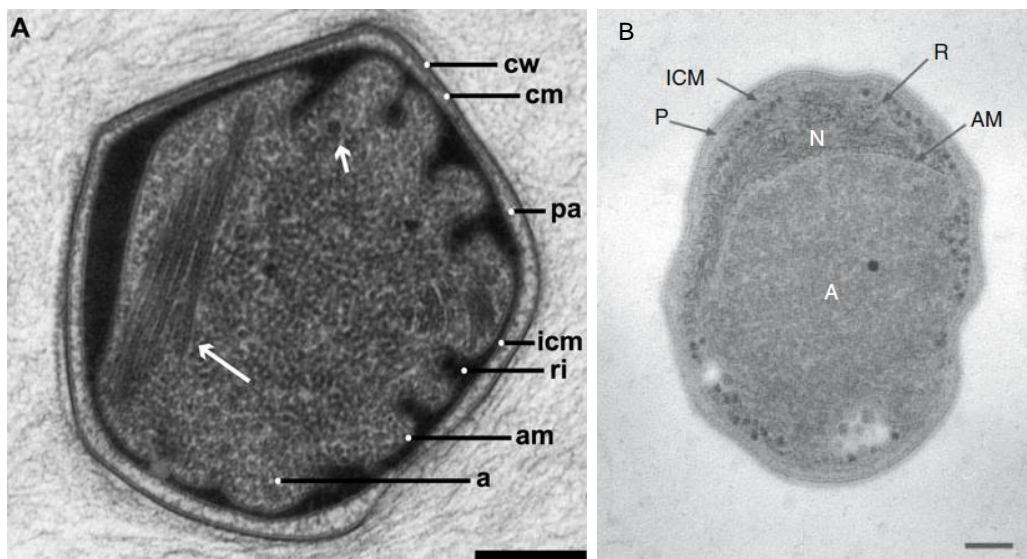


Figure 10: (A) Transmission electron micrographs of cryofixed, freeze-substituted, and Epon-embedded anammox cells showing the predominantly curved anammoxosome membrane, anammoxosome particles (smaller arrows) and tubule-like structures (larger arrows). “*Candidatus K. stuttgartiensis*” cells with curved anammoxosome membrane; cw, cell wall; cm, cytoplasmic membrane; pa, paryphoplasm; icm, intracytoplasmic membrane; ri, riboplasm; am, anammoxosome membrane; a, anammoxosome. (From Niftrik et al., 2008) (B) Transmission electron micrograph of a thin section of a cryosubstituted cell of “*Candidatus Brocadia anammoxidans*” from a bioreactor. A central anammoxosome (A) is surrounded by a single membrane (AM). The cytoplasm external to the AM contains the nucleoid (N) and ribosome-like particles and is surrounded by the intracytoplasmic membrane (ICM). A paryphoplasm (P) lies at the rim of the cell between the ICM and the cytoplasmic membrane closely apposed to the cell wall. Tubule structures are visible inside the anammoxosome. Bar is 0.1 μm . From Ward et al. (2006).

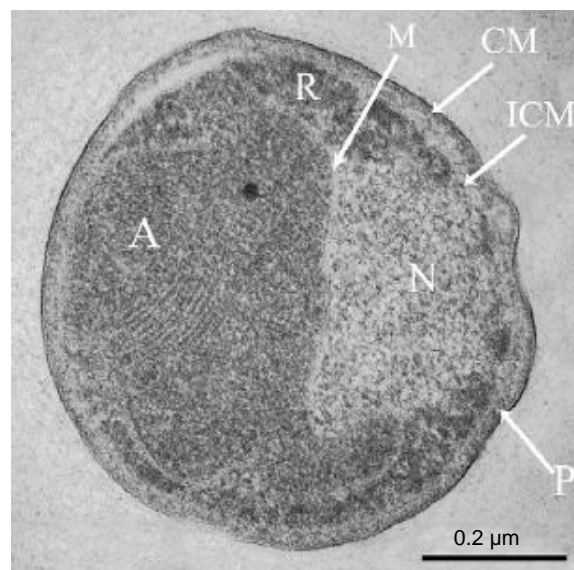


Figure 11: Transmission electron micrograph of thin-sectioned "*Candidatus 'Anammoxoglobus propionicus'*". Cells have the conventional anammox cell components: An anammoxosome (A) containing tubule-like structures, riboplasm (R) containing the nucleoid (N) apposed to the anammoxosome membrane (M), paryphoplasm (P) separated from riboplasm by an intracytoplasmic membrane (ICM) and the cytoplasmic membrane (CM). From Kartal et al., (2007).

Schlesneria and Planctomyces

Two more genera of *Planctomyces* were validly described; *Schlesneria paludicola* and *Planctomyces* sp. (see Fig. 14). Both show the typical planctomycete features like proteinous cell wall with the absence of peptidoglycan, proliferation by budding and an intracytoplasmic compartmentation. Since cell construction is very similar to *Pirellula*-type cells, no detailed description will be made here.

Table 1: List of *Planctomyces* in literature and EM investigations (References of EM work)

Planctomyces species		References
<i>Planctomyces</i>	<i>brasiliensis</i>	Fuerst et al., 1997;
<i>Planctomyces</i>	<i>limnophilus</i>	Ward et al., 2006
<i>Planctomyces</i>	<i>maris</i>	Ward et al., 2006; Lindsay et al., 2001; Schlesner & Hirsch, 1984
<i>Planctomyces</i>	<i>bekefii</i>	Ward et al., 2006
<i>Planctomyces</i>	<i>guttaeformis</i>	
<i>Planctomyces</i>	<i>stranskae</i>	Ward et al., 2006
<i>Pirellula</i>	<i>staleyi</i>	Ward et al., 2006; Butler et al., 2002; Fuerst, 2005
<i>Blastopirellula</i>	<i>marina</i>	Ward et al., 2006; Lindsay et al., 2001; Fuerst, 2005
<i>Rhodopirellula</i>	<i>baltica</i>	Schlesner et al., 2004; Schlesner & Hirsch, 1984; Gade et al., 2004
<i>Isophaera</i>	<i>pallida</i>	Ward et al., 2006, Giovannoni et al., 1987; Lindsay et al., 2001
<i>Singuliphaera</i>	<i>acidiphila</i>	Kulichevskaya et al., 2008
<i>Gemmata</i>	<i>obscuriglobus</i>	Ward et al., 2006; Lindsay et al., 2001; Lee et al., 2009; Fuerst, 2005
<i>Schlesneria</i>	<i>paludicola</i>	Kulicheskaya et al., 2007
Candidatus species of Anammox-bacteria		
<i>Anammoxoglobus</i>	<i>propionicus</i>	Kartal et al., 2007
<i>Kuenenia</i>	<i>stuttgartiensis</i>	Niftrik et al., 2008
<i>Jettenia</i>	<i>asiatica</i>	

<i>Brocadia</i>	<i>anamnoxidans</i>	Ward et al., 2006; Lindsay et al., 2001
<i>Brocadia</i>	<i>fulgida</i>	Niftrik et al., 2008; Kartal et al., 2008
<i>Scalindua</i>	<i>brodae</i>	Schmid et al., 2003
<i>Scalindua</i>	<i>marina</i>	
<i>Scalindua</i>	<i>arabica</i>	
<i>Scalindua</i>	<i>sorokinii</i>	
<i>Scalindua</i>	<i>wagneri</i>	Schmid et al., 2003

Electron microscopy of *Rhodopirellula baltica*

Recently new strains of *R. baltica* and close related species were isolated from marine water sites all over Europe and even from African and Asian samples. In total 70 new isolates were described by Winkelmann and Harder in 2009. They show a high similarity to the type strain of *Rhodopirellula baltica* SH1 in molecular and biochemical analysis. 16S rRNA gene similarity was at least 92% with values up to 99% and 100% identity. Analysis of metabolic capacities and cell composition also suggested a close relationship (data not shown). Since light microscopic pictures already showed an intracellular compartmentation in distinct growth phases, electron microscopic analysis was approached to proof the morphological feature.

SEM pictures

Since cells of *Rhodopirellula baltica* are of a very small size (1 μm x 2 μm in average), resolution of SEM was too low for detailed pictures of surfaces structures and cell appendages. The pear-shape cell form and an attachment of cells by the smaller cell pole could be determined by the micrographs. Measurable cell size varied between 0.5 μm x 0.5 μm for small cells, eventually freshly budded cells, to 1.0 μm x 1.5 μm . Filamentous structures connect distant cells. Since the approaches were applied to a dense grown culture in M13a medium, concentrated by centrifugation, no single cells were found. The old technique of image processing by an analog camera provided some problems, since pictures seem to be out of focus, even if the monitor showed a clear image. Hence visible details on Fig. 12 (g) have to be interpreted very carefully. In SEM micrographs (Fig. 12 (h)) of *Schlesneria paludicola* strain MPL7^T, a new described *Planctomycete* (Kulichevskaya et al., 2007), a fibrillar structure similar to the one found in *R. baltica* is visible, which connects the

different cells. The structure was observed more frequently with cultures grown on chondroitin sulfate containing medium. This polymer is also used by *Rhodopirellula baltica* for growth and sulfatases are needed for catabolism. The genome of *Rhodopirellula baltica* posses several sulfatases. This fibrillar structures are possible an excreted enzyme composition.

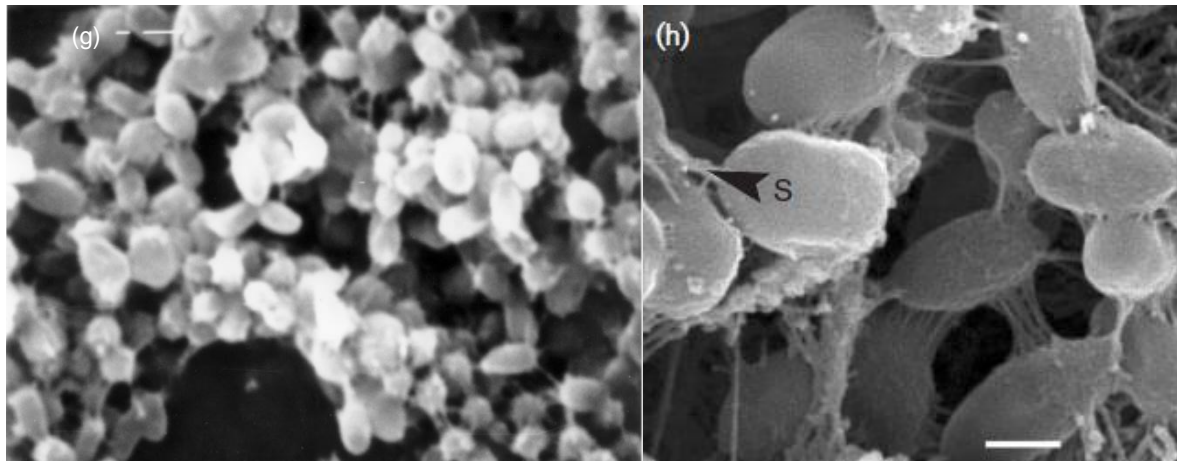


Figure 12: Scanning electron micrographs of cells of *Rhodopirellula baltica* strain SH398 (in this study) and *Schlesneria paludicola* strain MPL7^T (Kulichevskaya et al., 2007) grown in liquid medium M13a (g) and MM with chondroitin sulfate (h), respectively. S, Short stalk-like structures. Bars, 1 μ m (g) and 0.5 μ m (h).

