



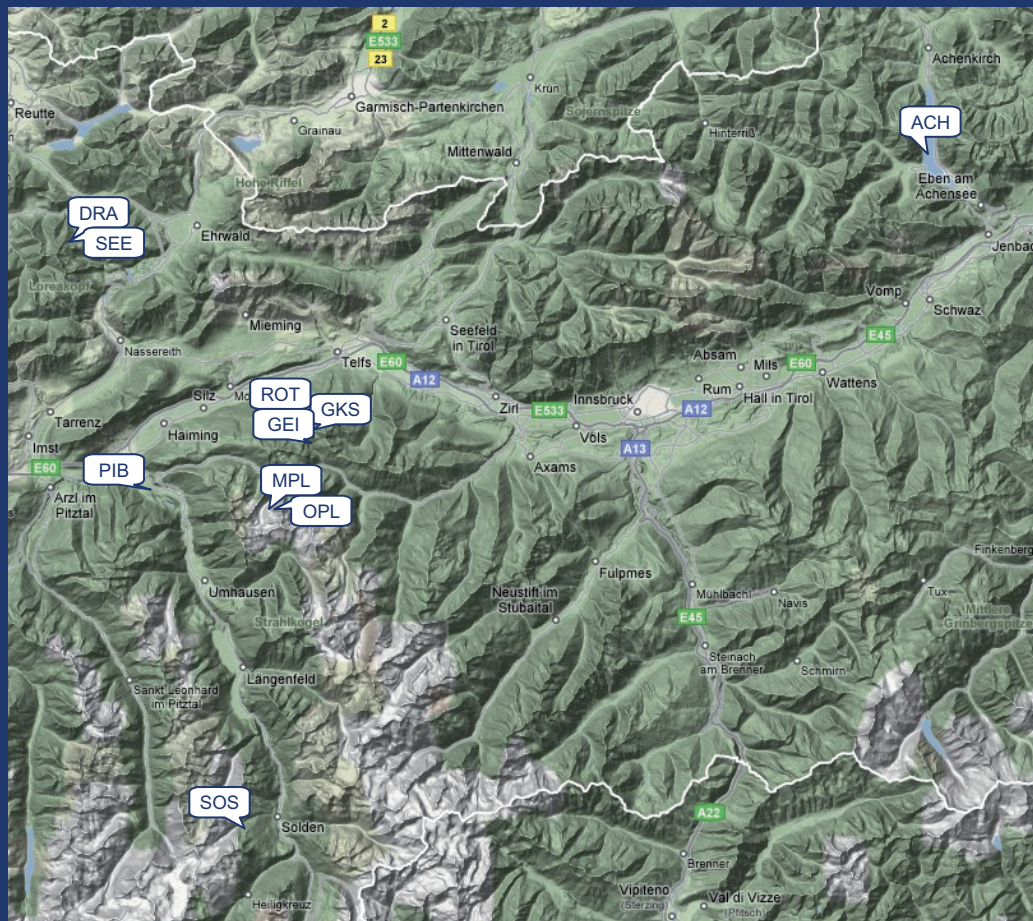
## Diversität und Ökologie von limnischen Actinobakterien



Gossenköllesee

Falk Warnecke  
Bremen 2004

Falk Warnecke – Diversität und Ökologie von limnischen Actinobakterien – Bremen 2004



10 km

<http://maps.google.com/>

# **Diversität und Ökologie von limnischen Actinobakterien**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der  
Universität Bremen vorgelegt von

**Falk Warnecke**

aus Sebnitz

Bremen 2004



## Inhalt

Danksagung.....	II
Zusammenfassung .....	III
Summary.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomie in der Mikrobiologie .....	1
1.2 Die Taxonomie und Phylogenie der Actinobakterien .....	2
1.3 Physiologie der Actinobakterien .....	7
1.4 Biotechnologische Bedeutung der Actinobakterien.....	7
1.5 Ökologie der Actinobakterien außerhalb von aquatischen Habitaten .....	9
1.6 Ökologie der Actinobakterien in aquatischen Habitaten.....	11
1.7 Methoden zur Untersuchung von unkultivierten Mikroorganismen .....	16
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	22
<b>2 Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>24</b>
2.1 Diversität und Phylogenie limnischer Actinobakterien.....	25
2.2 Abundanzen und Populationsstruktur .....	35
2.3 Aktivität und Kultivierung limnischer Actinobakterien.....	52
2.4 Ausblick.....	70
<b>3 Publikationen .....</b>	<b>73</b>
3.1 Publikationsliste .....	73
3.2 Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages.....	74
3.3 Abundances, identity and growth state of <i>Actinobacteria</i> in high mountain lakes of the Austrian Alps .....	86
<b>4 Literatur.....</b>	<b>114</b>

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Jakob Pernthaler und Rudolf Amann für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Sie überliessen mir ein interessantes und dazu auch noch erfolgversprechendes Thema. Ich bedanke mich für ihre kontinuierliche Unterstützung, die teilweise auch kontroversen Diskussionen, sowie die Schaffung einer ambitionierten und dennoch freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe... - ich weiss aus eigener Erfahrung, daß dies keine Selbstverständlichkeit ist! Den Professoren Klaus Jürgens (Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde) und Juliane Filser (Universität Bremen) danke ich für die freundliche und kurzfristige Übernahme der Prüfung.

Mein spezieller Dank gilt Claudia Bergin - für ihre moralische wie auch kritische Unterstützung, die unzähligen Ausflüge an die Wümmme und den Unisee (*also known as* ‚Runden um’n Block‘), ob nun ohne, mit 2 oder 8 Rollen.... Danke auch fuer Dein Engagement während der Organisation des Hiddenseeausflugs! Marc Mußmann möchte ich besonders für die wissenschaftlichen Spinnereien in der Abgeschiedenheit der Schweizer Alpen (*Viva Refugio Sponda!*) danken – auch wenn wir die wenigsten davon realisieren konnten (bzw. realisierbar waren?), sind es doch genau diese Erlebnisse, die die Freude an der Forschung erhalten!

Annelie Pernthaler und Bernhard Fuchs danke ich für die erfrischend unterschiedlichen Temperature und Mundarten im Büro, und ebenso Sebastian Behrens für die Wahrung der hochdeutschen Sprache! Desweiteren danke ich sehr herzlich meinen einzigartigen Kolleginnen Cecilia Alonso für ihre ansteckend gute Laune und die Einladung nach Uruguay, Elke Allers für das windige Wochenende auf Neuwerk, Tina Lösekann für ihre Kurierdienste zwischen Bremen und der Neuen Welt und Dagmar Wobken für ihre FISH-Lösungen, die ich so häufig mitbenutzen durfte... Ohne den *local guide* Ulrike Buck (*formerly known as* Burkert) hätte ich die vorwiegend durch Genbank-Einträge bekannte Fuchskuhle wohl nie in den tiefen Wäldern Brandenburgs gefunden. Die Probennahmen gehörten überhaupt zu den Höhepunkten meiner Doktorarbeit: An dieser Stelle sei Martin Allgeier und Hans-Peter Grossart (Fuchskuhle), Ruben Sommaruga und Julia Hofer (Tiroler Bergseen), Agnieszka Skowronska (Masurische Seen) sowie Amaya Garcia und Kim Milferstedt (Woods Hole) für ihre Hilfe bei Organisation und Durchführung derselben gedankt. Ich danke Chris Würdemann, Andreas Ellrott und Kousuke Ishii für spannende, wenn auch noch nicht publikationsreife Microarray-Experimente – oder war die Zeit noch nicht reif für die Experimente? Bei Frank Oliver Glöckner und Jörg Peplies möchte ich mich für die Unterstützung in allen ARB-Angelegenheiten bedanken. Dieses Programm hat mir einige Türen geöffnet!

Silke Wetzels und Joerg Wulf danke ich für den ‚*excellent technical support*‘ – unbezahlbar und man lernt es erst richtig zu schätzen, wenn man sich um alles selbst kümmern muss! Manfred Schlösser danke ich für die Organisation so mancher interessanter Veranstaltung, die sogar fast ein Zusammentreffen mit dem (ex)Kanzler ermöglicht hätte – wäre nur nicht die Oder zur gleichen Zeit über die Ufer getreten... Ich danke ebenfalls allen bisher nicht namentlich erwähnten Kollegen der Abteilung Molekulare Ökologie und des gesamten MPIs, insbesondere auch Jens Moltzen und Axel Krack für die Organisation und das Versenden meiner Kisten in die USA.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Uta Donner, meinen Eltern und meinem Bruder für ihre langjährige Unterstützung, ihre Geduld und Toleranz gegenüber meinen nicht selten überambitionierten Zielen!

Zu guter Letzt auch noch ein Satz zu den Sponsoren: Ich danke der Max-Planck-Gesellschaft und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung meiner Doktorarbeit, dem Bundesausbildungsförderungsgesetz und meinen Eltern für die Finanzierung meines Studiums, sowie den Steuerzahlern der DDR für die Finanzierung meiner Schulbildung. Ebenfalls möchte ich der Verwaltung des Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL) dafür danken, dass ich schon seit geraumer Zeit als Postdoc bezahlt werde, obwohl ich bisher noch keine offizielle Promotionsurkunde vorlegen konnte.

Berkeley, September 2007



## Zusammenfassung

Die Actinobakterien bilden im Bakterioplankton verschiedener Süßwasser-Habitats hohe Populationsdichten. Allerdings ist bisher wenig über ihre Diversität, Verbreitung, Physiologie und Ökologie bekannt. In dieser Arbeit wurde der ribosomale RNA-Ansatz angewendet, um die Diversität und Verbreitung der limnischen Actinobakterien (LAB) genauer zu untersuchen. Die gewählte Klonierungsstrategie und eine eigens entwickelte Screening-Methode erbrachten eine große Anzahl nahezu vollständiger 16S rRNA-Sequenzen aus verschiedenen Süßwasser-Habitats. So wurden die Sequenzinformationen und der Kenntnisstand über die Diversität der LAB umfassend erweitert. Die Mehrzahl der gewonnenen Sequenztypen bilden zusammen mit anderen Sequenzen aus überwiegend limnischen Habitats vier separate phylogenetische Gruppen. Die Sequenzgruppen *acI* bis *acIV* unterscheiden sich von jenen mariner Habitats und von Böden.

Anschließend wurden spezifische Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) zur Analyse der Populationsstruktur der LAB entwickelt. Für fünf dieser Sonden wurden durch teilweise neu entwickelte Testverfahren stringente Hybridisierungsbedingungen ermittelt. Vor allem die *acI*-Sequenzgruppe stellt eine dominante Gruppe innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft dar. Anhand drei weiterer Sonden wurde die Populationsstruktur innerhalb der *acI*-Sequenzgruppe genauer aufgelöst. Offenbar dominierten in unterschiedlichen Seen verschiedene Sub-Populationen. Die in den 16S rRNA-Genbanken ebenso häufig vertretenen Sequenztypen der *acII*-Sequenzgruppe erwiesen sich nach FISH in den untersuchten Habitats als weitaus weniger abundant.

In einer Feldstudie wurden zehn Gebirgsseen der Tiroler Alpen (Österreich) beprobt. Diese Seen unterschieden sich u.a. in ihrer Höhenlage und Wassertransparenz. Daraus ergibt sich für die aquatischen Organismen eine unterschiedlich hohe Belastung an UV-B-Strahlung, welche zu einer schädlichen Dimerisierung benachbarter Thymin-Basen im Genom der Organismen führen kann. Actinobakterien besitzen einen hohen molaren G+C-Gehalt ihrer genomischen DNA und damit eine höhere Anzahl an CC- (statt TT-) Dimeren. CC-Dimere sind thermodynamisch stabiler, so daß manche Bakterien mit GC-reichen Genomen höhere UV Resistenz aufweisen. Daher wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen relativen Häufigkeit der Actinobakterien und der UV-B-Einstrahlung im Oberflächenwasser besteht. Eine positive Korrelation dieser zwei Parameter wurde für hochalpine Seen (oberhalb der Baumgrenze) gezeigt ( $r^2=0,73$ ), jedoch nicht für zwei niedriger gelegene Seen.

Frühere Studien legten nahe, daß es sich bei den LAB um relativ inaktive Mikroorganismen handelt, die z.B. aufgrund ihrer Fraßresistenz gegenüber Protisten überdauern. Zum Testen dieser Hypothese wurden DNA-synthetisierende Populationen alpiner Seen auf Inkorporation von Bromdeoxyuridin untersucht und anschließend über Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung identifiziert. Der Anteil an aktiven Zellen der Actinobakterien entsprach in etwa dem Durchschnitt aller Bakterien. Eine Kombination von Mikroautoradiographie und FISH (MAR-FISH) zeigte zudem eine deutliche Präferenz von LAB für Aufnahme von Glucose im See Fuchskuhle. In Kultivierungsversuchen im Labor wurde darüberhinaus Wachstum von Vertretern des häufigen *acI*-Sequenztyps gezeigt. Allerdings gelang es nicht, eine Reinkultur dieser Gruppe umweltrelevanter Bakterien zu erlangen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß es sich bei den limnischen Actinobakterien der *acI*-Sequenzgruppe um abundante und aktive Vertreter des Süßwasser-Bakterioplanktons handelt. Sie bilden somit einen wichtigen autochthonen Bestandteil dieser mikrobiellen Gemeinschaften.

## Summary

Actinobacteria are highly abundant in freshwater bacterioplankton. However, little is known about their diversity, distribution, physiology and ecological role in the aquatic environment. In this thesis the rRNA approach was applied to elucidate the diversity and distribution of freshwater Actinobacteria (limnic Actinobacteria = LAB). The selected cloning strategy and a specifically designed screening method yielded many nearly-complete 16S rRNA sequences originating from diverse freshwater habitats. Thereby, the available sequence dataset and the awareness of diversity of LAB was comprehensively expanded.

Comparative Sequence analysis revealed that most sequence motifs along with published sequences from mainly freshwater habitats formed four monophyletic clades. The newly defined clusters *acl* to *aclV* were distinct from those from marine habitats and soils.