TEM pictures

Transmission electron microscopy of *Rhodopirellula baltica* and related strains was performed with electron microscopes equipped with a slow scanning CCD-camera and the resolution of the micrographs was higher. A high variation of techniques and protocols (see Material and Methods) resulted into numerous electron microscopic pictures of 10 different new isolated strains and the of the type strain SH1^T, as internal control. The different techniques were applied to obtain a consolidated view on the strains and to compare obtained images to all published micrographs of the phylum of *Planctomycetes*.

For further description terms of the following scheme of Niftrik (2008) are used. Membrane names are in principle valid for members of the genus *Rhodopirellula*, except they posses no anammoxosome membrane. Described pictures are on the image panel 1 to 11 of TEM micrographs.

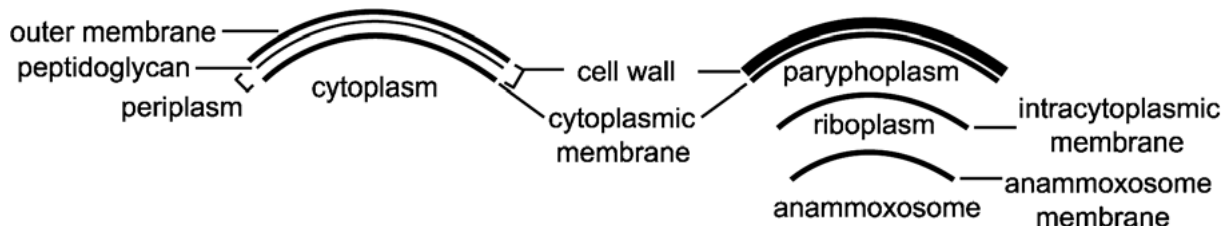


Figure 13: Schematic drawing comparing the Gram-negative cell plan (left) and anammox bacteria cell plan (right). From Niftrik et al. (2008)

The TEM micrographs of strains belonging to the DNA-DNA-hybridization groups A (type strain SH1), B (6C) and D (SM1) were recently reported (manuscript 2, Winkelmann et al., 2009). Cells of all three strains occurred singly, in pairs or in aggregates. They appeared to be round (all strains, in particular SM1) to ovoid (in particular SH1^T and 6C), i.e. slightly elongated and their average diameter was in the range of 1 to 2 μm . The cells appeared to be asymmetric: thin ($\sim 10\text{nm}$), long ($> 3 \mu\text{m}$), straight pili-like appendages were found attached on one cell pole. They never inserted all over the cell when present. About 20 to 30 nm thick, often short ($< 0.5 \mu\text{m}$), sometimes straight, but often curly appendages were occasionally found to be attached on the opposite pole. Sometime, a huge and complex network of appendages was found, in which the diameter of individual filaments could not be determined. All three strains showed an intracellular compartmentation, classical for *Planctomycetes*: A second membrane inside the cytoplasm, dividing the cytoplasm into the electron dense riboplasm or pirellusom with the nucleic acids and the ribosomes, and into an electron-lucent paryphoplasm, showing sometimes inclusion bodies.

The type strain SH1 revealed an intracellular compartmentation clearly visible in freeze-etched samples (A and B): the riboplasm is surrounded by the paryphoplasm that contained small structures, likely vesicles or storage compounds (panel 1, SH1^T, A). This image shows a small cell, likely a freshly budded cell, in contact with the large cell close to the riboplasm. The separated intracytoplasmatic membrane shows small pit-like structure, possible connections through the membrane. The shape of the riboplasm is elongated into the direction of the bud. In an earlier stage of the budding process a direct connection of riboplasm and bud could be possible. Micrograph B shows another layer of the cell. No clear separation into paryphoplasm and riboplasm can be detected. This feature is beyond or underneath the cut layer. At the right site of the cell hair-like structures leave the cell at one pole. Similar structures can be observed in micrograph D of a Pt-shadowed single cell. Long filaments are leaving the cell at one pole and particles seem to be attached to these structures. The other pole shows spotty structures, more visible in micrograph C. These tiny extensions (prosthecae) are restricted to one site of the cell; the opposite pole seems to be

smoother. Another Pt-shaded electron micrograph of *Rhodopirellula baltica* SH1^T was published in the species description of Schlesner and colleagues (2004) as typical image of the type strain (Fig. 2). A pear-shaped cell with a dark spot at the broader pole shows a hairy like structure at the smaller pole, suggested to be the holdfast substance. Although we obtained several new images of the type strain with the Pt-shaded techniques, a structure like this was only ones observed in micrograph D. This questions whether the micrograph is really a general view and whether the filamentous structure represents the holdfast substance or other cellular appendages like a bundle of flagella. The typical cell is possible orientated the other way around. Micrograph E shows a typical UDS image obtained in this study. A uneven outer boarder, possible cell wall and cytoplasmic membrane, surrounds an accumulation of membrane surrounded compartments. The larger round compartment fills approximately 50 percent of the cell and contains an electron dense amorphous structure with a dark spot in the middle. The dark spot represents the nucleoid and the compartment can be assigned as pirellosome. The smaller heteromorphy vesicles show similarity to the intracellular structures of micrograph A and figure 4.

A similar structure to the budding cell in SH1^T A is observed in cells of *Rhodopirellula* sp. strain 6C (panel 2, strain 6C, A and B) and strain SM1 (panel 3, strain SM1, B): a large, structured paryphoplasm surrounds the riboplasm and a new cell is viewed in the budding process. Shadowing with Pt (C and D) helped to visualize a polar structure: one pole has surface structures, while the other pole is rather smooth. Thin filamentous structures, which were found frequently using this technique, seem to establish contact between the cells. Ultrathin sections (E) of cells reveal the riboplasm to contain a nucleoid and the paryphoplasm with vesicle-like structures. The pole close to the riboplasm has extracellular structures, whereas the opposite pole is smooth and has cellular appendages, prosthecae. These protrusions were also observed in cells of *Pirellula staleyi* (fig. 15 b). The intracellular membrane is visible as thin line, dividing a light grey and a dark grey area with a black spot, the nucleoid. The outer membrane is often seen to be asymmetric: the outer leaflet is sharp, while the inner leaflet appears "fuzzy" (panel 3, SM1, E). Pt-shadowed cells of strain SM1 (C) showed a large number of prosthecae on one pole. The middle part of the cell had apparently collapsed due to air-drying. Ultrathin sections of cells of this strain revealed an unusual intra-nucleosomal fibrillar structure (panel 3, SM1, E). Such a structure was also observed in cells of *Blastopirellula marina* (fig. 3A). A freeze-etch micrograph of the cell wall of SM1 (A) shows a high number of hair like structures, restricted to one pole. Shadowing with Pt allows a closer look to these filamentous cell appendages like pili and flagella. Especially strain 6C showed a huge variation of appendages. There are thin and long filaments with length of about 5 µm and 8 to 16 nm thick, which are fairly or nearly in a straight line. Hence they are no flagella and look like pili. Another type of appendages is

thicker, up to 35 to 40 nm, and almost straight. Some of the filaments visible appear to be aggregates of thinner ones. The composition and function of these structures is unknown, but similar structures could be seen in cultures of *Planctomyces maris* (Fig. 14 (b)) and *Schlesneria paludicola* (Fig. 12 (h)) In conclusion, the micrographs supported the identification of strains 6C and SM1 as members of the *Planctomycetes*, but showed morphological differences between the three strains

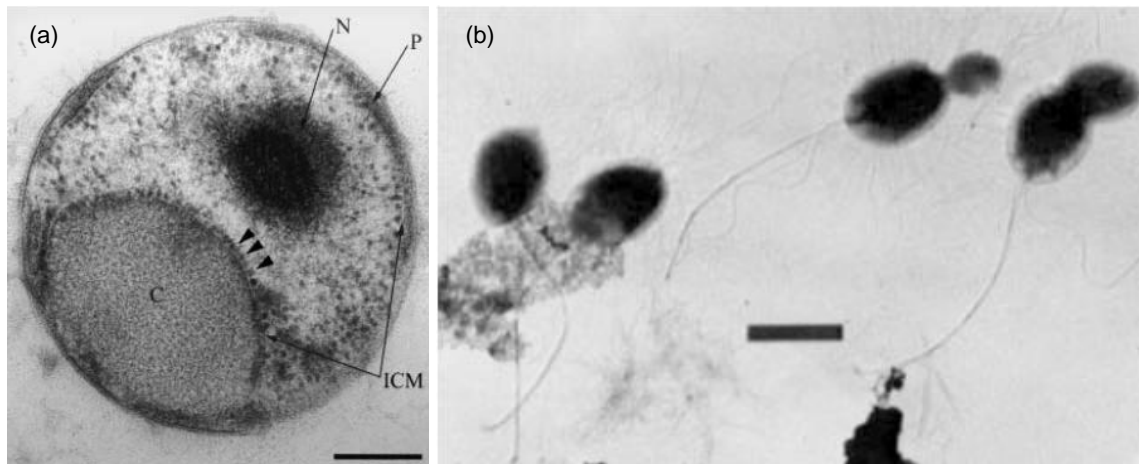


Figure 14: Transmission electron micrographs of cells of *Planctomyces maris*. (a) ultra thin section showing intracytoplasmic compartmentation and (b) shadowed cells with polar to subpolar buds, fibrillar stalks, subpolar flagella, and peritrichous fimbriae. Bar is (a) 0.2µm and (b) 1.0 µm. From Lindsay et al., (2001) and Ward et al., (2006).

Transmission electron microscopy at the MPI in Göttingen yielded into three different kinds of images: Ultra thin sections after chemical fixation (panel 4 to 10, A and B), ultra thin sections after high pressure freezing (HPF, panel 4 to 9, C to E and panel 10, A and B) and snapshots of electron tomography of strain SM38 (panel 11, C to E). Chemical fixation yielded in most of the strains into a good resolution and preservation of the outer cell structures, but the inner part of the cells showed often damages due to a weak fixation. Since cells of different OTUs, defined by molecular techniques in Winkelmann et al. (2009, manuscript 2), were used for TEM, we investigated differences between the groups and the type strain SH1^T but also the proof for intracytoplasmic compartmentation.

Rhodopirellula sp. strain SM35 and strain SM24 were assigned to OTU H and were both isolated from a beach at the Philippines. Strain SM35 in panel 4 shows round to ovoid cells, with an ICM and curly appendages at one cell pole, visible as well with chemical fixation (A and B) as with HPF of micrographs (C to E). Since the fixation of the pirellosome and especially of the nucleoid in A and B is weak, the differentiation into an electron dense

ribooplasm and electron lucent paryphoplasm is hard to see. But the ICM can clearly be seen as dark line surrounding two third of the cell at one pol. At this polar cap a curly like structure leaves the cell as appendage and is connected from ICM to cytoplasmic membrane and cell wall (panel 4 B). This feature can also be observed in HPF micrographs, but the contrast of this technique is much weaker. Thin sections also show a prosthecae like structure at the opposite cell pole to the pirellulosome (panel 4 C and E). The proliferation process by budding could be observed in panel 4 B, were a clear connection of two cells, a large and a smaller one, is visible. A connection through ICM is possible. Micrograph 4 D shows an unusual thick ICM, in some areas even looking like two membranes. A similar structure was observed in *Gemmata obscuriglobus* (fig. 8), where the ICM is supposed to be a double layer of a folded membrane. The *R. baltica* typical inclusion bodies inside the paryphoplasm are visible in panel 4 C and E. Strain SM24 also shows intracytoplasmatic inclusion bodies in image 5 C. This strain with ovoid to round cells shows in both preparation techniques a clear structured cell wall and cytoplasm membrane. Extracellular appendages are better conserved by chemical fixation (A and B), while HPF shows them more fuzzy (D). Intracellular structures like ICM and nucleoid are more visible in high pressure freezing fixation (C, D and E). Like strain SM35 of the same OTU, cells of strain SM24 posses prosthecae (D) and in some images an unusual thick ICM (E). The budding process is especially well documented in micrograph C: A round cell with an electron-dense pirellulosome and an electron-lucent paryphoplasm is connected by cell wall and cytoplasmic membrane to two cells, probable buds. The upper cell seems to be destroyed through preparation process, but the lower cell is intact and shows an ICM, cellular appendages and a shared cytoplasm with the mother cell. A similar structure of budding could be observed in *Isophaera pallida* (fig. 7d). Cells of strains SM35 and SM24 from OTU H seem to be very similar and show typical features of *R. baltica*.

Rhodopirellula sp. strain SM41 from panel 6 belongs to OTU C and is the sole investigated strain of this OTU by EM. Cells are pear shaped with a clear separation into the electron dense pirellulosome surrounded by an ICM at the broader cell pole. At this pole curly to long appendages are leaving the cells (6 A, B and D). The smaller pole shows inclusion bodies (6 B, C and E). In micrograph 6 E small hairy like structures are leaving the ICM into the direction of cytoplasmatic membrane and cell wall. Since some of them are also connected to membrane and cell wall, these structures could be an evidence for direct connection of extracellular appendages to the pirellulosome. This is also true for chemical fixation in image 6 B. Micrograph 6 D shows even more filamentous appendages at the cell pole next to the pirellulosome. Since this fixation method was also applied to cells of *Rhodopirellula baltica* strain SH796 in figure 15 d, structures look similar. The identification as crateriformed

structures should be questionable. At the smaller cell pole of panel 6 D a cellular connection to the next cell is visible.

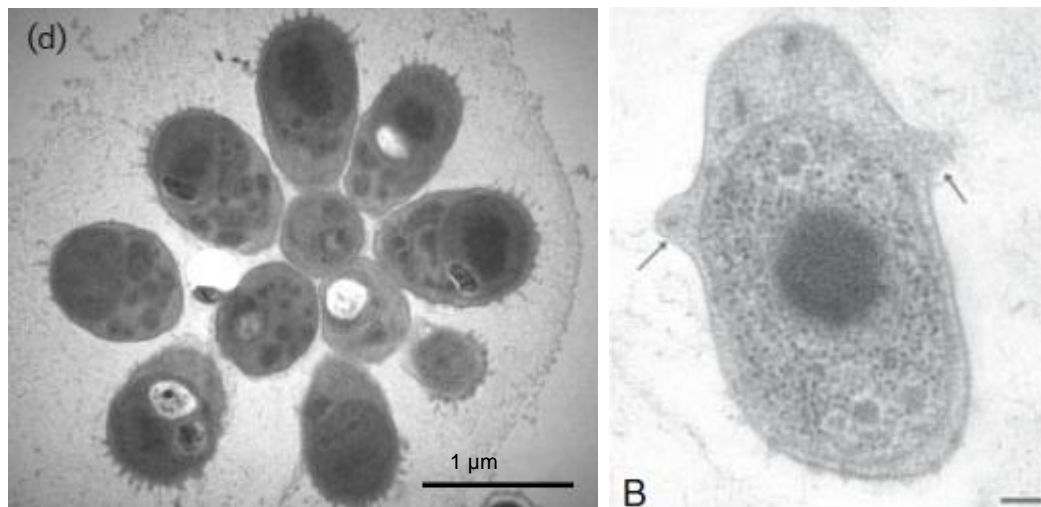


Figure 15: Transmission electron micrograph of thin section of (d) *Rhodopirellula baltica* strain SH796 and (B) cryosubstituted *Pirellula staleyi* ATCC 35122, showing hump-like protrusions (arrows) on either side of the cell. Bar is 0.1 μm. From Schlesner et al. (2004) and Butler et al. (2002).

The *Rhodopirellula* sp. strain WH49 from the island Sylt in the North Sea in panel 7 shows always round cells, even in phase contrast light microscopy of cultures of every growth phase. Cultures of strain WH49 are of pale pink to beige colour and form typical cell aggregates, the rosettes. In TEM cells show an ICM dividing the cells into the electron dense pirellulosome and the electron lucent paryphoplasm with several inclusion bodies (panel 7 C, D and E). Hairy like long structures leaving the cell next to pirellulosome and a connection of inner- and extracellular parts could be observed in panel 7 B and E. In images C and D this extracellular filamentous appendages are just as well conserved. A function for cell mobility could be assumed, since the structure is strictly restricted to one cell pole. Micrographs of chemical fixated cells contain with white spot-like structures inside the ICM surrounded compartments. Since these structures are only visible in this kind of preparation technique, they are possible artifacts. Since *Planctomycetes* are known for different kind of inclusions bodies, this could also be a storage compound or other important cell compartment. Similar light structures could be observed in figure 15 (d) in cells of *Rhodopirellula baltica* strain SH796.

Another OTU represented by only one isolate is *Rhodopirellula* sp. strain K587 in panel 8 A to F. The ovoid to round cells show the already observed intracytoplasmatic compartmentation and special features like inclusion bodies and cell appendages at the polar cap next to the pirellulosome (8 A to D). At the opposite pole cells posses pointed

prosthecae, visible in panel 8 D, E and F. In F even a cellular connection of two cells could be observed, possibly the end phase of budding process. The smaller bud already shows cell appendages next to the pirellulosome.

These filamentous structures are even more visible in TEM micrographs of *Rhodopirellula* sp. strain CS14 in panel 9 A to E. Liquid cultures of this strain were often very sticky and hard to pelletize by centrifugation. Chemical fixation of these cells caused huge problems and resulted micrographs showed a strange mucous structures of the cell wall, reminding to exopolysaccharides of pathogen bacteria (e.g. capsule of *Streptococcus* sp., visualized in Gottschalk et al., 1995). Thin sections were hardly performed (9 B). Only one micrograph shows an ICM and typical appendages next to the pirellulosome (9 A). Applying HPF preparation techniques was an improvement for the imaging of this strain. Unusual observations from light microscopy could be answered by TEM micrographs. Light microscopic pictures of strain CS14 already showed an unusual kind of aggregation, since cells attach to each other not only by cell pole but also at their long side. Even chain similar structures could be observed. TEM micrographs prepared by HPF (panel 9 C, D and E) show a coverage of the whole cell by different hairy like structures. At the cell pole next to the visible pirellulosome long most straightly appendages come out of the cell wall, with a possible connection into the interior cell. The rest of the cell surface is covered by approximately 150 to 300 nm long curly hairs, building a thick carpet like structure around two third of the cell. This observation could explain the fuzzy look of micrograph 9 A at the right side, by definition the vegetative pole. If this structure is sticky and builds the holdfast structure, attachment side by side and from one pole could be explained. 9 D shows a thin section through the vegetative pole with a corona of curly hairs around the cell wall and inclusion bodies inside the paryphoplasm. Appendages seem to be prolonged at the poles in comparison to the side wall of the cells.

For *Rhodopirellula* sp. strain SWK7 in panel 10 no clear statement of intracellular compartmentation could be made, since HPF preparation was not successful and cells were not supplied to chemical fixation. The building of an ICM could be suggested by the figure 10 A and B, but no complete intact membrane could be observed inside the cell and contrast of HPF prepared thin sections was low. Also the building of inclusion bodies could be assumed. *Rhodopirellula* sp. strain SM38 of panel 11 was successfully prepared by chemical fixation and cell shape as well as intracellular compartmentation and cell appendages at the reproductive pole could be observed. The elongated, ovoid shape was already observed by phase contrast light microscopy. Appendages at the reproductive pole are connected to the ICM via cell wall and cytoplasmatic membrane and details could be observed in micrograph 11 B. In micrograph 11 A and all other images of this strain electron light parts inside the cell could be observed. Since this feature was visible in all micrographs a preparation artifact is

unlikely. This hole maybe implicates a gas vesicle like structure, since the cells are unusual big in liquid culture and hardly to pelletize, which would support a gas vesicle. But in this case, phase contrast light microscopic picture should have shown this before, which was not the case. Since HPF was not successful with cells of strain SM38, this question can not be solved with the existing images. Another interesting aspect of the strain is shown in the snapshots 11 C, D and E. These images were created by cryo-tomography, like snapshots of *Candidatus Kueneria stuttgartiensis* in figure 9, performed by Niftrik and colleagues (2008). The focus of this preparation technique is a closer view of the cellular appendages at the reproductive pole, which are not only restricted to strain SM38. Structures are distributed evenly at one cell pole and show thick coil like parts next to the cell wall, which are reduced by distance. We hypothesize that these structures are flagella and the membrane persistent parts as motors. Since these appendages could be found numerous and despite different stages of cell cycle, the single flagellum of the juvenile cell, described by Schlesner et al. (2004) for species description is disputable and has to be considered carefully. Since new isolated strains are not clearly assigned to the species of *Rhodopirellula baltica* and type strain SH1^T is until today not accessible for tomography techniques, this question could not be answered at this stage.

Conclusions

Electron microscopy of *Planctomycetes* has been performed several times, since the intracellular compartmentation is of high scientific interest. Out of 23 in literature described species and *Candidatus* species 19 were documented by electron microscopy. Preparation methods differed only slightly due to different culture conditions. Also new techniques like tomography were developed and applied. All members of the phylum show intracellular compartmentation by an ICM and sometimes even further compartments. The majority of ribosomes is inside the pirellosome together with the nucleoid. Proliferation by budding could only sometimes be observed by EM.

Since only two EM micrographs of *Rhodopirellula baltica* type strain SH1 were published before (figure 2 and 4), comparison of new isolated *Rhodopirellula* sp. strains to the type strain was limited to our new micrographs. In conclusion, all new isolated strains show an intracytoplasmatic compartmentation and could be assigned morphologically to the phylum of *Planctomycetes*. Further typical features of *Rhodopirellula baltica* like budding, pear-shape, appendages and inclusion bodies were found frequently. In general TEM supported the molecular identification of new isolates affiliated at least to the genus and showed at the same time differences to the type strain and each other. The above-mentioned assignment of different OTUs and eventually new species inside this genus (Winkelmann et al., 2009; manuscript 2) was supported by this study, since differences were found. The new isolates

also showed new features or unusual arrangement of cell compounds or appendages. The most surprising result was visualized by tomography of strain SM38 and showed a high number of short flagella; this is in contrast to type strain description. This kind of appendages was visible in most of the prepared cells and even for preparation of SH1^T cells by another method, existence of more than one flagellum per cell and non-limitation to growth phase could not be excluded. Further analysis should occur by image providing technique to resolve the structure of cells and their appendages.