Based on phylogenetic reconstructions specific probes for fluorescence-*in situ*-hybridization (FISH) were designed to analyze the population structure of LAB. For five probes stringent hybridization conditions were determined by custom-developed testing strategies. The application of these probes demonstrated the abundance and importance of the actinobacterial *acl*-cluster in freshwater bacterioplankton. A subset of three probes targeting subgroups of the *acl*-cluster revealed differences in the community composition between different lakes. Clones of the *aclII*-cluster appeared equally abundant in 16S rRNA gene libraries, but the respective organisms were of minor numerical importance in the investigated habitats.

In a field study ten high mountain lakes in the Tyrolean Alps (Austria) were sampled. These lakes differed in e.g. their altitude and the water visibility leading to distinct exposures of aquatic organisms to UV-B radiation. The UV-B radiation damages DNA mainly by dimerisation of adjacent thymine bases. The genomic DNA of Actinobacteria contains a high molar G+C content and thus a higher number of CC-dimers than TT-dimers. CC-dimers are thermodynamically more stable. Thus, bacteria with genomes rich in G+C likely are more resistant to UV-B radiation. Therefore the hypothesis was tested, if there is a link between the relative abundance of LAB and the exposure to UV-B in surface layers of high mountain lakes. A positive correlation ( $r^2=0,73$ ) between the abundances of Actinobacteria and UV-B was shown for high mountain lakes above the timberline, whereas no correlation was found for two lakes at lower altitudes.

Previous studies have speculated that LAB are relatively inactive organisms surviving mainly due to their resistance to grazing by protists. To test this hypothesis DNA-synthesizing populations in high mountain lakes were identified. The results indicate that the proportion of active cells of all Actinobacteria was similar to the average proportion of active bacterial cells of total bacteria.

A clear preference of LAB for glucose-uptake was found in lake Fuchskuhle as demonstrated by combined micro-autoradiography and FISH (MAR-FISH). In cultivation attempts in the laboratory, growth of representatives of the environmentally important *acl* cluster was successfully stimulated. Future studies will focus on isolation of these bacteria into pure culture.

This thesis gives clear evidence that Actinobacteria of the *acl* cluster are an abundant and metabolically active group of freshwater bacterioplankton. Hence, they constitute an important autochthonous part of such microbial communities.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
BrdU	Bromdeoxyuridin
C	Cytosin
CARD	Tyramid-Signal-Amplifikation ( <i>Catalyzed reporter deposition</i> )
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1-( <i>-</i> carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indolocarbo-cyanin-N-hydroxy-succinimidester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese ( <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff ( <i>Dissolved organic carbon</i> )
<i>et al.</i>	und andere
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
LAB	Limnische Actinobakterien
NAG	N-Acetylglucosamin
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
T	Thymin
U	Uracil
UV-B	Ultraviolettes Strahlung in der Bandbreite 290-320 nm



# 1 Einleitung

## 1.1 Taxonomie in der Mikrobiologie

Die Klassifizierung der Mikroorganismen war im Laufe ihrer Entwicklung vielfältigen Veränderungen unterzogen. Diese Veränderungen beruhten vor allem auf der Etablierung und Anwendung neuer Methoden zur Merkmalsbestimmung der Mikroorganismen (Rossello-Mora und Amann, 2001).

**Morphologie.** Über einen langen Zeitraum wurden in der mikrobiologischen Forschung vor allem morphologische Charakteristika erfaßt: Dies bezog sich zunächst auf die Merkmale der Kolonien und nach Weiterentwicklung der Mikroskopie auch auf die Gestalt der prokaryontischen Zellen. Als Vorteil dieses Ansatzes ist die relativ einfache Bestimmbarkeit der Merkmale zu nennen. Jedoch ist heute bekannt, daß die Morphologie der Kolonie oder Zelle ein veränderliches Merkmal sein kann, welches z.B. vom Stadium im Zellzyklus oder dem physiologischen Zustand der Zellen abhängt (Ensign, 1998; Krsek *et al.*, 2000).

**Physiologie.** Die morphologischen Eigenschaften reichen in der Regel nicht zur Identifizierung eines Mikroorganismus aus. In Labor-basierten physiologischen Tests können weiterführende phänotypische Merkmale ermittelt werden; eine Reinkultur ist jedoch hierfür Voraussetzung. In diesen Experimenten werden Substratverwertungsprofile, Enzymaktivitäten und Wachstumsbedingungen sowie z.B. das Verhältnis zum Sauerstoff untersucht. Ebenso läßt sich die Empfindlichkeit des Isolats gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmen (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Die so genannte **Bunte Reihe** umfaßt einen klassisch-mikrobiologischen Versuchsaufbau, der zur Feststellung der StoffwechsellLeistungen Gram-negativer Bakterien dient (Drews, 1983). Hierfür werden verschiedene Medien mit geeigneten Farb-Indikatoren versetzt und parallel inokuliert. Die Verwertung von Kohlenstoffquellen (z.B. Dextrose) läßt sich anhand eines Farbumschlags nach Säurebildung feststellen. In der Voges-Proskauer-Reaktion wird hingegen die Bildung eines spezifischen Stoffwechselprodukts (hier: Acetoin) nachgewiesen. Darüber hinaus läßt sich im MIO-Röhrchen die Beweglichkeit der Zellen (**motility**), **Indolbildung** und **Ornithinsäuredecarboxylase-Aktivität** ermitteln. In Wachstumsversuchen können ausserdem die Temperatur- und pH-Optima sowie -Toleranzen bestimmt werden (Drews, 1983). Bei sowohl den physiologischen als auch den morphologischen Untersuchungen wird der Phänotyp des Isolats ermittelt. Diese Methoden können jedoch nicht das gesamte genomische Potential des Mikroorganismus widerspiegeln (Rosselló-Mora und Amann, 2001).

**Chemotaxonomie.** Durch die Verbesserung analytischer Methoden (z.B. der Chromatographie) wurde es möglich, bestimmte Zellkomponenten (wie z.B. Lipide und andere Bestandteile der Zellwand, Elektronentransporter wie Cytochrome und Quinone) qualitativ und quantitativ zu analysieren, um sie für die Klassifizierung von Mikroorganismen heranzu-

ziehen. Jedoch erfordert dieser Ansatz häufig Kulturen von Vergleichsorganismen, relativ aufwändige und sensible Verfahren und Erfahrung bei der Auswertung der Ergebnisse.

**Molekularbiologie.** Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden wurden die Möglichkeiten der Klassifizierung von Mikroorganismen grundlegend verbessert.

Die Sequenzbestimmung phylogenetischer Marker-Gene wie z.B. der ribosomalen RNA, Elongationsfaktoren oder der  $\beta$ -Untereinheit der ATPase ist mit relativ geringem Aufwand durchzuführen (Ludwig und Klenk, 2001). Hinzu kommt, daß für einige dieser Gene, die für die vergleichende Sequenzanalyse notwendigen großen Sequenzdatenbanken vorhanden sind (Ludwig *et al.*, 2004). Mittels clusteranalytischer Algorithmen werden die Sequenzinformationen ausgewertet und die Verwandtschaftsbeziehungen z.B. in Form eines Dendrogramms oder phylogenetischen Stammbaums dargestellt. Auf diese Weise lassen sich z.B. Isolate in etablierte taxonomische Einheiten einordnen. Als Limitierung der Methode ist zu nennen, daß die verwendeten Algorithmen auf Evolutionshypothesen aufbauen, welche nicht bewiesen oder widerlegt werden können (Swofford *et al.*, 1996). Zur Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Prokaryonten wird die Sequenz des 16S rRNA-Gens am häufigsten verwendet. Allerdings ist deren Aussagekraft aufgrund der hohen Konserviertheit des Moleküls unterhalb der Gattungsebene – d.h. für nahe verwandte Mikroorganismen – limitiert (Rossello-Mora und Amann, 2001). In DNA-DNA-Reassoziierungsexperimenten lassen sich demhingegen auch die Verwandtschaftsbeziehungen sehr nahe-verwandter Mikroorganismen untersuchen. Für diese Methode wird im Gegensatz zur Sequenzbestimmung einzelner Gene die gesamte genomische DNA verwendet.

Die drei vorgestellten methodischen Ansätze weisen jeweils Limitierungen und Schwachstellen auf. Aus diesem Grund wurde von Colwell (Colwell, 1970) vorgeschlagen, möglichst viele phänotypische und molekulare Daten parallel für die sichere Klassifizierung von Mikroorganismen einzusetzen. Diese Strategie wurde als *polyphasic approach* (Colwell, 1970) bezeichnet.

## 1.2 Taxonomie und Phylogenie der Actinobakterien

Die Actinobakterien stellen in Bezug auf Morphologie und Physiologie eine äußerst vielseitige Gruppe von Prokaryonten dar. Die Klassifizierung dieser Bakterien war über eine lange Zeit hinweg uneinheitlich und widersprüchlich. Erst vor wenigen Jahren wurde von Stackebrandt *et al.* (Stackebrandt *et al.*, 1997) die Definition der taxonomischen Einheit der Klasse *Actinobacteria* etabliert. Zuvor wurde – und wird teilweise noch heute – diese Gruppe synonym als Actinomyceten bezeichnet. Dieser Name beruht auf den griechischen Vokabeln *aktis* ( $\rightarrow$  Strahl) und *mykes* ( $\rightarrow$  Pilz) und bedeutet somit 'Strahlenpilz' (Scheele und Boss, 1999). Dieser Name bezog sich auf die morphologischen Eigenschaften der Kolonien einiger Gattungen innerhalb der Actinobakterien (siehe unten). Es handelt sich jedoch um prokaryontische Organismen, wofür es u.a. folgende Belege gibt: Die Actinobakterien besitzen die ty-

pischen prokaryontische Ribosomen (70S) und damit auch eine 16S ribosomale RNA (Stackebrandt *et al.*, 1997). Sie sind sensitiv gegenüber Antibiotika, welche den Stoffwechsel von Prokaryonten angreifen und unempfindlich gegenüber klassischen antifungalen Antibiotika. Falls Geißeln vorhanden sind, besitzen diese die typische Struktur von prokaryontischen Organellen. Weiterhin wurden Actinobakterien mit einem chemoautotrophen Metabolismus beschrieben; diese Art des Stoffwechsels kommt bei Pilzen nicht vor (Lechevalier und Lechevalier, 1967).

**Morphologie der Actinobakterien.** Die Bezeichnung 'Strahlenpilz' beruhte auf morphologischen Beobachtungen verschiedener Gattungen der Actinobakterien (z.B. *Streptomyces*, *Micromonospora*): Sie bilden verzweigte Hyphen und formen daraus ein charakteristisches Myzelium auf Substratoberflächen. Diese Art des Wachstums läßt die Kolonien auf Agar-Platten denen von Pilzen sehr ähnlich sehen. Viele beschriebene Species von Actinobakterien bilden außerdem Sporen, die durch Differenzierung aus den terminalen Hyphen-Zellen entstehen. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Substrat-Myzelium bilden einige Arten noch ein so genanntes Luft-Myzelium aus, welches die Sporen trägt und so für eine bessere Verbreitung sorgt. Einige Arten formen komplexe Sporen-bildende Strukturen (Sporophoren, Sporangien), welche als morphologisches Merkmal zur Identifizierung verwendet werden (Parenti und Coronelli, 1979). Die Sporen der Actinobakterien sind extrem Austrocknungs- aber nur wenig Hitze-resistent. Erstere Eigenschaft beruht vermutlich auf der hohen Trehalose-Konzentration in den Zellen (McBride und Ensign 1987; Ensign, 1998). Zwei Ziele werden mit der Ausbildung von Sporen verfolgt: Die Überdauerung von widrigen Bedingungen und die effizientere Verbreitung (Krsek *et al.*, 2000). Teilweise bilden diese so genannten Sporen Geißeln aus oder sind durch eine hydrophobe Hülle gekennzeichnet, welche das Anheften und den Transport durch Microarthropoden im Boden ermöglicht. Durch diese Merkmale unterscheiden sie sich somit deutlich von den echten Endosporen der Bazillen oder Clostridien.

Der Zellwandaufbau der bisher untersuchten Actinobakterien entspricht dem eines Gram-positiven Prokaryonten. Allerdings ergibt die klassische Gram-Färbung nicht immer ein eindeutiges Ergebnis (z.B. *Cellulomonas*). Cytoplasmatische Einschlüsse wie Poly- $\beta$ -hydroxybutyrat, Polyphosphat, Polysaccharide oder Lipide wurden in einigen Species beobachtet (Singleton und Sainsbury, 2001)

**Chemotaxonomische Klassifizierung der Actinobakterien.** Cummins und Harris (Cummins und Harris, 1956) stellten fest, daß sich Gram-positiver Bakterien in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Zellwand unterscheiden. Das Peptidoglycan unterscheidet sich bei den Actinobakterien nicht nur in Bezug auf das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren sondern auch in der Identität der Monosaccharide. Eine weitere Besonderheit weisen die Zellwände der Gattungen innerhalb der Unter-Ordnung *Corynebacterinae* auf: An das Peptidoglycan sind charakteristische Lipide gebunden – die Mycolsäuren.



Diese Lipide vermitteln im Falle der langkettigen Varianten der Mycobakterien die so genannte 'Säurefestigkeit' (Schlegel, 1992; Schleifer und Stackebrandt, 1983). Die Mycolsäuren sind eines der wenigen Beispiele innerhalb der Klasse der Actinobakterien, bei denen sich das Muster phänotypischer Eigenschaften mit dem 16S rRNA-Stammbaum im Einklang befinden (Embley und Stackebrandt, 1994).