Material and Methods

Cultivation

Liquid cultures of *Rhodopirellula* sp. strains from a culture collection of the Max Planck Institute for Marine Microbiology in Bremen were grown in M13a medium at 24°C up to logarithmic growth phase. Strain SH1^T and SH398 belong to the species *Rhodopirellula baltica* and were described by Schlesner and colleagues (2004). The new isolated strains 6C, SM1, SM35, SM24, SM41, WH49, SM38, K587, CS14 and SWK7 were isolated from marine water sites from Europe and identified as *Rhodopirellula* sp. (Winkelmann and Harder, 2009). A molecular analysis grouped them into genetic species (Manuscript 2, Winkelmann et al., 2009).

Electron microscopic protocols

Electron microscopy of strains SH1^T, 6C and SM1

Cells were prepared for transmission electron microscopy as described in detail elsewhere (Rachel et al. 2002; Junglas et al. 2008). In brief, for visualizing whole cells, cells in suspension were chemically fixed by adding glutaraldehyde (final conc.: 2%), concentrated by brief centrifugation, applied onto carbon-coated copper grids, and shadowed with 1 nm Pt/C (angle: 15 deg). For freeze-etching, unfixed, concentrated cells were quickly frozen in liquid nitrogen, fractured in a high-vacuum chamber (CFE 50, Cressington, Watford, England), etched for 4 min, and shadowed with 1 nm Pt/C (45 deg) and 10 nm C (90 deg). For ultrathin sections, a pellet of unfixed cells was immobilized by high-pressure freezing (Leica EM-PACT2), freeze-substituted in acetone / 2% OsO₄ / 5% H₂O, and embedded in Epon. All electron micrographs were recorded digitally (slow-scan CCD camera; TVIPS, Gauting, Germany) on a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 120 kV.

Electron microscopy of further strains

The cells were harvested at 2000 rpm using a Stat Spin Microprep 2 table top centrifuge. After centrifugation the pellet was fixed by immersion using 2 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4. Fixation was performed for 60 min at room temperature. The fixed pellet was immobilized with 2% agarose in cacodylate buffer at pH 7.4. The pellet was cubed and the pieces carefully washed with buffer and further fixed in 1% osmium tetroxide. After preembedding staining with 1% uranyl acetate, samples were dehydrated and embedded in Agar 100 (formerly known as Epon) (Luft, 1961). Thin sections (30-60 nm) were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a Philips CM 120 transmission electron microscope (Philips Inc. Eindhoven, The Netherlands).

Alternatively, the cells were pelleted, and vitrified in a BAL-TEC HPM-010 high-pressure freezer, freeze substituted in 0.1% tannic acid and 1% OsO₄ /0.5% glutaraldehyde, and embedded in Agar 100.

After ultrathin sectioning, images were taken in a Philips CM120 electron microscope (Philips Inc.) using a TemCam 224A slow scan CCD camera (TVIPS, Gauting, Germany).

For HPF a drop of the paste was placed on a flat embedding specimen holder (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and frozen in a Leica EM PACT high pressure freezer with an automatic freeze substitution unit (AFS). Once the cells had been HPF they may be stored in liquid nitrogen indefinitely. The samples were substituted at -90°C in a solution containing anhydrous acetone, 0.1% tannic acid for 24h and in anhydrous acetone, 2% OsO₄ for additional 8h. After a further incubation over 20h at -20°C samples were warmed up to +4°C and washed subsequently with anhydrous acetone. The samples were embedded at room temperature in Agar 100 (Epon 812 equivalent), which hardened at 60°C over 24h.

Images were taken in a Philips CM120 electron microscope (Philips Inc.) using a TemCam 224A slow scan CCD camera (TVIPS, Gauting, Germany).

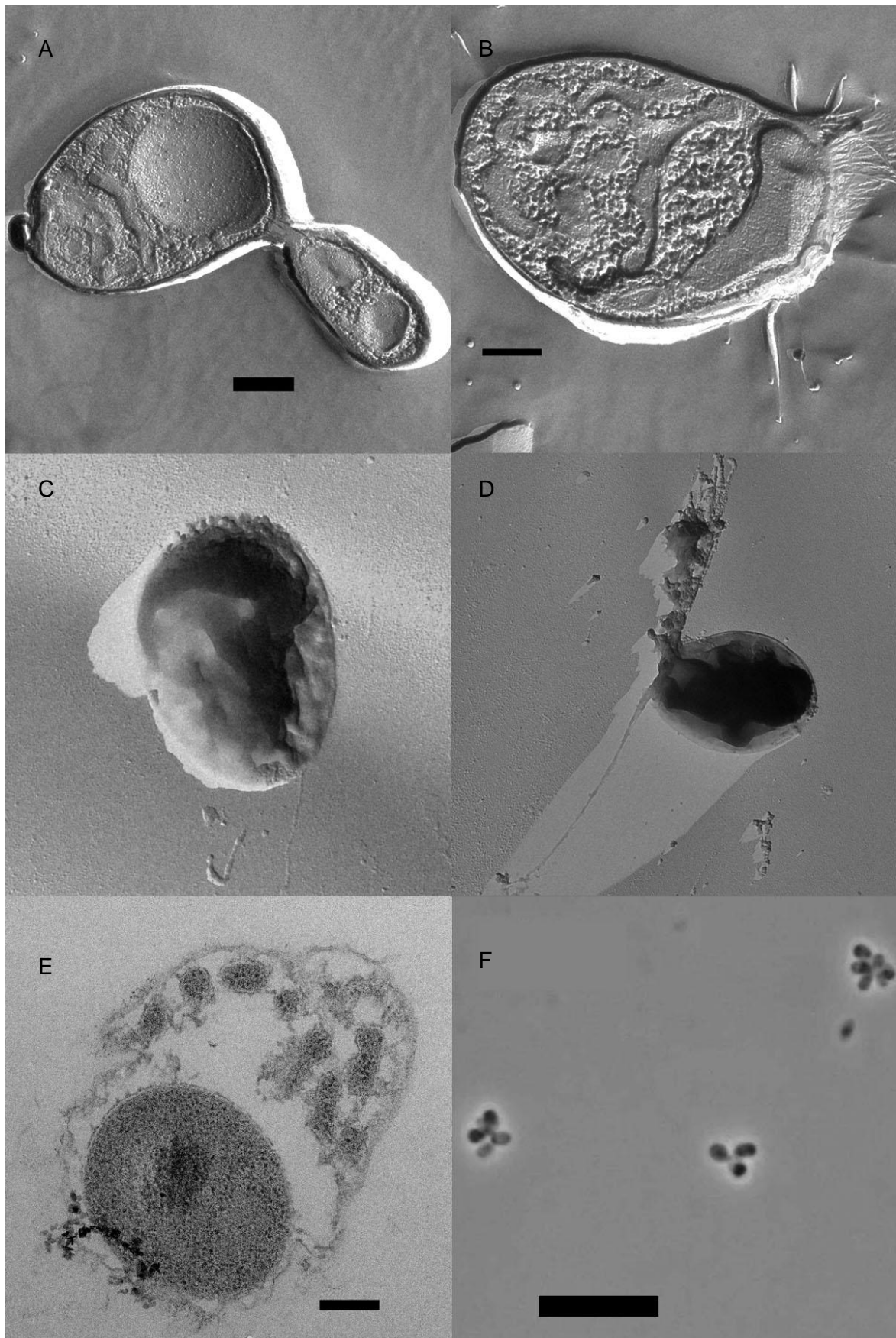
References

- Butler, M.K., Wang, J, Webb, R.I., Fuerst, J.A., 2002. Molecular and ultrastructural confirmation of classification of ATCC 35122 as a strain of *Pirellula staley*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1663–67
- Fuerst, J.A., 2005. Intracellular compartmentation in *planctomycetes*. Annu Rev Microbiol 59:299–328.
- Fuerst, J.A., Gwilliam, H.G., Lindsay, M., Lichanska, A., Belcher, C., Vickers, J. E., Hugenholtz, P., 1997. Isolation and molecular identification of *planctomycete* bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *penaeus monodon*. Applied & Environmental Microbiology 63:254-262.
- Gade, D., Schlesner, H., Glöckner, F.O, Amann, R., Pfeiffer, S., Thomm, A., 2004. Identification of *planctomycetes* with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. Microbial Ecology 47:243-251.
- Gimesi, N., 1924. Hydrobiologiai Tanulmányok [Hydrobiological studies]. I. *Planctomyces Bekeffii* Gim. nov. gen. et sp. [Hungarian with German translation]. Budapest:Kiadja a Magyar Ciszterci Rend, 1–8.
- Giovannoni, S.J., Godchaux, W., Schabtach, E., Castenholz, R.W., 1987b. Cell wall and lipid composition of *Isosphaera pallida*, a budding eubacterium from hot springs. J Bacteriol 169:2702–2707.
- Giovannoni, S.J., Schabtach, E., Castenholz, R.W., 1987a. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs. Arch Microbiol 147:276–284.
- Gottschalk, M., Kolberg, J., Charland, N., Jaques, M., 1995. *Streptococcus pneumoniae* Types 19A and 19F and *Streptococcus suis* capsular type 8 share common capsular epitopes. J. of clinical microbial. 33:2492-2495
- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Huber, H., Rachel, R., 2008. *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. Arch. Microbiol. 190:395-408
- Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2007. Candidatus “*Anammoxoglobus propionicus*” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 30:39-49.
- Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2008. Candidatus ‘*Brocadia fulgida*’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. FEMS Microbiol. Ecol. 63:46-55
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Damste, J.S.S., Dedysh, S.N., 2008. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp nov., a non-filamentous, Isosphaera-like planctomycete from acidic northern wetlands. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1186-1193.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Belova, S.E., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Rijpstra, W.I.C., Damste, J.S.S., Zavarzin, G.A., Dedysh, S.N., 2007. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from Sphagnum-dominated boreal wetlands. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2680-2687.
- Lake, J.A., Rivera M.C., 1994. Was the nucleus the first endosymbiont? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2880–2881
- Lee, K.-C., Webb, R.I., Fuerst, J.A., 2009. The cell cycle of the planctomycete *Gemmata obscuriglobus* with respect to cell compartmentalization BMC Cell Biology 10:4
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Fuerst, J.A., 1997. Pirellosomes: a new type of membranebounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*. Microbiology 143:739–48