**Molekulare Phylogenie der Actinobakterien.** Ein wichtiges molekulares Merkmal zur Unterscheidung von Gram-positiven Bakterien stellt der molare Anteil der Basen Guanin und Cytosin in der genomischen DNA und mit Einschränkungen auch in der Sequenz des 16S rRNA-Gens dar. Man unterscheidet die Gruppe mit niedrigem molarem G+C-Gehalt und die Gruppe mit hohem G+C-Gehalt; letztere bilden die Actinobakterien. Der molare G+C-Gehalt kann experimentell durch thermale Denaturierung oder Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Gradienten bestimmt werden (Schleifer und Stackebrandt, 1983) und liegt bei den Actinobakterien in der Regel deutlich über 50 mol% (Stackebrandt *et al.*, 1997). Die höchsten G+C-Werte wurden mit 63-78 mol% in der Gattung *Actinomyces* festgestellt (Brock *et al.*, 1994). Charakteristische Vertreter der Gruppe mit niedrigem molarem G+C-Wert sind z.B. die Endosporen-bildenden Gattungen *Clostridium* und *Bacillus* mit 25-45 mol% G+C (Brock *et al.*, 1994)

Die molekulare Phylogenie der Actinobakterien wurde zunächst mittels Katalogisierung von ribosomalen RNA-Fragmenten ermittelt (Stackebrandt und Woese, 1981). Dazu wurde die extrahierte 16S rRNA mit der Guanosin-spezifischen Ribonuclease T1 verdaut und die Fragmente anschließend durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Es folgte die Sequenzierung aller Fragmente mit einer Länge >5 Basen (Fox und Stackebrandt, 1987). Diese Methode war fundamental für die Etablierung eines phylogenetischen Systems der Actinobakterien. Sie bestätigte die nahe Verwandtschaft aller Gram-positiven Bakterien und die Aufspaltung dieser Gruppe in die phylogenetischen Linien der Vertreter mit niedrigem und hohem molarem G+C-Gehalt (Embley und Stackebrandt, 1994). Durch den Fortschritt auf dem Gebiet der Sequenzieretechnologie ist es nunmehr möglich, die gesamte 16S rRNA-Sequenz für die Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Bakterien heranzuziehen. Stackebrandt und Kollegen (Stackebrandt *et al.*, 1997) postulierten 1997 ein neues hierarchisches Klassifikationssystem für die Actinobakterien, welches erstmals ausschließlich auf den 16S rRNA-Sequenzendaten von Kulturen aus Stammsammlungen beruhte. In dieser Studie wurde bestätigt, daß es sich bei den Actinobakterien um eine phylogenetisch koherente Gruppe von Gram-positiven Bakterien mit hohem molarem G+C-Gehalt handelt. Es wurde die taxonomische Einheit der Klasse der *Actinobacteria* postuliert. Der Name baut auf dem ursprünglichen Namen der Actinomyceten auf, demonstriert jedoch auch die prokaryontische Natur dieser Gruppe. Die Zugehörigkeit einer Species zur Klasse der Actinobakterien wird durch eine 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von > 80% zu den am tiefsten

abzweigenden Vertretern innerhalb der Klasse definiert. Dabei handelt es sich um *Rubrobacter radiotolerans*, *Acidimicrobium ferrooxidans* und *Coriobacterium glomerans*.

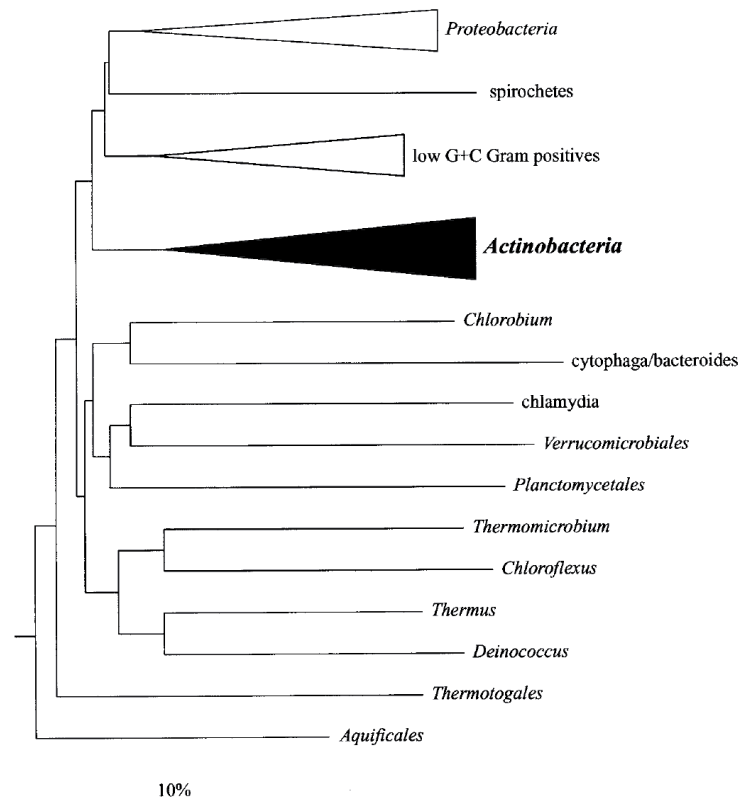
Innerhalb der Klasse der Actinobakterien wurden 6 Ordnungen und 35 Familien postuliert bzw. reklassifiziert.

**Tabelle 1:** Taxonomische Klassifizierung der Actinobacteria beruhend auf 16S rRNA Phylogenie.

Unterklasse	Ordnung	Unterordnung	Familie	Typ-Species		
<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Acidimicrobiales</i>		<i>Acidimicrobiaceae</i>	<i>A. ferrooxidans</i>		
<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Rubrobacterales</i>		<i>Rubrobacteraceae</i>	<i>R. radiotolerans</i>		
<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobacteriales</i>		<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>C. glomerans</i>		
<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Sphaerobacterales</i>		<i>Sphaerobacteraceae</i>	<i>S. thermophilus</i>		
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>A. bovis</i>		
		<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>M. luteus</i>		
			<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>B. linens</i>		
			<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>C. flavigena</i>		
			<i>Dermabacteraceae</i>	<i>D. hominis</i>		
			<i>Dermatophilaceae</i>	<i>D. congolensis</i>		
			<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>I. calvum</i>		
			<i>Jonesiaceae</i>	<i>J. denitrificans</i>		
			<i>Microbacteriaceae</i>	<i>M. lacticum</i>		
			<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>P. citrea</i>		
		<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>C. diphtheriae</i>		
			<i>Dietziaceae</i>	<i>D. maris</i>		
			<i>Gordoniaceae</i>	<i>G. bronchiales</i>		
			<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>M. tuberculosis</i>		
			<i>Nocardiaceae</i>	<i>N. asteroides</i>		
			<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>T. paurometabola</i>		
		<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>M. chalcona</i>		
		<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>P. freudenreichii</i>		
			<i>Nocardioidaceae</i>	<i>N. albus</i>		
		<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>P. thermophila</i>		
		<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>S. albus</i>		
		<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>S. roseum</i>		
			<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>N. dassonvillei</i>		
			<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>T. curvata</i>		
		<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>F. alni</i>		
			<i>Acidothymaceae</i>	<i>A. cellulolyticus</i>		
			<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>G. obscurus</i>		
			<i>Microsphaeraceae</i>	<i>M. multipartita</i>		
			<i>Sporichthyaceae</i>	<i>S. polymorpha</i>		
		<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>G. harbinensis</i>		
			<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>B. bifidum</i>

Quelle: Stackebrandt et al., 1997.

Interessanterweise deuteten die Ergebnisse der Analyse der 16S rRNA-Sequenzdaten nicht auf einen monophyletischen Ursprung der Gruppe der Gram-Positiven mit niedrigem molarem G+C-Gehalt mit den Actinobakterien hin (Abbildung 1). Demgegenüber legten die vergleichenden Sequenzanalysen der Glutamin-Synthetase, Glutamat-Dehydrogenase und des Hitzeschock-Proteins *Hsp70* einen gemeinsamen Ursprung (Monophylie) aller Gram-positiven Bakterien nahe. Der komplexe Zellwandaufbau (Peptidoglycan) der Gram-positiven Bakterien unterstützt ebenfalls diese Hypothese (Embley und Stackebrandt, 1994).



**Abbildung 1:** 16S rRNA phylogenetischer Stammbaum der Bakterien. Der Balken gibt einen geschätzten Sequenzunterschied von 10% an (Quelle: Stackebrandt et al., 1997).

Die physiologische Vielseitigkeit der Actinobacteria in Verbindung mit einem starken kommerziellen oder klinischen Interesse an dieser Gruppe führte teilweise zu einer ausgeprägten Überklassifizierung. So wurden zwischenzeitlich z.B. mehr als 500 Streptomyces- (Bergey's) und 300 Mycobakterien-Species publiziert. Im Falle der Gattung *Mycobacterium* wurde diese Anzahl 1977 auf 35 anerkannte Species reduziert (Krsek et al., 2000).

Der Vergleich der phenotypischen Eigenschaften mit der Phylogenie der Actinobakterien ergab, daß nur wenige dieser Merkmale einen monophyletischen Ursprung besitzen. Das myzelartige Wachstum zum Beispiel tritt in verschiedenen nicht-monophyletischen Gruppen innerhalb der Actinobakterien und sogar bei den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem molarem G+C-Gehalt auf (Embley und Stackebrandt, 1994). Aufgrund der Ergebnisse der



16S rRNA-Katalogisierung und Sequenzierung mußte beispielsweise die Gattung *Thermoactinomyces* re-klassifiziert und in die Gruppe der Niedrig-GC-Gram-Positiven eingeordnet werden (Embley und Stackebrandt, 1994; Stackebrandt *et al.*, 1997).

### 1.3 Physiologie der Actinobakterien

Die Actinobakterien sind auch in Hinblick auf ihre physiologischen Eigenschaften eine sehr vielseitige Gruppe von Bakterien (Ensign, 1998). In den meisten Lehrbüchern werden sie als aerobe Saprophyten geführt, die eine Vielzahl von natürlichen Polymeren abbauen können. Zu diesen organischen Substraten zählen z.B. Agar, Zellulose, Lignin, Chitin, Keratin, Paraffine und Gummi (Singleton und Sainsbury, 2001). Es wurden jedoch auch strikte Anaerobier (z.B. *Oerskovia*), sowie fakultativ anaerobe und microaerophile Species (z.B. *Actinomyces humiferus*) beschrieben (Lechevalier und Lechevalier, 1967). Weiterhin sind parasitische oder mutualistische Beziehungen zu höheren Organismen (Pflanzen und Tiere) bekannt (Goodfellow und Williams, 1983) (siehe Kapitel 1.6). Die ersten Schritte des Abbaus der organischen Polymere erfolgen meist extrazellulär, d.h. die entsprechenden Enzyme werden von den Actinobakterien in das umgebende Milieu abgegeben (Brock *et al.*, 1994). Es konnte z.B. gezeigt werden, daß einige Vertreter mittels extrazellulärer Peroxidase-Aktivität die komplexen Strukturen von Huminstoffen aufbrechen können (Mercer *et al.*, 1996; Ramachandra *et al.*, 1988). Vertreter der Gattung *Nocardia* können Huminstoffe vermutlich auch als Kohlenstoffquelle verwerten und diese zumindest teilweise oxidieren (Küster, 1979; Steinbrenner und Mundstock, 1975). Es wurde daher vermutet, daß auch limnische Actinobakterien am Abbau von Huminstoffen beteiligt sind (Burkert *et al.*, 2003).

### 1.4 Biotechnologische Bedeutung der Actinobakterien

**Antibiotika.** Die Actinobakterien sind auch aus kommerzieller Sicht eine sehr wichtige Gruppe von Mikroorganismen. Bereits 1944 wurde von Schatz und Waksman das Antibiotikum Streptomycin aus einer Kultur von *Streptomyces griseus* isoliert (Schatz *et al.*, 1944). Das umfangreiche Forschungsinteresse für die Actinobakterien war im wesentlichen durch ihre Produktion von Antibiotika und anderen industriell verwertbaren Stoffen (z.B. Aminosäuren) begründet.

Die von den Actinobakterien produzierten Antibiotika sind chemisch und funktionell sehr divers (Krsek *et al.*, 2000); sie inhibieren das Wachstum anderer Mikroorganismen oder zerstören diese. Einige Stoffe werden auch zur Bekämpfung von eukaryontischen Tumorzellen eingesetzt (siehe Tabelle) (Krsek *et al.*, 2000). Insgesamt wurden >23.000 bioaktive Verbindungen (u.a. Antibiotika) beschrieben; wobei mehr als die Hälfte dieser Stoffe aus Actinobakterien isoliert wurde (Lazzarini *et al.*, 2000). Etwa 160 actinobakterielle Antibiotika befinden sich in klinischer und veterinärmedizinischer Anwendung (Krsek *et al.*, 2000). Als

Beispiel sei hier das Actinomycin D angeführt: Dieses Antibiotikum wird von einem *Streptomyces*-Stamm produziert und wirkt antibiotisch auf prokaryontische und eukaryontische Zellen. Dieses Antibiotikum bindet interkalierend an DNA und inhibiert dadurch die RNA-Synthese. Resistenz wird durch eine verringerte Permeabilität der Zellen für dieses Antibiotikum vermittelt (Singleton und Sainsbury, 2001).

Antibiotika werden von den Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert und in geringen Konzentrationen in die Umwelt abgegeben. Die Produktion dieser Stoffe ist nicht essentiell für die ausscheidende Zelle, aber vermag eventuell einen selektiven Vorteil im natürlichen Habitat (z.B. Boden) zu vermitteln (Krsek *et al.*, 2000), nachgewiesen konnte dieser Vorteil bisher jedoch nicht (Ensign, 1998). Häufig wird die Antibiotika-Synthese eingeschaltet, wenn es zu Veränderungen im primären Metabolismus der Zelle kommt. Dies kann verringertes Wachstum, z.B. aufgrund von Nährstoffmangel oder die eingeleitete Sporenbildung sein (Brock *et al.*, 1994; Lechevalier und Lechevalier, 1967).

**Tabelle 2:** Antibiotika-Produktion verschiedener Streptomycceten.

Organismus	Antibiotikum	Aktivität
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	antibiotisch
<i>Streptomyces</i> spp.	Actinomycin D	antibiotisch
<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomycin	antibiotisch
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	antibiotisch, antiviral
<i>Streptomyces albobinaceus</i>	Rifamycin B	antiviral
<i>Streptomyces noursei</i>	Nystatin	antifungal
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Herbimycin	Herbizid
<i>Actinomadura carminata</i>	Carminomycin	Antitumorale Wirkung

Quelle: Krsek *et al.*, 2000.