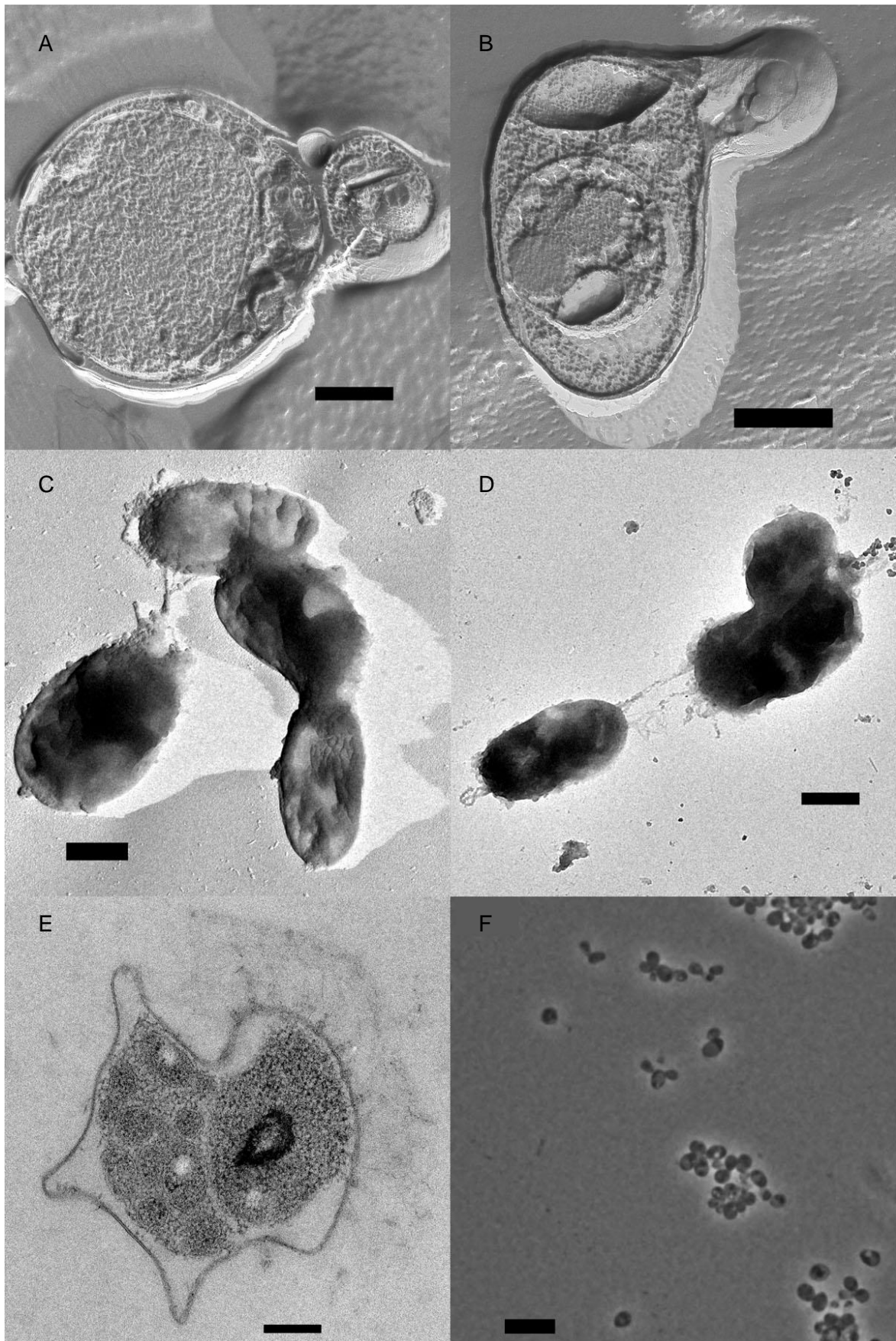
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous, M., Jetten, M.S., Butler, M.K., Forde, R.J., Fuerst, J.A., 2001. Cell compartmentalization in *planctomyces*: novel types of structural organisation for the bacterial cell. Arch. Microbiol. 175:413–29
- Luft, H.J., 1961 Improvements in epoxy resin embedding methods. J.Cell Biol. 9:409-414.
- Martin, W, Müller, M., 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392:37–41
- Porter, K.R., Claude, A., Fullam, E.F., 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. J. Exp. Med. 81:233-246.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., Huber, H., 2002. The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. Archaea 1:9-18
- 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., Hirsch, P., 1984. Assignment of ATCC 27377 to *Pirella* gen. nov. as *Pirella staley* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 34:492–495.
- Schlesner, H., Rensmann, C., Tindall, B.J., 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. 54:1567–80
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I.C., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J.A., Schouten, S., Damste, J.S.S, Harris, J., Shaw, P., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2003. Candidatus "*Scalindua brodae*", sp nov., Candidatus "*Scalindua wagneri*", sp nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Systematic & Applied Microbiology 26:529-538.
- Sinninghe Damste, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., van Duin, A.C.T., van Niftrik, L.A., Jetten, M.S.M., 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. Nature 419:708–712.
- Staley, J.T., 1973. Budding bacteria of the *Pasteuria-Blastobacter* group. Can J Microbiol 19:606–614
- Staley, J.T., Marshall, K.C., Skerman, V.B.D., 1980. Budding and prosthecate bacteria from freshwater habitats of various trophic states. Microb. Ecol 5:245-251.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1999. Missing lithotroph identified as new *planctomyce*. Nature 400(6743):446– 449.
- Taylor, F.J.R., 1976. Autogenous theories for the origin of eukaryotes. Taxon 25:377–90
- van de Vossenberg, J., Rattray, J.E., Geerts, W., Kartal, B., van Niftrik, L., van Donselaar, E.G., Damste, J.S.S., Strous, M., Jetten, M.S.M., 2008. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. Environ Microbiol 10:3120-3129.
- van der Star, W., Growth and metabolism of anammox bacteria. 15 April 2008. Dissertation at Delft University of Technology
- van Niftrik, L., Geerts, W.J.C., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Yakushevskaya, A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2008. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. J. Struct. Biol. 161:401-410
- Ward, N., Staley, J., Fuerst, J.A., Giovannoni, S., Schlesner, H., Stackebrandt, E., 2006. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E.,

Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 757–793.

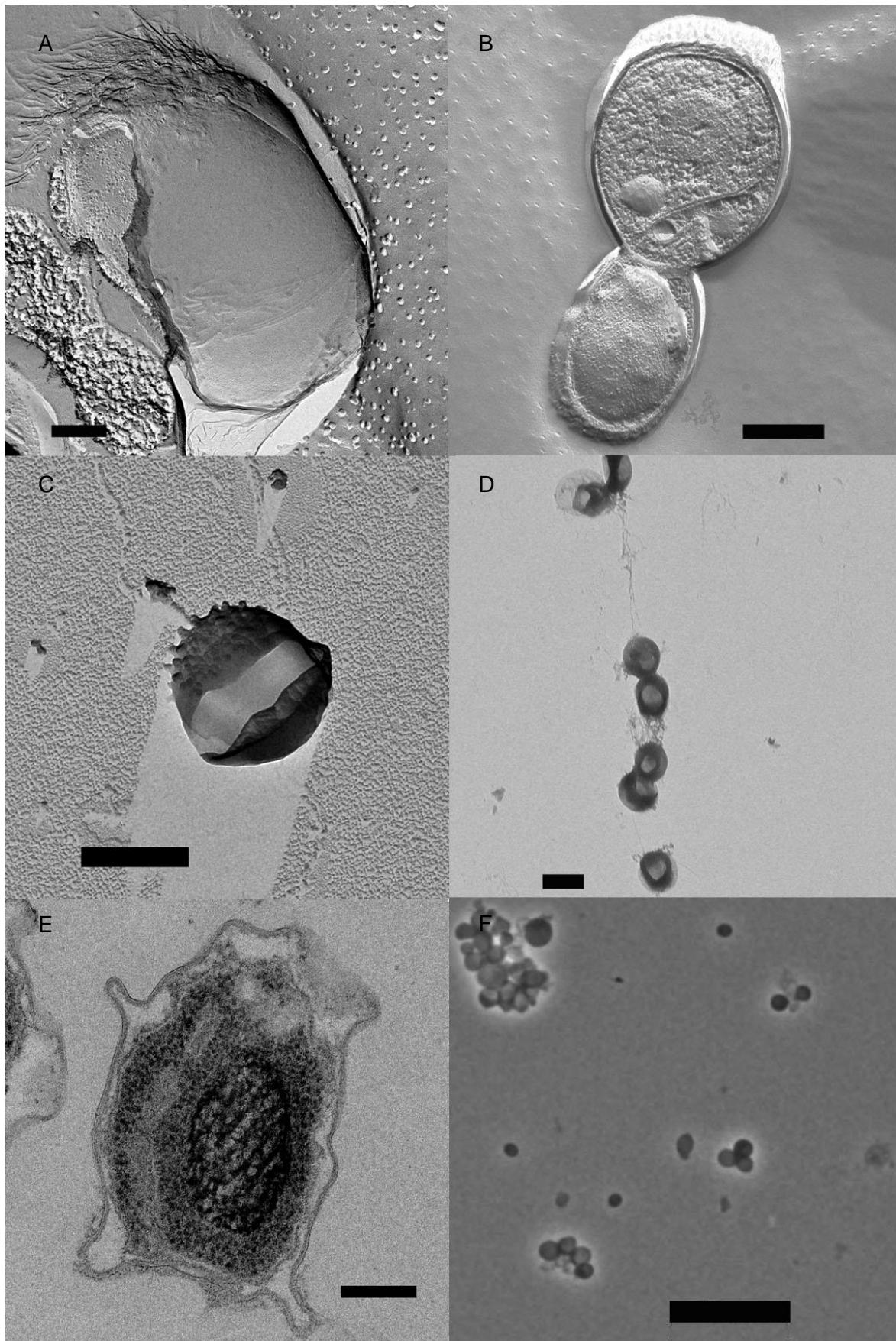
- Winkelmann, N., Jaekel, U., Meyer, C., Serrano, W., Rachel, R., Rossello-Mora, R., Harder, J., 2009, Diversity analysis of *Rhodopirellula* isolates from European Seas applying a multilocus sequence analysis (Manuscript 2 in preparation)
- Winkelmann, N., Harder, J., 2009, An improved isolation method for attached-living *Planctomycetes* of the genus *Rhodopirellula*, *Journal of Microbiological Methods* (in press)
- Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M.M., Naqvi, S.W.A., Kartal, B., Strous, M., Jetten, M.S.M., Fuchs, B.M., Amann, R., 2008. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel Candidatus *Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ Microbiol* 10:3106-3119.