**Enzyme.** Aus Vertretern der Actinobakterien wurde auch eine große Anzahl von Enzymen für biotechnologische Anwendungen gewonnen (Krsek *et al.*, 2000). Viele Enzyme für Waschpulver (z.B. Proteasen, Cellulasen) stammen aus Actinobakterien-Kulturen. *Corynebacterium glutamicum* wird in der Nahrungsmittelindustrie zur Herstellung von L-Glutaminsäure und anderen Aminosäuren benutzt. Dieser Prozeß beruht auf einer unvollständigen Oxidation der Glucose über den Fructosebisphosphat-Weg und ist Biotin-abhängig (Schlegel, 1992). Weitere Beispiele für industrielle Anwendungen von actinobakteriellen Enzymen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 3:** Produktion verschiedener biotechnologisch wichtiger Enzyme durch *Actinobacteria*.

Organismus	Enzym	Anwendung
<i>Corynebacterium</i> spp.	L-Phenylalanin-Dehydrogenase	Produktion von Süßungsmitteln
<i>Nocardia</i> spp.	Cholesterin-Oxidase	Blut-Test zur Bestimmung des Cholesterin-Wertes
<i>Streptomyces</i> spp.	Proteasen	Waschmittel
<i>Thermomonospora</i> spp.	thermostabile Cellulase	Waschmittel und Textilherstellung
<i>Streptomyces</i> spp.	Chitinasen	Abbau von Pilz-Zellwänden
<i>Streptomyces</i> spp.	Restriktionsendonukleasen	Molekularbiologie

Quelle: Krsek *et al.*, 2000 und Goodfellow und Williams, 1983.

**Biodegradation.** Einige Species der Actinobakterien vermögen auch schwer-abbaubare Xenobiotika zu oxidieren. *Rhodococcus* spp. verwerten z.B. substituierte Benzene, Phenole und Alkane. Actinobakterien wurden auch erfolgreich für die biologische Reinigung von kontaminierten Böden eingesetzt (Krsek *et al.*, 2000).

## 1.5 Ökologie der Actinobakterien außerhalb von aquatischen Habitaten

Aus ökologischer Sicht stellen die Actinobakterien eine erfolgreiche Gruppe von Mikroorganismen dar, denn sie kommen in einer Vielzahl von natürlichen und anthropogenen Habitaten vor. Durch ihre physiologische Vielseitigkeit, die Umsetzung und den Abbau von natürlichen Polymeren wird ihnen eine hohe Bedeutung an den Stoffkreisläufen am natürlichen Standort zugesprochen (Goodfellow und Williams, 1983). Das Wissen über die Ökologie der Actinobakterien ist jedoch im Wesentlichen ein Spiegelbild ihrer wirtschaftlichen und medizinischen Bedeutung. Hinzu kommt, daß die meisten Erkenntnisse über die Isolierung von Actinobakterien und die Untersuchungen an Reinkulturen erhalten worden sind. So ist wenig bekannt über tatsächliche Abundanzen, Populationsstrukturen und -dynamiken, Wachstum und Abbauleistungen, sowie Überlebens- und Verbreitungsstrategien dieser Bakterien im natürlichen Habitat (Goodfellow und Williams, 1983).

Bei den meisten Actinobakterien handelt es sich um mesophile Mikroorganismen, jedoch wurden auch thermophile Species beschrieben (z.B. *Thermomonospora*) (Cross und Goodfellow, 1973). Desweiteren konnten die meisten Isolate durch Verwendung von Medien mit einem pH-Wert um 7 erhalten werden, aber auch acidophile Species (pH 4,5 – 5,0) sind bekannt (Goodfellow und Williams, 1983). Ein extrem halophiler Vertreter wurde mit *Actinopolyspora halophila* aus einer kontaminierten Laborkultur isoliert (Gochnauer *et al.*, 1975). Actinobakterien zeigen im Labor meist nur langsames Wachstum: Agarplatten müssen meist mindestens für 1 bis 2 Wochen, in manchen Fällen auch 4 bis 6 Wochen inkubiert werden, bevor sich sichtbare Kolonien entwickeln (Goodfellow und Williams, 1983).

**Boden.** Die Actinobakterien werden in erster Linie als Organismen des Bodens angesehen und repräsentieren dort eine signifikante Komponente der mikrobiellen Gemeinschaft (Goodfellow und Williams, 1983). Auch die meisten Antibiotika-produzierenden Streptomyce-

ten wurden aus diesem Habitat isoliert. Aus den meisten Bodentypen können mehr als eine Million prokaryontischer Zellen durch Kultivierung nachgewiesen werden (Ensign, 1998; Goodfellow und Williams, 1983). Dabei ist jedoch zu beachten, daß diese Zahlen auf den klassischen mikrobiologischen Methoden beruhen: Eine Bodenprobe wird seriell verdünnt und auf Nähragar ausplattiert. Dies hat zur Folge, daß nicht zwischen vegetativen Hyphen und Sporen unterschieden werden kann (Goodfellow und Williams, 1983). Ein Rückschluß auf die potentielle Aktivität ist somit nicht möglich. Außerdem ist bekannt, daß sich nur ein kleiner Anteil der am natürlichen Standort vertretenen Mikroorganismen im Labor kultivieren läßt. Dies führt bei der Plattierungsmethode zu einer Unterschätzung sowohl der Abundanzen als auch der Diversität (Amann *et al.*, 1995).

Das Nährstoffangebot und die Verfügbarkeit von Wasser unterliegt im Boden starken Schwankungen. Der Wechsel zwischen Hyphen- und Sporen-Stadium vieler Actinobakterien stellt damit eine optimale Anpassung an diese Bedingungen dar. Die Hyphen repräsentieren vegetatives Wachstum und damit die aktive Phase des Organismus, wohingegen Sporen bei widrigen Bedingungen (Mangel an Nährstoffen oder Wasser) ausgebildet werden, um diese Perioden zu überdauern (Krsek *et al.*, 2000). Es wurde vermutet, daß das Wachstum in Hyphen weitere Vorteile bietet: Sie können die räumlichen Abstände zwischen einzelnen Boden-Partikeln überbrücken und dienen somit der Ausbreitung und Besiedlung neuer Microhabitats. Desweiteren vermögen sie einen Schutz gegenüber Predatoren zu vermitteln (Ensign, 1998). Die Sporen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der Species und Besiedlung neuer Habitats in größeren räumlichen Maßstäben. Der Transport kann durch Windbewegungen über dem Boden und durch Wasser oder die Anheftung an Arthropoden im Boden erfolgen (Goodfellow und Williams, 1983; Krsek *et al.*, 2000). Die Sporen werden als metabolisch inaktives Stadium angesehen und enthalten nur etwa ein Drittel der Ribosomen einer Hyphen-Zelle (Krsek *et al.*, 2000).

**Mutualistische Beziehungen von Actinobakterien mit höheren Pflanzen.** Species der Gattung *Frankia* besiedeln endophytisch das Wurzelgewebe verschiedener Busch- und Baumarten (z.B. Sanddorn und Erle) und vermögen dort Stickstoff zu fixieren. Die Infektion erfolgt über die Wurzelhärchen und die infizierten Pflanzen bilden Wurzelknöllchen aus, die denen der Leguminosen ähneln (Goodfellow und Williams, 1983). Die Stickstofffixierung selbst findet in speziellen Strukturen an den Spitzen der *Frankia*-Hyphen statt (Singleton und Sainsbury, 2001). An Isolaten der Gattung *Frankia* konnte eine charakteristische Actinobakterien-Zellwand zytochemisch nachgewiesen werden. Die Isolate zeigen Nitrogenase-Aktivität und bilden in Flüssigkultur Sporen aus. Daher wird eine Überdauerung außerhalb des Wirts vermutet; Wachstum konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Goodfellow und Williams, 1983). Die Wirtspflanzen sind typische Besiedler nährstoffarmer Böden, wie z.B. Wälder, Moore oder Sanddünen. Die Stickstofffixierung der Endophyten führt auf lange Sicht zu einer Qualitätsverbesserung der Böden und hat somit eine ökonomische Bedeutung (z.B.

in der Forstwirtschaft, Ensign, 1998). Eine N<sub>2</sub>-Fixierung freilebender Actinobakterien konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

**Phytopathogene Actinobakterien.** Die meisten phytopathogenen Prokaryonten gehören zu den Gram-negativen Bakterien. Jedoch werden auch einige wichtige Pflanzenkrankheiten von Actinobakterien verursacht. Ihr antagonistischer Effekt beruht vermutlich auf der Produktion von Hormonen, Polysacchariden oder Toxinen (Vidaver und Starr, 1981).

**Human-pathogene Actinobakterien.** Bereits im 19. Jahrhundert wurde der Erreger der Lepra von dem norwegischen Arzt Armauer Hansen entdeckt und zunächst als 'Lepra-Bazillus' bezeichnet (Krsek *et al.*, 2000). Später erfolgte dann die offizielle Klassifizierung als *Mycobacterium leprae* (Skerman *et al.*, 1980). Andere Vertreter der Mycobakterien hingegen stellen eine natürliche Komponente der menschlichen Haut-Flora dar (Ensign, 1998). Meist beruht der antagonistische Effekt auf der Produktion von Toxinen (z.B. *Mycobacterium diphtheriae*), demgegenüber lösen die Sporen von einigen thermophilen Actinobakterien Atemwegserkrankungen und Allergien aus (Goodfellow und Williams, 1983).

**Anthropogen-beeinflußte Habitate:** Actinobakterien wurden wiederholt in anthropogen-beeinflußten Habitaten nachgewiesen. Zum Beispiel konnte eine erhöhte Zink-Toleranz bei Isolaten von Aktinobakterien aus kontaminierten Böden einer Verhüttungsanlage festgestellt werden (Jordan und Lechevalier, 1975). In einer anderen Studie wurde eine erhöhte Cadmium-Toleranz im Vergleich zu anderen Bakterien beschrieben (Babich und Stotzky, 1977). Aus Petroleum-kontaminierten Böden wurde wiederholt *Nocardia asteroides* isoliert (Kvasnikov *et al.*, 1978).

## 1.6 Ökologie der Actinobakterien in aquatischen Habitaten

**Marine Habitate.** Die Ozeane stellen das größte Wasser-Reservoir der Biosphäre dar (Whitman *et al.*, 1998) und spielen eine entscheidende Rolle in den globalen biogeochemischen Kreisläufen (Fenchel, 1998). Während die offenen Ozeane durch nährstoffarme (oligotrophe) Bedingungen charakterisiert sind, sind die küstennahen Bereiche in diesem Bezug sehr variabel: Der Eintrag von organischem Material kann über Flüsse und anthropogene Einwirkungen erfolgen. Bis in die 80er Jahre hinein wurde die mikrobielle Diversität in marinen Habitaten vorwiegend anhand der Identifizierung und Klassifizierung von Isolaten analysiert. Mittels dieser kultivierungsabhängigen Methoden wurden nur vereinzelt Actinobakterien in marinen Habitaten nachgewiesen: Streptomyceten überwogen in den flacheren und *Actinoplanes* spp. in den tieferen Meeresschichten (Krsek *et al.*, 2000). Einige Autoren sahen diese Isolate als natürliche Komponente der marinen Microflora an (Okami und Okazaki, 1978; Weyland, 1981), wohingegen andere sie als eingespülte Populationen aus Süßwasser- oder terrestrischen Habitaten werteten (Goodfellow und Haynes, 1983). Letztere Ansicht wurde gestützt durch die Beobachtung, daß die Zahl der Actinobakterien mit der

Entfernung von der Küste abnahm (Attwell und Colwell, 1981; Attwell *et al.*, 1981; Okami und Okazaki, 1972). In der Regel lagen die beobachteten Abundanzen deutlich unter denen im Boden oder Süßwasser (Goodfellow und Williams, 1983).

Aufgrund der geringen Kultivierungseffizienz der am natürlichen Standort abundanten Species (Whitman *et al.*, 1998) ergab sich nach Einführung der molekularen und kultivierungsunabhängigen Methoden ein neues Bild. So wurde in den 90er Jahren eine monophyletische Sequenzgruppe von bisher unkultivierten Actinobakterien aus dem marinen Plankton beschrieben (Fuhrman *et al.*, 1993; Rappe *et al.*, 1997). Stach *et al.* untersuchten die Diversität von Actinobakterien in marinen Sedimenten norwegischer Fjorde (Wassertiefe: 187 bis 316 m). Die Analyse der 16S rRNA Gensequenzen erbrachte eine unerwartet hohe Diversität der Actinobakterien an diesem Standort (Stach *et al.*, 2003). In einer weiteren Studie (Stach *et al.*, 2003) wurden verschiedene Schichten eines Tiefsee-Sedimentkerns untersucht (Wassertiefe: 3814 m). Wiederum war die Sequenzähnlichkeit zu bereits kultivierten und charakterisierten Species niedrig. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Sedimentschichten festgestellt werden; insgesamt nahm die Diversität und Artenvielfalt mit zunehmender Sedimenttiefe ab (Stach *et al.*, 2003).

**Estuare.** Am Übergang vom fließenden Süßwasser-Habitat zum offenen Meer stellen die Estuare eine besondere Form der aquatischen Habitate dar. Sie sind in erster Linie durch den Salinitätsgradienten (>5 bis <25 ppm), aber auch andere variable Umweltparameter wie pH und Nährstoffkonzentration gekennzeichnet (Perkins, 1974). Die Estuare sind meist produktiver als die jeweiligen angrenzenden Süßwasser- oder marinen Bereiche, da es zu einer Konzentrierung und Ablagerung von organischem Material an der Flußmündung kommen kann (Atlas und Bartha, 1998; Crump *et al.*, 1999). Diese Zonen werden auch als estuarine Trübungsmaxima (estuarine turbidity maxima, ETM) bezeichnet (Crump *et al.*, 1999).

Mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen Methoden wurden die Estuare folgender Flüsse untersucht: Columbia River, San Joaquin River/San Francisco Bay, Parker River und Weser (Crump *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2004; Hollibaugh *et al.*, 2000; Selje und Simon, 2003; Stepanauskas *et al.*, 2003).

Im Columbia River-Estuars (Pazifikküste der USA) wurden die planktonische und partikelassoziierten mikrobiellen Gemeinschaften untersucht, wobei die höchste Diversität innerhalb der partikelassoziierten Bakterien gefunden wurde. Dies wurde mit der höheren Verweildauer der Partikel im Estuar erklärt: Es ermöglichte die Entwicklung von Estuar-spezifischen bakteriellen Populationen (Crump *et al.*, 1999). Im San Joaquin River-Delta (Pazifikküste der USA) konnten saisonale aber keine signifikanten räumlichen Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden. Für die Actinobakterien wurde ein Abundanz-Maximum im Sommer und Herbst ermittelt (Stepanauskas *et al.*, 2003). Die Analyse des Parker River-Estuars (Atlantikküste der USA) bestätigte die Columbia River-Studie: In einem Bereich mittlerer Salinität konnte sich aufgrund einer längeren Verweildauer des Wassers im Sommer und

Herbst eine Estuar-spezifische mikrobielle Gemeinschaft entwickeln (Crump *et al.*, 2004). Das Weser-Estuar wurde zwischen Bremen und der Nordsee in monatlichen Intervallen beprobt. Es konnten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Abschnitten Süßwasser, Brackwasser und Salzwasser festgestellt werden. Im Gegensatz zu den oben angeführten Untersuchungen im Joaquin River-Delta (Stepanauskas *et al.*, 2003) waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Beprobungszeitpunkten sowie den freilebenden und Partikel-assoziierten Populationen weit weniger ausgeprägt (Selje und Simon, 2003).

**Limnische Habitate.** Limnische Habitate sind ein äußerst vielfältiger Lebensraum-typus. Sie können anhand ihres Charakter in stehende (Seen) und fließende (Flüsse) Gewässer klassifiziert werden, aber auch anhand ihrer Größe, ihrer permanenten oder temporären Existenz, den topographischen Gegebenheiten (z.B. Höhenlage, durchschnittliche, maximale Tiefe) oder anhand von weiteren Eigenschaften wie Produktivität und Wasserchemismus.

Die bisher mit molekularen Methoden hinsichtlich mikrobieller Diversität analysierten limnischen Habitate unterscheiden sich in einer Vielzahl dieser Parameter: So wurden Seen und Flüsse in vielen Regionen Zentral-Europas (Bosshard *et al.*, 2000; Glöckner *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2003; Pernthaler *et al.*, 1998; Sekar *et al.*, 2003; Selje und Simon, 2003; Simek *et al.*, 1995; Zwart *et al.*, 2002; Zwart *et al.*, 1998; Zwart *et al.*, 2003; Zwisler *et al.*, 2003) (Burkert *et al.*, 2003) und Skandinaviens (Lindström, 1998; Lindström, 2000; Lindström, 2001; Lindström und Leskinen, 2002; Tuomi *et al.*, 1997), Nord-Amerikas (Crump *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2004; Hiorns *et al.*, 1997; Hollibaugh *et al.*, 2000; Methé *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 2001; Yannarell *et al.*, 2003; Yannarell und Triplett, 2004; Zwart *et al.*, 2002), Asiens (Glöckner *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2003; Trusova und Gladyshev, 2002; Zwart *et al.*, 2002) aber auch der Arktis (Bahr *et al.*, 1996; Crump *et al.*, 2003) und Antarktis (Pearce, 2003; Pearce *et al.*, 2003) beprobt. Weiterhin unterschieden sich die Seen in ihren morphometrischen Eigenschaften wie Größe und maximaler Tiefe. Der Baikalsee stellt den nach Wasservolumen größten (23.000 km<sup>3</sup>) und auch tiefsten (1637 m) See dar (Glöckner *et al.*, 2000). Es wurden jedoch auch viele kleine Seen von wenigen Hektar Fläche und geringer Tiefe analysiert (z.B. Adirondack Seen, Methé *et al.*, 1998). Unterschiede lassen sich auch in der Höhenlage feststellen: Der niederländische See Loosdrecht (Zwart *et al.*, 1998) oder die brandenburgische Große Fuchskuhle (Burkert *et al.*, 2003) befinden sich nur wenige Meter über dem Meeresspiegel, wohingegen auch Gebirgsseen mit einer Höhenlage von über 2000 m, wie zum Beispiel der Gossenköllesee (Glöckner *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 1998) umfangreich untersucht wurden. In Bezug auf die Konzentration an organischen und anorganischen Nährstoffen im Wasser lassen sich die untersuchten Systeme einteilen in: ultraoligotroph (z.B. Crater Lake), oligotroph (z.B. Gossenköllesee, Toolik Lake), mesotroph (z.B. Bodensee, Große Fuchskuhle), eutroph (z.B. Loosdrecht, IJssel) und hypereutroph (z.B. Taihu). Der pH-Wert der untersuchten Habitate erstreck-



kte sich ebenfalls über einen weiten Bereich: Von sauren Moorseen (pH von ca. 5, z.B. Fuchskuhle, einige der Adirondack Seen) bis hin zu leicht alkalischen Bedingungen (pH 7.5 bis 8.5, z.B. Loosdrecht, Toolik Lake). Weiterhin wurden für vergleichende Studien Proben von huminstoffreichen und -armen Seen untersucht: Adirondack Seen (Hiorns *et al.*, 1997; Methe *et al.*, 1998), skandinavische Seen (Lindström, 2000; Lindström, 2001; Lindström und Leskinen, 2002) und Seen im US Bundesstaat Wisconsin (Yannarell *et al.*, 2003; Yannarell und Triplett, 2004).

Mittels Kultivierung wurden wiederholt Actinobacteria der Gattungen *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora* im Plankton von Seen nachgewiesen (Rheinheimer, 1991). Goodfellow und Williams betrachteten die Gattung *Micromonospora* als autochthonen Vertreter des Süßwasser-Habitats (Goodfellow und Williams, 1983).

In der vorliegenden Arbeit sollte in besonderem Maße auf die Diversität und Verbreitung von abundanten Actinobakterien im Süßwasser eingegangen werden. Durch die weiter oben beschriebenen Limitierungen der auf Kultivierung basierenden Studien, ergaben sich eine Fülle neuer Erkenntnisse durch die Einführung molekularbiologischer Methoden bei der Untersuchung des Süßwasser-Planktons. So konnten limnische Actinobakterien (LAB) in einer Vielzahl von Habitaten nachgewiesen werden (Glöckner *et al.*, 2000; Zwart *et al.*, 2002; Zwart *et al.*, 1998; Zwart *et al.*, 2003). Im Baikalsee (Glöckner *et al.*, 2000) und dem Crater Lake (Urbach *et al.*, 2001) wurden Actinobakterien sowohl im Oberflächenwasser, aber auch in sehr großer Tiefe (bis zu 1400 m) festgestellt. Yannarell und Triplett (Yannarell und Triplett, 2004) untersuchten die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft in verschiedenen horizontalen Auflösungen innerhalb eines Sees und fanden eine signifikante Variation in Abhängigkeit von z.B. Wasserströmungen und topographischen Gegebenheiten (z.B. Buchten). In saisonalen Studien wurden starke Schwankungen der Abundanzen von LAB festgestellt. Im alpinen Gossenköllesee überstieg im Frühjahr das Biovolumen der Actinobakterien – trotz ihrer geringen Zellgröße – das der Betaproteobakterien (Glöckner *et al.*, 2000). Dem gegenüber erreichten die Actinobakterien im huminstoffreichen Südwest-Becken der Großen Fuchskuhle im Herbst ihre maximalen Abundanzen (>50%) und im Frühjahr ein Minimum (<10%) (Burkert *et al.*, 2003). Im ebenfalls huminstoffreichen See Crystal bog (Wisconsin, USA) wurde eine hohe Diversität an LAB im Verlaufe aller Jahreszeiten festgestellt (Newton *et al.*, 2004), wobei die eingesetzten Methoden keine Aussagen über die *in situ*-Abundanzen der einzelnen Sequenztypen zuließen.

In Laborexperimenten wurde die Sensitivität von Vertretern verschiedener LAB-Sequenztypen auf Fraßdruck durch Nanoflagellaten untersucht (Hahn *et al.*, 2003; Pernthaler *et al.*, 2001). Die Größenselektivität des Fraßverhaltens führte in einem Chemostat-Experiment zur Anreicherung der LAB bis auf 80% der Gesamtzellzahl (Pernthaler *et al.*, 2001). Der Fraßdruck stellt neben der Verfügbarkeit von Substraten eine wesentliche Komponente zur Beein-

flußung der Populationsstruktur mikrobieller Gemeinschaften dar (Jürgens *et al.*, 1994; Pernthaler *et al.*, 2001; Simek *et al.*, 1997).

**Ursprung mikrobieller Populationen.** Ein wichtiger Aspekt der mikrobiellen Ökologie beschäftigt sich mit der Frage, ob die vorhandene mikrobiellen Populationen in einem bestimmten Habitat *autochthonen* oder *allochthonen* Ursprungs ist. Autochthone Populationen sind an ein Habitat angepaßt und reproduzieren sich darin, d.h. sie sind an den Stoffumsetzungen im Habitat beteiligt. Dahingegen werden allochthone Populationen durch aktive oder passive Bewegung in ein Habitat eingeschleppt, in dem sie sich aufgrund der äußeren Bedingungen nicht reproduzieren können. Im Falle von Mikroorganismen vermögen allochthone Populationen jedoch lange Zeiträume zu überdauern – besonders durch Dauerstadien wie Sporen. Einige Actinobakterien, wie z.B. die Gattung *Actinoplanes* bilden begeißelte, Sporen-ähnliche Stadien aus, was als Indiz für die Anpassung an den aquatischen Lebensraum gewertet werden könnte (Parenti und Coronelli, 1979). Aus ökologischer Sicht ist es wichtig, diese beiden Lebensformtypen unterscheiden zu können.

In Süßwasser-Habitaten wird im allgemeinen von einem hohen Anteil von Mikroorganismen mit allochthonem Ursprung ausgegangen. Diese Populationen können z.B. aus dem terrestrischen Umfeld durch Luftbewegungen, Erosion oder Einspülung durch Regen- oder Grundwasser in diese Habitate transportiert werden (Atlas und Bartha, 1998). Aufgrund der Abundanz von Actinobakterien im Boden gehen deshalb auch viele Autoren von einem terrestrischen Ursprung dieser Gruppe von Prokaryonten im Süßwasser aus (Goodfellow und Williams, 1983). In der Tat läßt sich diese Frage weder mittels Kultivierung noch der Analyse von 16S rRNA-Genbanken aufklären, denn beide Ansätze weisen sowohl aktiv-wachsende Populationen als auch die inaktiven Dauerstadien nach. Zur Lösung dieser Frage lassen sich eventuell Methoden der Aktivitätsmessung auf Einzelzell-Ebene anwenden (Cottrell und Kirchman, 2000; Daims *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Malmstrom *et al.*, 2004; Ouverney und Fuhrman, 1999; Pernthaler *et al.*, 2002; Riemann und Azam, 2002).

**Vergleich von marinen und limnischen Habitaten.** Einige Studien widmeten sich dem Vergleich der aquatischen Habitate (Glöckner *et al.*, 2000; Rappe *et al.*, 2000). Mit kultivierungsunabhängigen Methoden wurden einige phylogenetisch definierte Gruppen sowohl an marinen als auch limnischen Standorten nachgewiesen (z.B. Vertreter der *Bacterioidetes*). Die Betaproteobakterien wurden demhingegen fast ausschließlich in den Süßwasser-Habitaten angetroffen (Glöckner *et al.*, 2000).

**Soda-Seen/ Hypersaline Habitate.** Soda-Seen sind in Bezug auf Salinität und pH-Wert extreme Standorte. Wenig ist über das Vorkommen und die Bedeutung von Actinobakterien in diesen besonderen Habitaten bekannt. Der in Nord-Amerika lokalisierte Mono Lake ist durch einen extrem hohen Salzgehalt (84 bis 94 g l<sup>-1</sup>), alkalische Bedingungen (pH 9.8) und Meromixis gekennzeichnet. Durch kultivierungsunabhängige Methoden wurden Actinobakterien im oxischen, nicht aber im anoxischen Teil der Wassersäule nachgewiesen (Humayoun

*et al.*, 2003). Die Abundanz oder Aktivität der Actinobakterien in diesem Habitat wurde bisher allerdings nicht ermittelt.

## 1.7 Methoden zur Untersuchung von unkultivierten Mikroorganismen

Als eine allgemeine Erkenntnis der mikrobiellen Ökologie gilt, daß sich nur ein geringer Anteil der Mikroorganismen mit den heute angewendeten Methoden in Reinkultur bringen läßt (Amann *et al.*, 1995). Dies machte die Anwendung molekularer Techniken zur Diversitäts- und Strukturanalyse mikrobieller Gemeinschaften am natürlichen Standort notwendig.

**Tabelle 4:** Geschätzte Kultivierbarkeit der Mikroorganismen verschiedener Habitate.

Habitat	Geschätzte Kultivierbarkeit	Referenz
Marine Systeme	0,001 bis 0,1%	Ferguson <i>et al.</i> , 1984
Limnische Systeme	0,25%	Jones, 1977
Estuar	0,1 bis 3%	Ferguson <i>et al.</i> , 1984
Sediment	0,25%	Jones, 1977
Boden	0,3%	Torsvik <i>et al.</i> , 1990
Klärschlamm	1 bis 15%	Wagner <i>et al.</i> , 1993

**Phylogenetische Marker.** Bereits vor fast 40 Jahren wurde die Idee formuliert, Makromoleküle als 'Molekulare Uhren' der Organismen anzusehen (Zuckerlandl und Pauling, 1965). Es wurde vermutet, daß die Primärstruktur geeigneter Makromoleküle Aufschluß geben könne über die evolutive Geschichte des jeweiligen Organismus. Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglichten den Erfolg dieses Ansatzes. Zunächst wurden die Sequenzen von Cytochromen und Ferredoxinen vergleichend analysiert (Fitch und Margulias, 1967). In den folgenden Jahren konnten Woese und Kollegen die besondere Eignung der ribosomalen RNA als phylogenetischer Marker demonstrieren (Fox *et al.*, 1977; Woese und Fox, 1977). Diese Studien ermöglichten den Aufbau eines natürlichen taxonomischen Systems der Prokaryonten, welches unabhängig vom Phänotyp der Organismen war (Ludwig und Klenk, 2001). Woese war es auch, der aufgrund der vergleichenden Sequenzanalyse der rRNA die Unterscheidung der Prokaryonten in die Domänen *Bacteria* und *Archaea* vorschlug (Woese, 1987).