Panel 1: TEM micrographs of SH1^T (prepared by R. Rachel in Regensburg)

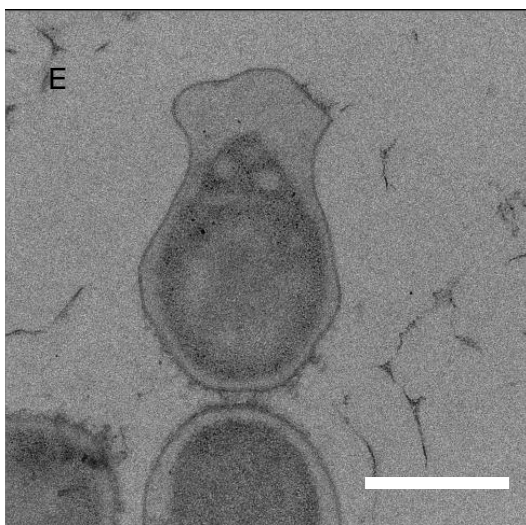
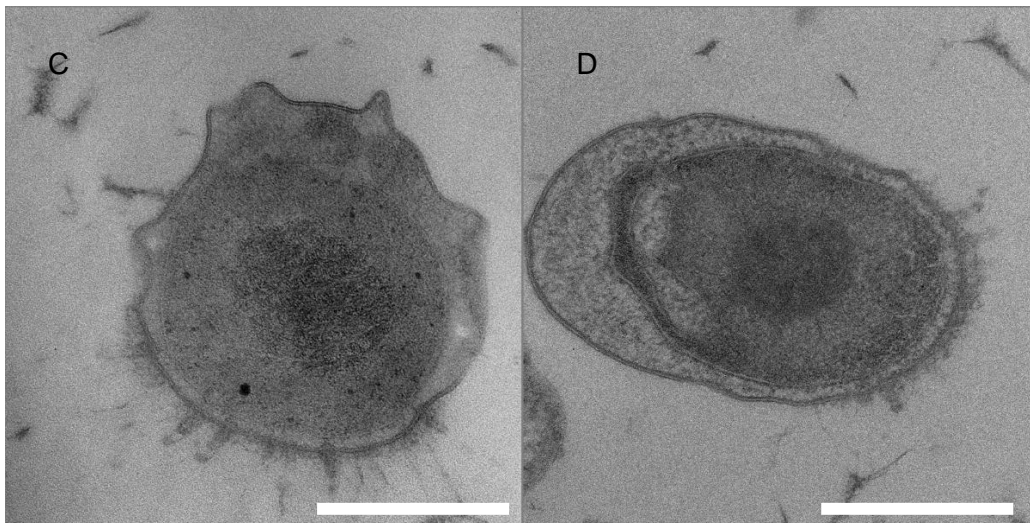
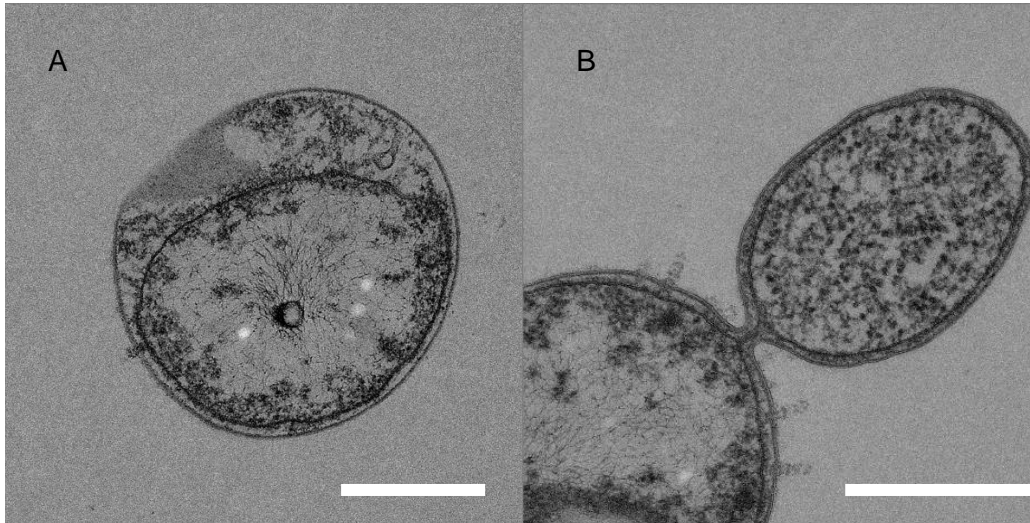
Bars: A = 400 nm, B = 300 nm, C and D no bar available, E = 200 nm, F = 5 μ m

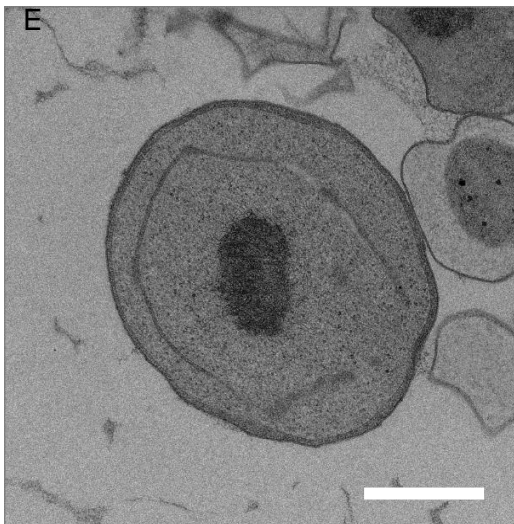
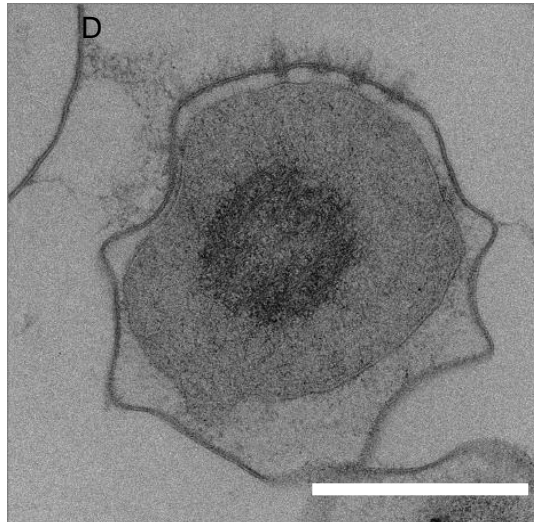
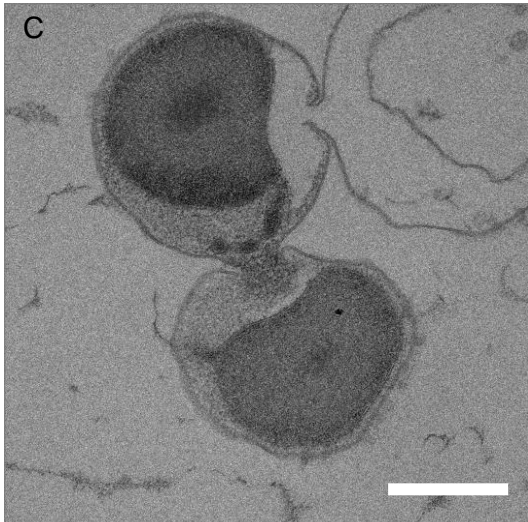
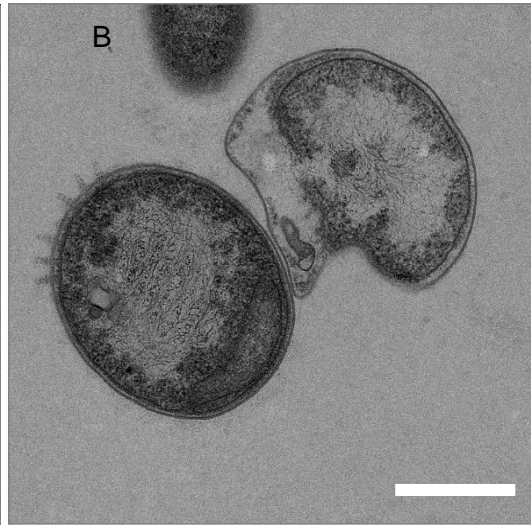
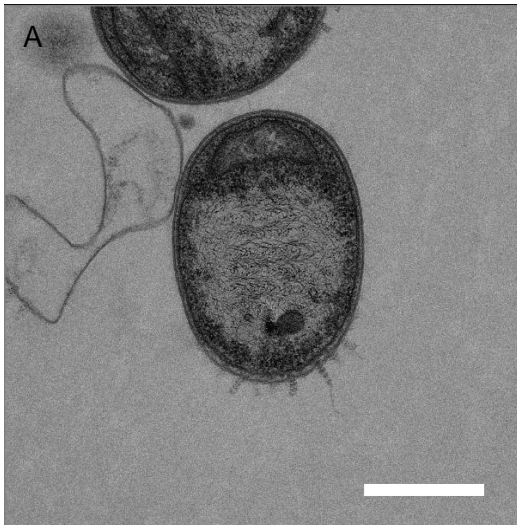
Panel 2: TEM micrographs of strain 6C (prepared by R. Rachel in Regensburg)

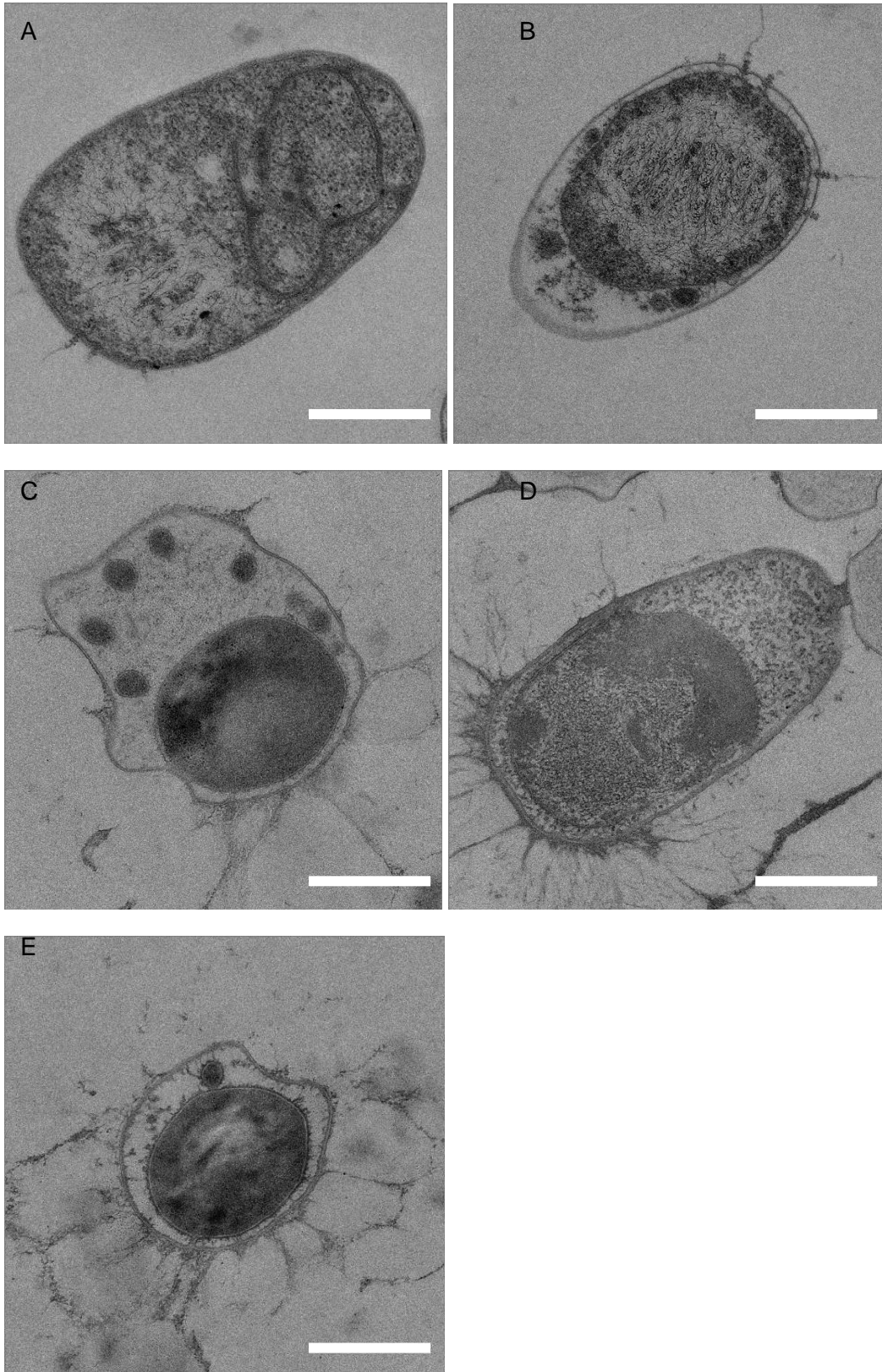
Bars: A and B = 500 nm, C and D = 600 nm, E = 200 nm, F = 5 μm