Ein phylogenetisches Markergen muß eine Anzahl von Voraussetzungen erfüllen: Es muß in allen zu untersuchenden Organismen vorhanden sein und eine funktionelle Konstanz aufweisen. Weiterhin muß eine Komplexität vorliegen, die einen ausreichenden Informationsgehalt vermittelt. Als weitere Voraussetzung ist das Vorhandensein von Vergleichssequenzen für die phylogenetische Analyse unabdingbar (Ludwig und Klenk, 2001). Als Beispiele für phylogenetische Markergene können außer den ribosomalen RNAs auch die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G, die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase oder das Hitzeschockprotein *Hsp70* angeführt werden.

Die Ribosomen der Prokaryonten enthalten drei RNAs unterschiedlicher Größe: 5S, 16S und 23S. Die Sequenz der 5S rRNA wird aufgrund ihres beschränkten Informationsgehalts gegenwärtig kaum noch vergleichend untersucht. Die 16S rRNA ist demgegenüber das am häufigsten verwendete phylogenetische Markergen für die Klassifizierung und Identifizierung von Isolaten und nicht-kultivierten Prokaryonten in der Umwelt. Dieses Molekül erfüllt alle Voraussetzungen einer molekularen Uhr und die etwa 1500 Nukleotide umfassende Sequenz lassen sich technisch relativ einfach bestimmen. Darüberhinaus ist die Primärstruktur der ribosomalen RNAs durch konservierte und variable Bereiche gekennzeichnet, was dadurch eine Unterscheidung von Organismen auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen erlaubt. Diese Inseln aus konservierten Bereichen zusammen mit der Aufklärung der Sekundärstruktur der rRNAs ermöglichen ein hohes Maß an Genauigkeit beim Anordnen homologer Nukleotide verschiedener Sequenzen untereinander. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil im Vergleich zu anderen Molekülen dar. Die 23S ribosomale RNA eignet sich ebenfalls als phylogenetischer Marker: Ihr Informationsgehalt ist mit fast 3000 Nukleotiden höher und erlaubt somit eine bessere phylogenetische Auflösung. Allerdings umfaßt die Datenbank an 23S rRNA-Sequenzen nur ca. 1000 Einträge im Gegensatz zu etwa 80.000 Voll- und Teilsequenzen der 16S ribosomalen RNA. Beide Moleküle (16S und 23S) qualifizieren sich durch ihre Detektierbarkeit mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung für ihre Anwendung in der mikrobiellen Ökologie.

Aufgrund der langsamen und diskontinuierlichen Sequenzveränderung im Zuge der Evolution der ribosomalen RNAs ergeben sich jedoch auch Limitierungen aus der Anwendung dieser Moleküle. Nah-verwandte Arten mit identischen 16S rRNA-Sequenzen können sich deutlich aufgrund verschiedener phänotypischer Eigenschaften und Genomstruktur unterscheiden (Beja, 2002; Blattner *et al.*, 1997; Jaspers und Overmann, 2004; Perna *et al.*, 2001). Demgegenüber kann ein Organismus mehrere rRNA-Operons mit bis zu 5% Sequenzabweichung in seinem Genom tragen (Acinas *et al.*, 2004; Nübel *et al.*, 1996; van Berkum *et al.*, 2003). Diese Extremfälle können sowohl zu einer Über- als auch Unterschätzung der mikrobiellen Diversität in einem Habitat führen. Für eine Auflösung phylogenetischer Beziehungen unterhalb der Gattungsebene eignen sich die Sequenzen der 23S rRNA und der transkribierten Region zwischen 16S und 23S rRNA-Gen (ITS).

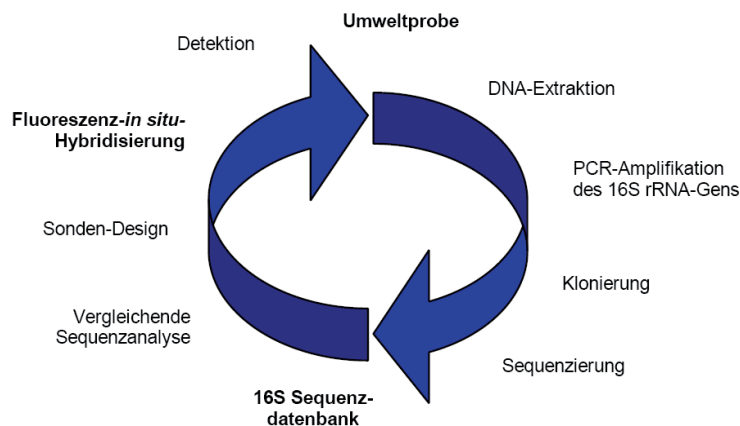
**Diversitätsforschung.** Die Diversität einer mikrobiellen Gemeinschaft ergibt sich aus dem Verhältnis von Arten- und Individuenzahl. Artendiversität oder auch Organismenvielfalt wird als *Richness* bezeichnet und die Gleichmäßigkeit der Individuenverteilung auf die Arten bezeichnet man als *Evenness*. Eine gebräuchliche Größe für die statistische Betrachtung der Diversität einer Gemeinschaft ist der Shannon-Weiner-Index H (Martin, 2002). Für die Bestimmung der Diversität (*Richness* und *Evenness*) ist es notwendig, Individuen in taxonomische Gruppen einordnen zu können. In der mikrobiellen Ökologie ist dies eine schwierige Aufgabe, da es bisher kein eindeutiges, natürliches Species-Konzept gibt (Rosselló-Mora und

Amann, 2001) und die Relevanz verschiedener diskriminatorischer Eigenschaften der rRNA-Sequenzen im ökologischen Zusammenhang umstritten sind (Acinas *et al.*, 2004). Meist werden deshalb in Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität operational definierte Einheiten (OTUs, *operational taxonomic units*) verwendet, z.B. 16S rRNA Gensequenzen mit einer Ähnlichkeit >98%.

**Der rRNA-Ansatz.** Die Diversitäts- und Strukturanalyse mikrobieller Gemeinschaften anhand der Sequenz des 16S rRNA-Gens ist ein wesentlicher Bestandteil der mikrobiellen Ökologie und wird als rRNA-Ansatz bezeichnet (Amann *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1986). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten im Laufe der letzten Jahre wesentliche neue Erkenntnisse zur Diversität und Verbreitung der Mikroorganismen gewonnen werden (Giovannoni *et al.*, 1990; Glöckner *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Hugenholtz *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1990).

Die Identifizierung und Quantifizierung nichtkultivierter Prokaryonten ist nur durch eine Verknüpfung verschiedener Methoden möglich ("whole cycle rRNA approach", Amann *et al.*, 1995). Ausgehend von der Umweltprobe wird eine 16S rRNA-Genbank angelegt. Dieser Schritt beinhaltet die DNA-Extraktion und die Amplifikation des 16S rRNA-Gens mittels ausgewählter Primer, sowie deren Klonierung. Der erste Abschnitt des rRNA-Ansatzes wird mit der Ermittlung der Sequenzen abgeschlossen. Der zweite Abschnitt umfaßt die phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten. Dabei werden die Sequenzen in den Kontext der bestehenden 16S rRNA-Datenbank eingefügt und ihre Verwandtschaftsbeziehungen ermittelt. Anschließend werden dominante Sequenztypen oder Sequenzgruppen ausgewählt, deren Abundanz und Verbreitung in der Umwelt untersucht werden soll. Für diese Sequenztypen werden diskriminatorische Oligonukleotide (Sonden) entworfen. Im letzten Abschnitt des rRNA-Ansatzes erfolgt nun der Nachweis und die Quantifizierung spezifischer Phylotypen im Ausgangshabitat durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH). Mit dieser Methode ist es möglich, eine mikrobielle Gemeinschaft in unterschiedlicher phylogenetischer Auflösung zu studieren.

Allerdings erwies sich die numerische Quantifizierung der limnischen Actinobakterien mittels FISH und einfach-markierten Sonden aufgrund schwacher Hybridisierungssignale als überaus schwierig. Diese Limitierung konnte erst durch die Entwicklung von FISH mit enzymatischer Signalverstärkung (Pernthaler *et al.*, 2002) und eines speziellen Permeabilisierungsprotokolls (Sekar *et al.*, 2003) überwunden werden.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des rRNA-Ansatzes nach Amann *et al.*, 1995.

**Alternative Methoden zur Detektion und Quantifizierung unkultivierter Mikroorganismen.** Der erfolgreiche Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erfordert den Einsatz von kostenintensiven Gerätschaften (Hybridisierungsofen, Mikroskope) und Verbrauchsmitteln (Sonden), sowie Erfahrung bei der Beurteilung und Auswertung des Probenmaterials. Es stehen derzeit einige alternative Methoden zur Verfügung, deren spezifische Limitierungen es jedoch ebenfalls zu beachten gilt. Für die rRNA-Slot blot-Hybridisierung wird Gesamt-RNA aus der Umweltprobe extrahiert. Diese RNA wird anschließend auf einer Membran immobilisiert und mit rRNA-gerichteten, radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert. Die Auswertung erfolgt durch Quantifizierung der Radioaktivität mithilfe eines Phosphor-Imagers (z.B. Methé *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 2001). Hierbei ist zu beachten, daß der rRNA-Gehalt pro Zelle vom physiologischen Zustand der Zelle (Kemp *et al.*, 1993) und die rRNA-Kopienzahl pro Genom von der Species abhängig ist (Acinas *et al.*, 2004; Klappenbach *et al.*, 2000; Klappenbach *et al.*, 2001). Daraus folgt eine eingeschränkte Quantifizierungsmöglichkeit natürlicher Populationen durch diese Methode (Ravenschlag *et al.*, 2000; Sahm *et al.*, 1999).

In der als reverse line blot-Hybridisierung bezeichneten Methode werden Oligonukleotidsonden auf einer Membran immobilisiert und diese anschließend mit Biotin-markierten PCR-Fragmenten hybridisiert (Zwart *et al.*, 2003). Diese Methode erlaubt einen hohen Probenumsatz, wobei eine Quantifizierung nur eingeschränkt möglich ist, da es bei der PCR selektiv zu einer An- oder Abreicherung von Sequenztypen kommen kann (v. Wintzingerode *et al.*, 1997). Aufgrund dieser PCR-Artefakte ist es auch nicht möglich, von der Frequenz eines Sequenztyps in einer 16S rRNA-Genbank auf dessen natürliche Abundanz zu schließen (Amann *et al.*, 1995).

Eine weitverbreitete Methode zur Analyse der Struktur mikrobieller Gemeinschaften ist die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE). Hierbei werden PCR-amplifizierter 16S rRNA-Fragmente der Umweltprobe elektrophoretisch aufgetrennt und die erhaltenen Bandenmuster analysiert. Einzelne Banden können sequenziert oder mit dem Laufverhalten

von Isolaten oder Klonen verglichen werden. Eine weitere PCR-basierte Methode zur Analyse der mikrobiellen Diversität bedient sich Fluoreszenz-markierter 16S rRNA-Primer. Diese Methode wird als terminale Restriktionsfragmentanalyse oder T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) bezeichnet (Moeseneder *et al.*, 2001). Die PCR-Produkte werden Sequenz-spezifisch durch den Einsatz von einem oder mehreren Restriktionsenzymen verdaut und anschliessend elektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweiligen endständigen Fragmente können aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung in einem Kapillarsequenziergerät sichtbar gemacht werden. Es wird hierbei eine sehr hohe Auflösung bei der Grössenbestimmung der Fragmente von ca. +/- 1 Basenpaar erreicht. Nichtsdestotrotz ist die T-RFLP-Analyse methodisch-bedingt in ihrem Auflösungsvermögen der mikrobiellen Diversität beschränkt: Zum einen wird nur die Längeninformation der beiden endständigen Fragmente erfaßt, andererseits bleiben alle Sequenzunterschiede ausserhalb der Erkennungsregion der Restriktionsenzyme unberücksichtigt. T-RFLP wurde zur Dereplizierung von 16S rRNA-Genbanken (Moeseneder *et al.*, 2001), sowie zur Diversitätsanalyse von z. B. marinem Bacterioplankton (Moeseneder *et al.*, 1998) und von hypersalinen Salzteichen (Øvreås *et al.*, 2003) angewendet. Eine elektrophoretische Auftrennung von PCR-generierten Fragmenten wird ebenfalls bei der so genannte ARISA-Methode (Automated ribosomal intergenic spacer analysis) angewendet (Yannarell *et al.*, 2003; Yannarell und Triplett, 2004). Hierbei wird die Region zwischen 16S und 23S rRNA-Gen (ITS) anhand ihrer Längenheterogenität unterschieden. Die Elektrophorese wird automatisiert in Kapillaren durchgeführt; eine Sequenzbestimmung ist deshalb nicht möglich.