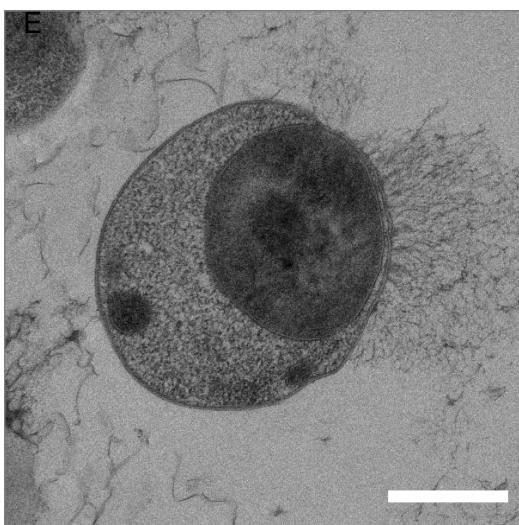
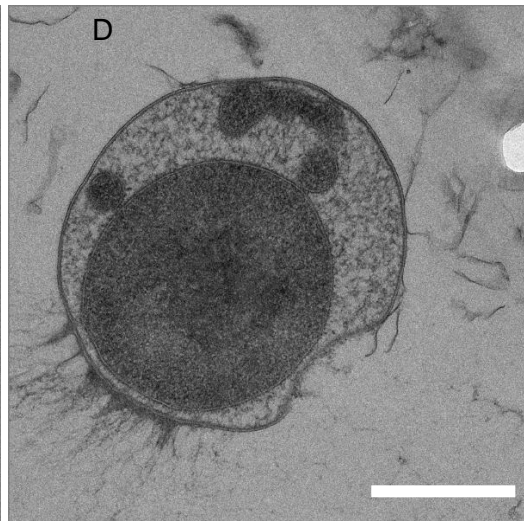
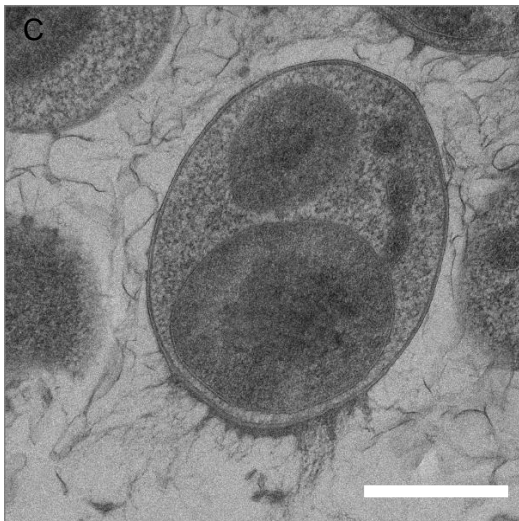
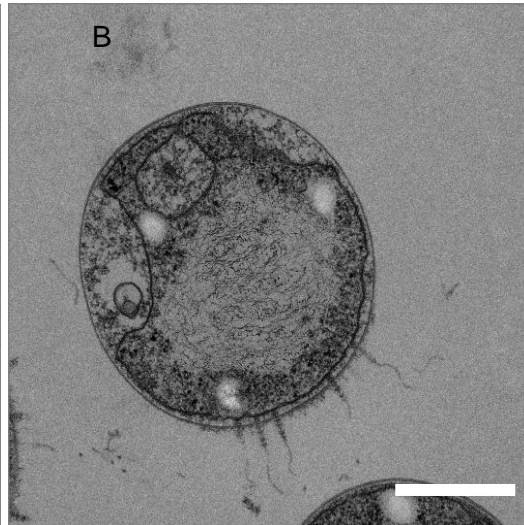
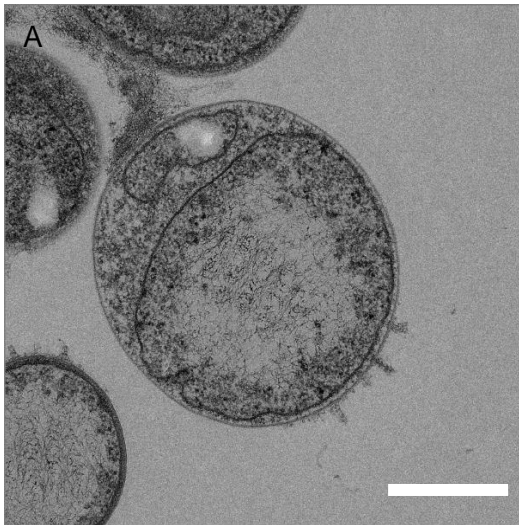
Panel 3: TEM micrographs of strain SM1 (prepared by R. Rachel in Regensburg)

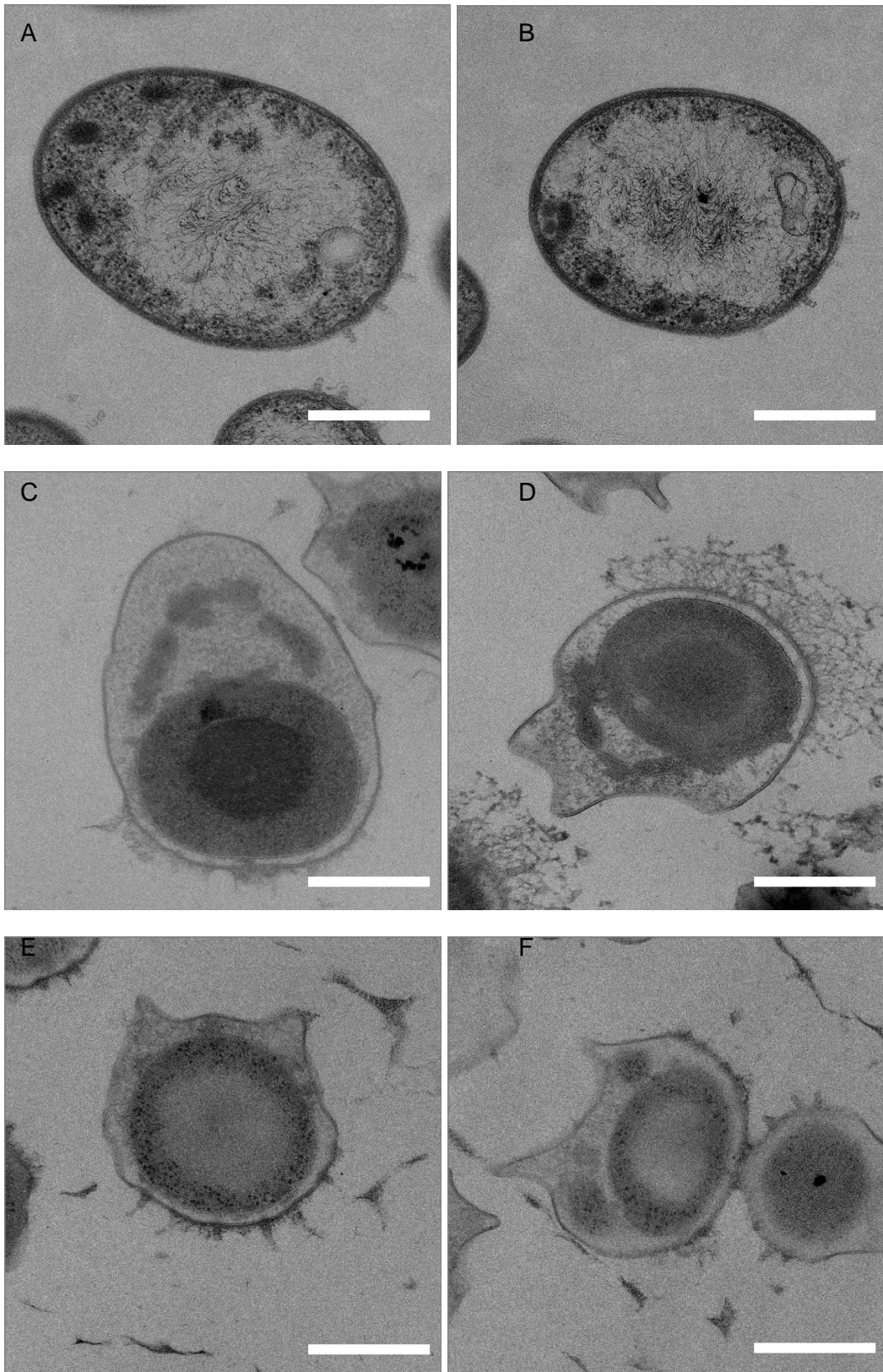
Bars: A = 200 nm, B = 500 nm, C = 600 nm, D = 1000 nm, E = 200 nm, F = 10 μ m