Die quantitative oder *real time* PCR ermöglicht die Quantifizierung sehr nahe verwandter Phylotypen mittels spezifischer Primer und Sonden. Die Quantifizierung erfolgt über einen an die Sonde gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoff (Becker *et al.*, 2002; Ludwig und Schleifer, 2000). Durch die Beschränkung auf nah-verwandte Mikroorganismen kann die Selektivität der PCR minimiert werden (Thompson *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel zur hoch-parallelen Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in Umweltproben stellt der Einsatz von Microarrays dar (Loy *et al.*, 2002; Peplies *et al.*, 2003; Urakawa *et al.*, 2003). Dazu werden unmarkierte Fängersonden auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert und mit markierten Umweltsequenzen hybridisiert. Die Markierung der Umwelt-Nukleinsäuren beinhaltet meist einen PCR-Schritt, welcher somit wiederum eine Quantifizierung von Mikroorganismen einschränkt. Eine direkte Extraktion und Markierung von Umwelt-rRNA könnte jedoch diese Limitierung aufheben. Als Vorteil dieser Methode ist der mögliche Einsatz einer großen Anzahl von Sonden zu nennen, wobei alle Sonden zwangsläufig bei identischen Bedingungen hybridisiert werden müssen. Dies kann sowohl zu falsch-positiven als auch falsch-negativen Ergebnissen führen, deren Auswirkungen sich u.a. durch statistische Methoden minimieren lassen (Peplies *et al.*, 2003)



**Bestimmung der Aktivität unkultivierter Mikroorganismen.** Aufbauend auf den Fortschritten in der Diversitäts- und Strukturanalyse mikrobieller Gemeinschaften rückt die potentielle oder tatsächliche Aktivität der Mikroorganismen am natürlichen Standort immer mehr in den Mittelpunkt der mikrobiell-ökologischen Forschung. Oft wird dazu eine kurzzeitige Inkubation einer Umweltprobe mit einem radioaktiven Substrat durchgeführt. Beispielsweise dient Leucin (Kirchman *et al.*, 1985) zum Abschätzen der mikrobiellen Biomasseproduktion im Plankton (Synthese von zellulären Proteinen) und die Thymidin-Inkorporierung als Indikator der Zellteilung (DNA-Synthese) (Fuhrman und Azam, 1980). In solchen Standardmethoden wird jedoch die gemessene Aktivität über die gesamte mikrobielle Gemeinschaft gemittelt (*bulk*), d.h. eine Unterscheidung in aktive und inaktive Populationen ist nicht möglich. Eine Reihe von mikroskopischen Methoden versucht nun diese Limitierung aufzuheben. Durch Mikroautoradiographie kann die Aufnahme und der Einbau von radioaktiv-markiertem Substrat in zelluläre Bestandteile auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden, und diese Analyse kann mit der Identifizierung durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung kombiniert werden. Dadurch bietet diese Methode die Möglichkeit das physiologische Potential bisher unkultivierter Populationen unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen (Andreasen und Nielsen, 1997; Cottrell und Kirchman, 2000; Ouverney und Fuhrman, 1999). Folgende Substrate wurden bisher für die Kombination aus Mikroautoradiographie und FISH (MAR-FISH) eingesetzt: Bicarbonat (Rossello-Mora *et al.*, 2003), Acetat, Pyruvat, Propionat, Butyrat (Daims *et al.*, 2001), Glucose, N-Acetylglucosamin (Cottrell und Kirchman, 2000), Glycerin (Rossello-Mora *et al.*, 2003), Thymidin, Leucin, Aspartat (Teira *et al.*, 2004), ein Aminosäure-Mix, selbst-prepariertes Protein und Chitin (Cottrell und Kirchman, 2000) sowie Dimethylsulfonpropionat (DMSP) (Malmstrom *et al.*, 2004).

Bromdeoxyuridin ist ein Analogon des DNA-Bausteins Thymidin; der Einbau dieser Substanz in die genomische DNA während der Replikation lässt sich mithilfe einer Antikörper-Reaktion nachweisen. Eine Kombination mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erlaubt somit die Identifizierung von spezifischen, DNA-synthetisierenden Populationen (Pernthaler *et al.*, 2002).

Die Aktivität von Organismen lässt sich qualitativ auch an der Expression von entsprechenden Schlüsselenzymen eines Stoffwechselweges bestimmen. Durch simultane Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von mRNA und rRNA lassen sich Populationen von Mikroorganismen, die bestimmte funktionelle Gene exprimieren, auch phylogenetisch identifizieren (Pernthaler und Amann, 2004).

Eine Reihe weiterer Methoden nutzt die unterschiedlichen Atomgewichte der stabilen Kohlenstoff-Isotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$ . Nach Inkubation mit einer Kohlenstoffquelle mit einem bekannten – möglichst extremen – Isotopenverhältnis lässt sich die Gesamt-DNA durch Ultrazentrifugation in 'leichte' (d.h. abgereichert in Bezug auf  $^{13}\text{C}$ ) und 'schwere' (angereicherte) DNA auftrennen. Diese Fraktionen dienen dann wiederum als Ausgangsmaterial für phyloge-

netische Untersuchungen (z.B. PCR, Klonierung und Sequenzierung). Auf diese Weise kann zwischen den Populationen mit und ohne Aufnahme von Substrat unterschieden werden (Radajewski *et al.*, 2000). In einem alternativen Ansatz wird zunächst die Gesamt-RNA aus einer Umweltprobe gewonnen. Die ribosomale RNA einer spezifischen Population wird anschließend durch Hybridisierung an eine Fänger-Sonde isoliert und auf ihr Isotopenverhältnis hin untersucht (MacGregor *et al.*, 2002).

Kürzlich wurde eine weitere nicht-mikroskopische Methode zur populationsspezifischen Quantifizierung von inkorporiertem Thymidin vorgestellt (Van Mooy *et al.*, 2004). Bei diesem als 'SNAP-BAC' bezeichneten Verfahren wird extrahierte Gesamt-DNA mittels spezifischer Primer biotinyliert. Diese so markierten Nukleinsäuren können separiert und anschließend deren Radioaktivität gemessen werden (Van Mooy *et al.*, 2004).

## 1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die phylogenetisch-definierte Gruppe der limnischen Actinobakterien (LAB) zu untersuchen. Die Arbeit läßt sich in die drei Aspekte Diversität, Abundanz und Aktivität am natürlichen Standort untergliedern. Dafür sollten sowohl die Methoden des rRNA-Ansatzes (Amann *et al.*, 1995) als auch solche zur Aktivitätsbestimmung auf Einzelzell-Ebene angewendet werden.

Im ersten Teilprojekt sollte die Diversität und Phylogenie der Actinobakterien des Süßwassers umfassender als bisher aufgeklärt werden. Dazu war es notwendig, umfangreiche Genbanken aus einer Anzahl verschiedener limnischer Habitaten zu erstellen. Aus anderen Studien war bekannt, daß Actinobakterien-verwandte Sequenztypen in 16S rRNA-Genbanken aus aquatischen Habitaten häufig unterrepräsentiert waren (Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001; Zwart *et al.*, 2002). Daraus ergab sich die Notwendigkeit eines effizienten Screening-Verfahrens für die anzulegenden Genbanken. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der phylogenetischen Position der erhaltenen Sequenzen und ihre Verwandtschaft untereinander, sowie zu Umweltsequenzen anderer Habitats und kultivierten Vertretern der Actinobakterien. Für eine umfassende und verlässliche Phylogenie der LAB waren daher eine angemessene Anzahl möglichst vollständiger Sequenzen notwendig (Ludwig und Klenk, 2001). Daneben waren ein großer Datensatz an Vergleichssequenzen und geeignete Methoden zur Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen nötig. Aufbauend auf die Ergebnisse der vergleichenden Sequenzanalyse sollte die Frage geklärt werden, ob sich die 16S rRNA-Sequenztypen habitatspezifisch gruppieren und dementsprechend Süßwasser-spezifische Sequenzgruppen postuliert werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die gewonnenen phylogenetischen Informationen als Basis für das Design von spezifischen Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) dienen. Die bioinformatische Auswertung der Sequenzdaten wird begleitet von der Beurteilung der Spezifität der Sonden im Labor. Da für die Umwelt-

relevanten Oligonukleotidsonden häufig keine kultivierten Vertreter verfügbar sind, sollten geeignete Testverfahren etabliert und angewendet werden. Zur Vervollständigung des rRNA-Ansatzes sollten im folgenden die optimierten Sonden in verschiedenen Habitaten zur Abundanzbestimmung mittels FISH eingesetzt werden. Die Auswahl der Habitate in Bezug auf bestimmte Umweltparameter (wie z.B. Jahreszeit, trophischer Status, Temperatur, pH, Höhenlage) sollte ermöglichen, daß die Abundanzen der LAB mit diesen Parametern verglichen werden konnten.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte näher auf die funktionale Rolle der Actinobakterien im Ökosystem Süßwasser eingegangen werden. Bislang standen nahezu keine Informationen über die *in situ*-Aktivität dieser Gruppe von Mikroorganismen im natürlichen Habitat zur Verfügung. Eine Untersuchung beschäftigte sich daher eingehender mit der Fragestellung, ob es sich bei den häufigen limnischen Actinobakterien um einen allochthonen (aus terrestrischen Lebensräumen passiv eingetragenen) oder um einen autochthon wachsenden Bestandteil des Bakterioplanktons handelt. Um die *in situ*-Aktivität einzelnen Populationen zuzuordnen zu können, mußten spezielle mikroskopische Methoden zum Nachweis des Einbaus von markierten DNA-Bausteinen oder anderen Substraten in diese Zellen verbessert und eingesetzt werden. Die Ergebnisse der oben-beschriebenen Methoden sollten weiterhin die Entwicklung spezifischer Anreicherungs- oder Isolierungsstrategien erleichtern, denn kein Vertreter der abundanten Actinobakterien aus dem Süßwasser konnte bisher in Reinkultur gebracht werden.

## 2 Eigene Untersuchungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Diversität und Ökologie der limnischen Actinobakterien (LAB). Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Methodenspektrum des rRNA-Ansatzes (siehe Einleitung) auf das Habitat Süßwasserpelagial angewendet. Gegenwärtig beginnen die meisten Studien der mikrobiellen Ökologie mit der Erfassung der Gesamt-Diversität der Mikroorganismen an einem bestimmten Standort (Crump *et al.*, 2003; Musmann *et al.*, 2003; Ravenschlag *et al.*, 1999; Torsvik *et al.*, 1990; Zwisler *et al.*, 2003). Demgegenüber sollte in der vorliegenden Studie eine phylogenetisch definierte Gruppe von Bakterien in einem Habitattyp untersucht werden. Diese Zielsetzung erforderte in einigen Bereichen eine Anpassung der verwendeten Methoden. Die Diversität und Ökologie der limnischen Actinobakterien wurde in einer systematischen Abfolge von Teilprojekten untersucht:

- (1) Erfassung der Organismenvielfalt der LAB
- (2) Bestimmung der Phylogenie der LAB
- (3) Design von FISH-Sonden für spezifische Gruppen der LAB
- (4) Bestimmung der *in situ*-Abundanzen der LAB
- (5) Ermittlung der Aktivität der LAB

Dabei sind die Teilabschnitte (1) bis (4) dem rRNA-Ansatz zuzurechnen (siehe Einleitung) und wurden durch den Abschnitt (5) ergänzt. Vereinfacht ausgedrückt kann man sagen, daß die Abschnitte (1) und (2) untersuchen, **welche** Organismen im Habitat vorhanden sind (→ *Richness*, siehe Kapitel 3.1), und die Abschnitte (3) und (4), **wieviele** von den einzelnen Organismen oder Organismengruppen (→ *Evenness*, siehe Kapitel 3.2). Abschnitt (5) untersucht anschließend, die **Aktivität** dieser Organismen am natürlichen Standort (siehe Kapitel 2.3).

Die Untersuchung der limnischen Actinobakterien am natürlichen Standort sollte mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erfolgen (Amann *et al.*, 1995). Für diese Methode sind spezifische Sonden in möglichst verschiedenen taxonomischen Ebenen und bis zu einer möglichst feinen Auflösung notwendig. Aus der Literatur waren verschiedene Sonden für Actinobakterien bekannt (Erhart, 1997; Glöckner *et al.*, 2000; Roller *et al.*, 1994), die aber meist eine sehr weit-gefaßte Zielgruppe erfaßten (siehe Tabelle 5). Die Sonden HGC69a, HGC236 und HGC664 detektieren nahezu alle bekannten Sequenztypen der Actinobakterien, d.h. eine Differenzierung zwischen den zahlreichen beschriebenen Species der Kultursammlungen und den unkultivierten Vertretern ist mit ihnen nicht möglich. Lediglich die Sonde HG1-840 wurde speziell für Umweltsequenztypen aus dem Süßwasser entwickelt (Glöckner *et al.*, 2000), wobei für deren Entwicklung nur in begrenztem Umfang Sequenzen zur Verfügung

standen. Als Voraussetzung für die Entwicklung und Etablierung spezifischer FISH-Sonden waren die Erweiterung der Sequenzinformationen und eine darauf aufbauende, umfassende Phylogenie der LAB notwendig.

**Tabelle 5:** Publierte FISH-Sonden für Actinobakterien.

Sonde	5'-3' – Sequenz	Zielmolekül	5'-Position <sup>1</sup>	Zielgruppe
HGC69a <sup>2</sup>	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	23S rRNA	1907	alle Actinobakterien
HGC236 <sup>3</sup>	AAC AAG CTG ATA GGC CGC	16S rRNA	235	alle Actinobakterien
HGC664 <sup>3</sup>	AGG AAT TCC AGT CTC CCC	16S rRNA	663	alle Actinobakterien
HG1-840 <sup>4</sup>	TCG CAS AAA CCG TGG AAG	16S rRNA	840	HG1-Sequenzgruppe

<sup>1</sup> Position im 16S rRNA-Gen relativ zu *E. coli* Brosius *et al.*, 1981; <sup>2</sup> Roller *et al.*, 1994; <sup>3</sup> Erhart, 1997; <sup>4</sup> Glöckner *et al.*, 2000.