Panel 4 SM35EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm 

Panel 5 SM24EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm 

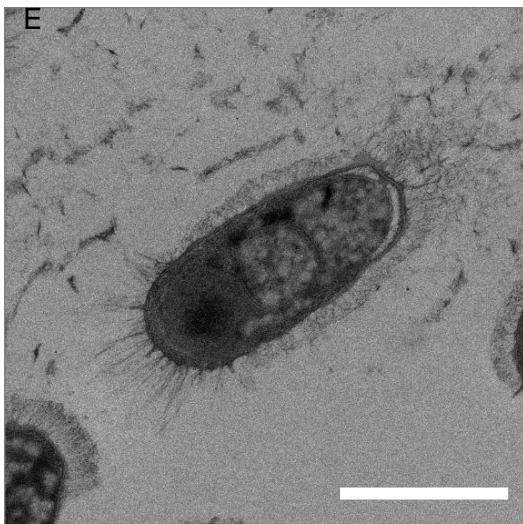
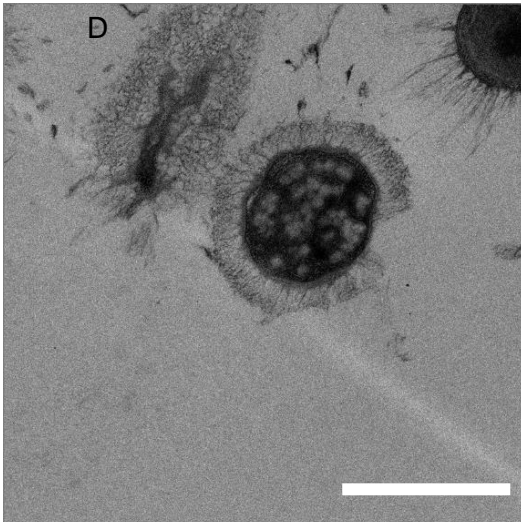
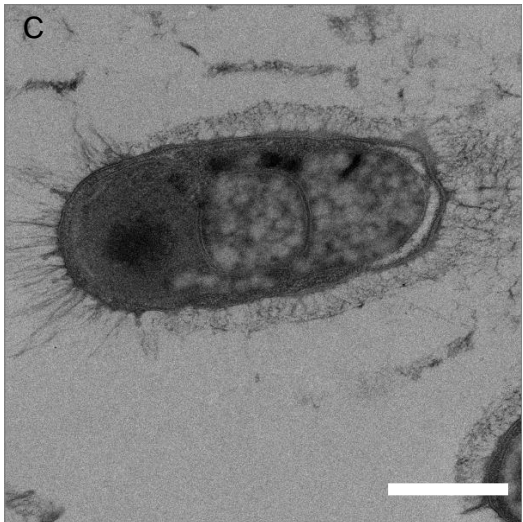
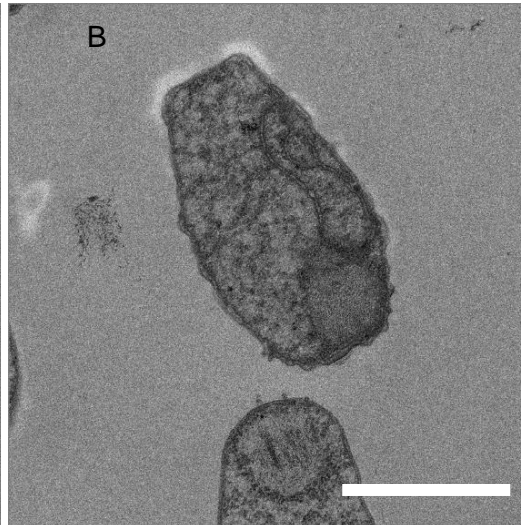
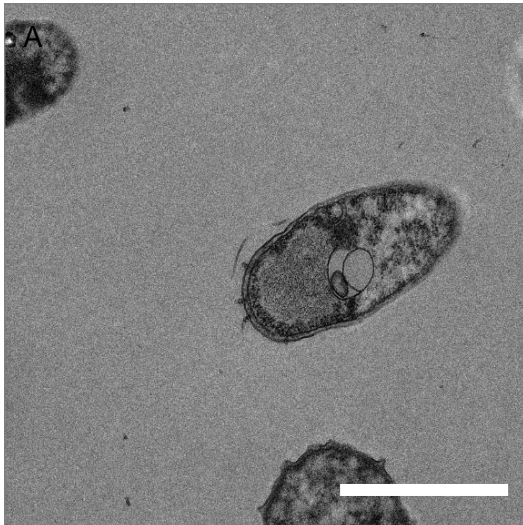
Panel 6 SM41EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm 

Panel 7 WH49EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm 

Panel 8 K587EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm 

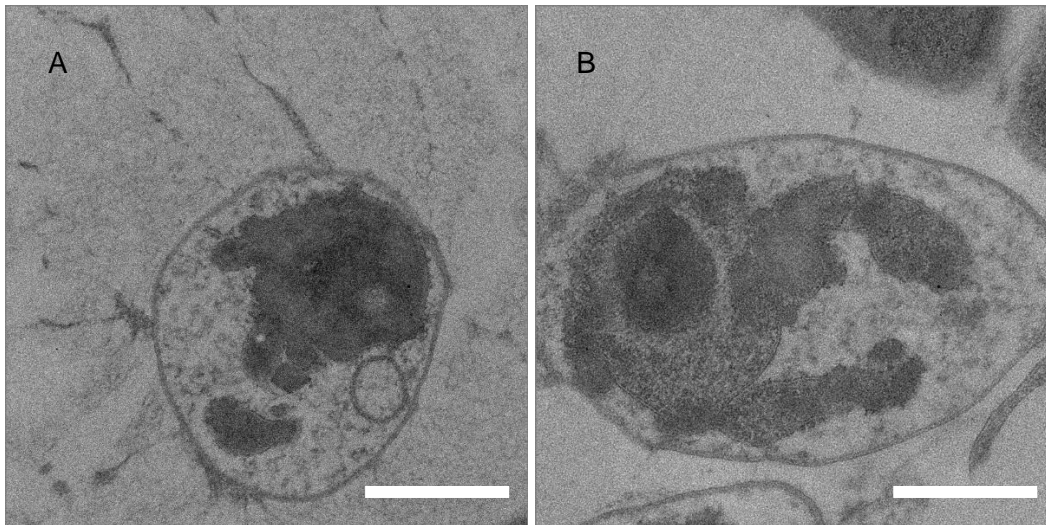
Panel 9 CS14

EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 1 μm (0.5 μm for C)



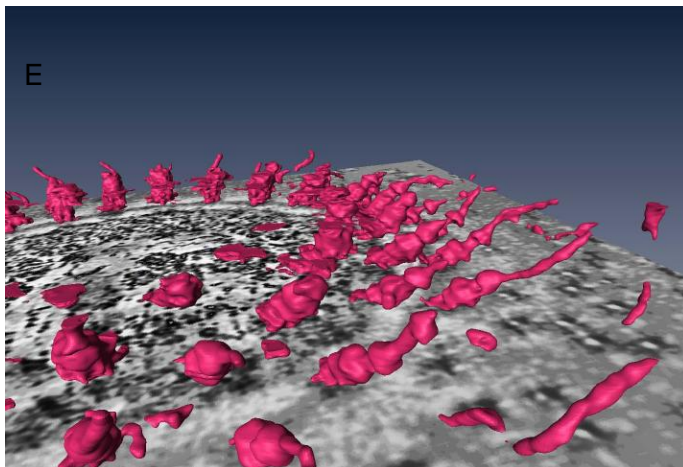
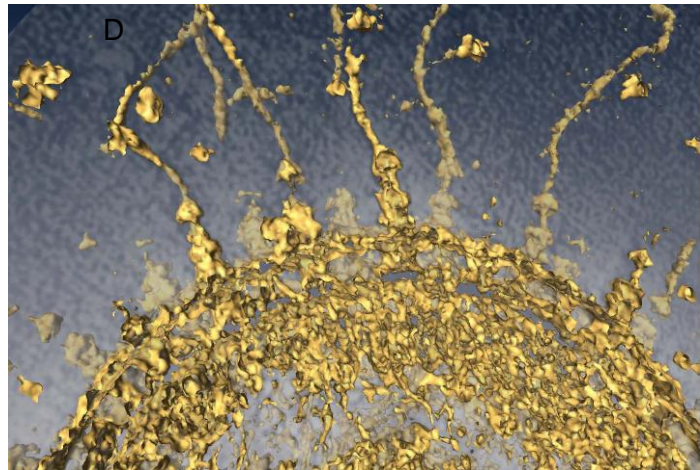
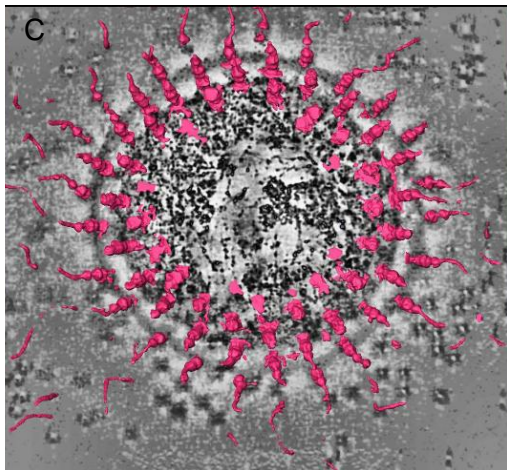
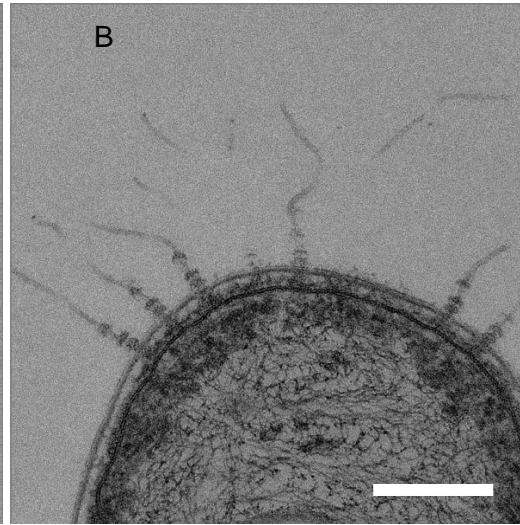
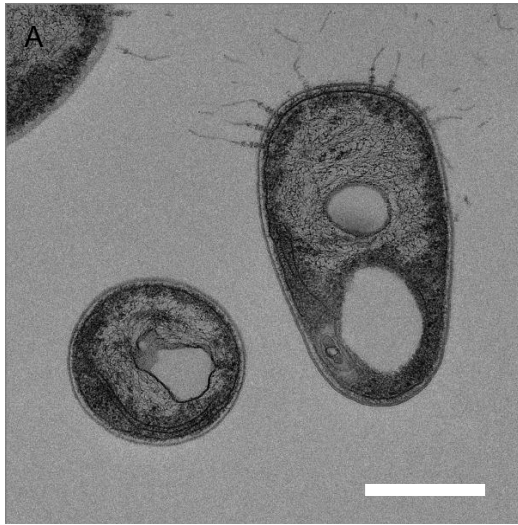
Panel 10 SWK7

EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm



Panel 11 SM38

EM Micrographs prepared at the MPI BPC in Göttingen, Bar is 0.5 μm and 0.3 μm



F Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei PD Dr. Jens Harder bedanken, für die jahrelange Unterstützung während des Projekts, der Diplomarbeit und ganz besonders während der Doktorarbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für Probleme und mindestens einen Vorschlag zur Lösung derer. Außerdem hat er das Thema zur Verfügung gestellt und das Erstgutachten übernommen, danke dafür.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Rudolf Amann für die Übernahme des Gutachtens bedanken sowie auch für die Unterstützung bei der ASM 2008 und Finanzierung.

Prof. Dr. Friedrich Widdel danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können und die Finanzierung.

Ich danke Dr. Heinz Schlesner für die Teilnahme am Prüfungskomitee sowie die stetige Ansprechbarkeit bei Fragen zu *Rhodopirellula baltica*, den er entdeckt hat. Ohne seine Arbeit wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Auch Prof. Dr. Anette Becker möchte ich für ihre Teilnahme am Prüfungskomitee sowie dem vorherigen Thesiscommittee danken. Ihre Anmerkungen aus dem Bereich der Pflanzengenetik und die andere Sichtweise waren hilfreich.

Ich danke meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Abteilung Mikrobiologie, insbesondere den Mitstreitern in Büro und Labor für eine schöne Zeit am MPI. Besonders Insa Werner, Olav Grundmann und Christina Probian möchte ich für ihre Unterstützung in Tat und Wort im Labor und auch privat danken. Die gelöste Atmosphäre wird mir fehlen.

Michael Roggenbruck und Johanna Eden danke ich für ihre Hilfe im Labor und dass sie ihre Zeit als HiWi bzw. FÖJlerin mit diesem tollen Thema verbracht haben.

Letztendlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer für mich da war: für die Unterstützung meiner Eltern im Studium und der Doktorzeit und ganz besonders bei René dafür, dass er stets zu mir gehalten hat und sich auch von schlechter Laune und Stress nicht hat abschrecken lassen. DANKE!