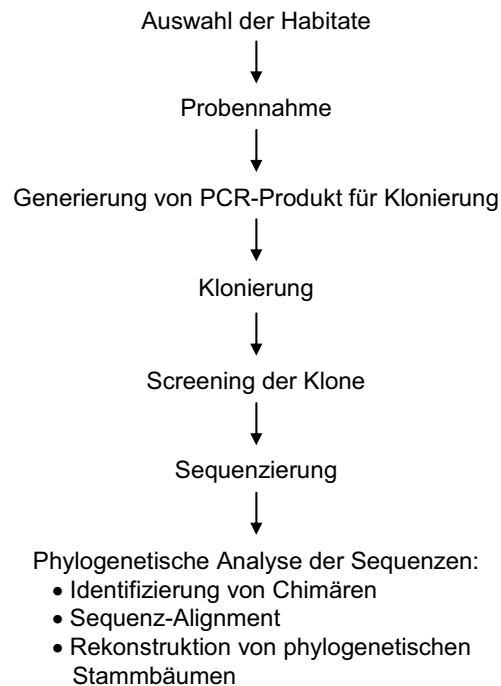
## 2.1 Diversität und Phylogenie limnischer Actinobakterien

Süßwasserhabitats sind äußerst vielfältig und unterscheiden sich in ihren topographischen (z.B. Größe, Tiefe, geographische Lage) und limnochemischen (Nährstoffgehalt, pH, Salinität) Eigenschaften. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte die 16S rRNA-Diversität der limnischen Actinobakterien in verschiedenen Süßwasserhabitats erfasst werden. Dabei wurde der Schwerpunkt auf meso- bis eutrophe Flachlandseen gelegt, da oligotrophe und alpine Habitats bereits in anderen Studien untersucht wurden (Crump *et al.*, 2003; Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001). Es sollte untersucht werden, ob diese ausgewählten Habitats Gemeinsamkeiten in Bezug auf die LAB aufweisen und sich von anderen Habitattypen, vor allem dem Boden und dem marinen Pelagial unterscheiden. In Tabelle 6 wurden einige Merkmale der für die 16S rRNA-Genbanken verwendeten Habitats zusammengefasst. Neben der potentiellen Unterschiede der mikrobiellen Gemeinschaften in verschiedenen Gewässertypen, können auch saisonale Unterschiede nicht ausgeschlossen werden. Für die Genbanken stand meist nur eine Probe zur Verfügung; in der Summe erstreckten sich die Zeitpunkte jedoch über alle Jahreszeiten: Frühjahr ( imov, Thermalquelle), Sommer (Schöhsee, Sælenvannet), Herbst (Masurische Seen) und Winter (Fuchskuhle).

**Tabelle 6:** Mittels 16S rRNA-Genbanken untersuchte Habitats.

Habitat	Geographische Lage	Nährstoffgehalt	weitere Merkmale
Schöhsee	Deutschland	mesotroph	hoher Karbonat-Gehalt
imov	Tschechische Republik	eutroph	2 km <sup>2</sup> Oberfläche
Sælenvannet	Norwegen	mesotroph	Brackwasser: 0-2% Salinität, meromiktisch
Thermalquelle	Neuseeland	n.b.	53°C, pH 2,5
Masurische Seen	Polen	eutroph	dimiktisch
Wümmewiesen	Deutschland	n.b.	einmal jährlich überschwemmt
Fuchskuhle	Deutschland	mesoacidotroph	huminstoffreich, pH 4,5

n.b., nicht bekannt.

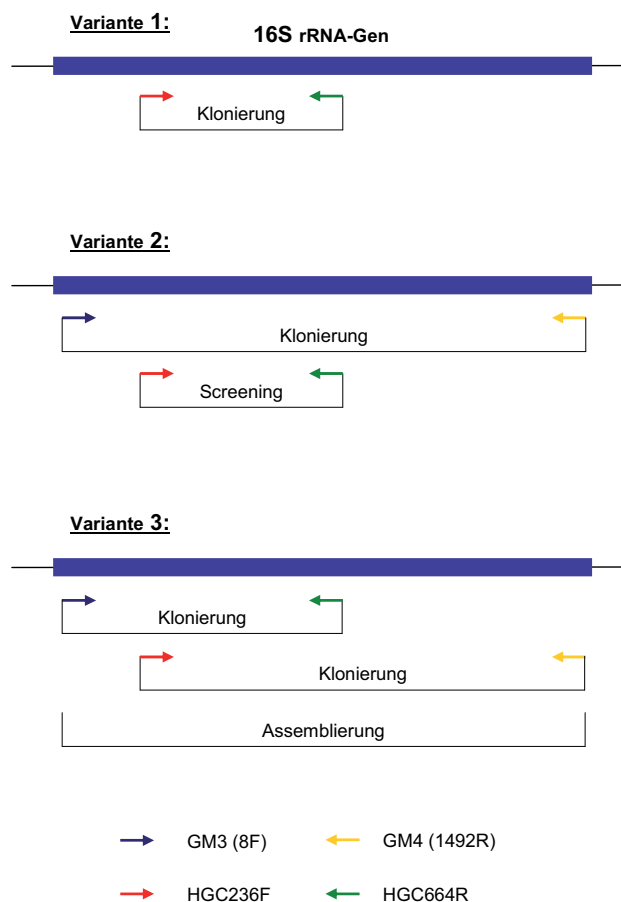


**Abbildung 3:** Schematischer Ablauf von Klonierung und Screening.

Üblicherweise wird extrahierte DNA als Ausgangsmaterial für die Amplifizierung der 16S rRNA-Gene aus der Umwelt verwendet. In der vorliegenden Arbeit stand in den meisten Fällen entweder nicht genügend Zellmaterial für eine DNA-Extraktion zur Verfügung, oder Huminstoffe erschwerten die Gewinnung von amplifizierbarer DNA. Aus diesem Grund wurde die so genannte Filter-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Kirchman *et al.*, 2001) angewendet. Hierbei dient ein kleines Stück eines Membran-Filters als Ausgangsmaterial und wird direkt der PCR-Reaktion beigegeben.

**Klonierungs- und Screening-Strategie.** In der vorliegenden Arbeit sollten möglichst viele und diverse 16S rRNA-Gene von Actinobakterien ermittelt werden. Um das kostenintensive Sequenzieren von Klonen zu minimieren, gab es grundsätzlich drei mögliche methodische Ansätze: In Variante 1 (Abbildung 4) werden die von den FISH-Sonden HGC236 und HGC664 abgeleiteten Primer zur Generierung des zu klonierenden Abschnitts des 16S rRNA-Gens verwendet. Dies bedeutet, daß jede Klonsequenz von einem Actinobakterium stammt. Negativ wirkt sich jedoch die Position der Primer auf dem 16S rRNA-Gen aus: Es wird ein nur etwa 400 Nukleotide langes Fragment generiert. In Variante 2 werden die universell-bakteriellen Primer GM3 und GM4 eingesetzt, wodurch die Genbank die Gesamtdiversität der Bakterien in der Ausgangsprobe erfaßt. Es muß sich folglich ein Screening-Verfahren anschließen, um die mit den Actinobakterien verwandten Sequenztypen auswählen zu können. Der entscheidende Vorteil dieser Methodik gegenüber Variante 1 ergibt sich aus der

Länge der erhaltenen Sequenzen: Für die sich anschließenden phylogenetischen Studien steht fast das gesamte rRNA-Gen (ca. 1500 Nukleotide) und damit ein wesentlich höherer Informationsgehalt zur Verfügung (Ludwig und Klenk, 2001). Als weitere mögliche Variante ist eine PCR unter Verwendung einer Kombination aus spezifischen und universell-bakteriellen Primern denkbar (Variante 3, Abbildung 4). Hierbei würden jeweils 2 Genbanken mit sich überlappenden Fragmenten erzeugt werden, wobei wiederum jeder Klon (unter stringenten Amplifikationsbedingungen) von einem Actinobakterium stammt. Ein Screening-Verfahren wäre somit nicht notwendig. Die erhaltenen Sequenzen würden anschließend anhand des überlappenden Bereiches zusammengefügt. Es sollte hierbei jedoch beachtet werden, daß jede Teilsequenz von einem anderen Individuum stammen würde und es somit zu *in silico*-generierten Heteroduplex-Molekülen kommen könnte. Aufgrund der oben geschilderten Vorteile wurde Variante 2 ausgewählt. Die Detektion des Actinobakterien-spezifischen PCR-Fragments erfolgte durch den DNA-Farbstoff SYBR Green und eine quantitative PCR-Maschine (ABI SDS 7700, Applied Biosystems). Für die Sequenzierung wurden Standardprotokolle verwendet und die Teilsequenzen wurden mithilfe der Software SEQUENCHER (Gene Codes) zu Vollsequenzen assembliert.



**Abbildung 4:** Klonierungs- und Screening-Strategien.



**Phylogenetische Analyse der Sequenzen.** Zunächst wurden die erhaltenen Sequenzen auf mögliche Chimäre hin untersucht. Dies sind DNA-Moleküle, die aus zwei oder mehr Abschnitten unterschiedlichen Ursprungs (d.h. verschiedenen Organismen) bestehen. Chimären entstehen bei einer unvollständigen Elongation während eines PCR-Zyklus und der anschließenden Vervollständigung während des nächsten Zyklus nach Hybridisierung an ein anderes DNA-Molekül (Hugenholz und Huber, 2003). Für eine erste Untersuchung wurde das online-Bioinformatik-Werkzeug CHIMERA\_CHECK (<http://35.8.164.52/cgi/chimera.cgi?su=SSU>) verwendet. Anschließend wurden nahverwandte Sequenzen von kultivierten und unkultivierten Vertretern der Actinobakterien in den öffentlichen Sequenzdatenbanken ermittelt. Dazu wurde das Bioinformatik-Werkzeug Basic local alignment search tool (BLAST, <http://ngfnblast.gbf.de/blast.html>) eingesetzt. Alle weiteren Sequenzanalysen wurden mit dem Software-Paket ARB ([www.arb-home.de](http://www.arb-home.de), Ludwig *et al.*, 2004) durchgeführt. Zunächst wurden die homologen Basen aller importierten Sequenzen durch die ARB-Funktion Fast\_Aligner einander zugeordnet (= alignment) und anschließend manuell verifiziert. Es folgte die Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes der Actinobakterien. Für die Bestimmung der Topologie des Stammbaumes wurden nur fast-vollständige 16S rRNA-Sequenzen verwendet, um den Informationsgehalt des Moleküls nicht einzuschränken (Ludwig und Klenk, 2001). Weiterhin wurde ein 50%-Basen-Frequenzfilter für die Actinobakterien berechnet. Durch den Einsatz dieses Filters werden hochvariable Positionen des Alignments (→ konserviertes Nukleotid in weniger als 50% der Sequenzen) von den Berechnungen ausgeschlossen, um so eine Unterschätzung der evolutiven Sequenzveränderung zu vermeiden (Felsenstein, 1985; Ludwig und Klenk, 2001). Anschließend wurden die in ARB implementierten Stammbauberechnungsverfahren: Neighbor joining (NJ), Maximum parsimony (MP) und Maximum likelihood (ML) in Kombination mit oder ohne Basenfrequenzfilter und verschiedenen anderen Korrekturen (Jukes-Cantor, Felsenstein) eingesetzt. Außerdem wurde die Anzahl und Auswahl der zur Berechnung herangezogenen Sequenzen variiert: NJ- und MP-Berechnungen wurden meist mit allen verfügbaren Sequenzen der Actinobakterien (ca. 2000), ML-Berechnungen mit verschiedenen Kombinationen von 60 bis 120 Sequenzen durchgeführt. Die erzeugten Stammbäume wurden manuell verglichen und ein Konsensus-Stammbaum erstellt. Verzweigungen, die nicht eindeutig aufgelöst werden konnten, wurden als Multifurkationen dargestellt. Anschließend wurden ausgewählte Partial-Sequenzen mit dem in ARB implementierten Werkzeug nach Parsimony-Kriterien inseriert, ohne daß dabei die Topologie des Stammbaumes verändert wurde.

**Ergebnisse.** Im Zuge dieser Arbeit wurden von den folgenden Habitaten Proben genommen: dem Stausee imov, dem mesotrophen Schöhsee, dem Brackwasser-See Sælenvannet, den Masurischen Seen, den überschwemmten Wümmewiesen, einer sauren Thermalquelle und der huminstoffreichen Fuchskuhle (Tabelle 6). Dabei wurden aus einigen dieser Habitats mehrere Proben genommen, die die interne Variabilität in diesen Süßwasser-

habitaten widerspiegeln sollten. So wurden z.B. vom Stausee imov Proben vom Transekt: vom Einfluß bis zum Stausdamm verarbeitet. Der meromiktische Brackwassersee Sælenvannet wurde in mehreren Tiefenschichten über die Halokline beprobt: oxisches Oberflächenwasser (1 m), Chemokline (2 m) und anoxisches Tiefenwasser (6 m). Die Masurischen Seen werden durch drei Seen repräsentiert, die jedoch hydrographisch miteinander verbunden sind. Die Große Fuchskuhle wurde 1990 künstlich geteilt, und die beiden Becken Südwest (SW) und Nordost (NO) unterscheiden sich z.B. in Bezug auf Huminstoffgehalt und pH-Wert (Bittl und Babenzien, 1996).

Aus diesen Proben wurden insgesamt achtzehn 16S rRNA-Genbanken angelegt und diese mit der oben beschriebenen Klonierungs- und Screening-Strategie verarbeitet. Insgesamt wurden mehr als 1800 Klone der Screening-PCR unterzogen und es konnten so 73 Klone identifiziert werden, welche ein Actinobakterien-16S rRNA-Gen trugen. Ein Klon der Wümmewiesen-Genbank wurde als Chimäre identifiziert und deshalb von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Vollsequenzen wurden anschließend von insgesamt 63 Klonen erstellt (Tabelle 7). Neun Klone der Sælenvannet-1 m-Genbank wurden nicht weiter verarbeitet, da sich deren Partialsequenz als identisch zu bereits vollständig sequenzierten Klonen der gleichen Genbank erwiesen.

Durch Sequenzanalyse konnte festgestellt werden, daß die Mehrzahl der 63 Klone eine oder mehrere Abweichungen zu den allgemeinen Actinobakterien-Sonden HGC236 und HGC664 aufwiesen. Dies bedeutet, daß die entsprechenden Populationen nicht durch FISH mit diesen Sonden unter optimalen Hybridisierungsbedingungen visualisierbar gewesen wären; dies hätte folglich zur Unterschätzung der Abundanzen an LAB geführt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer FISH-Sonden (siehe Kapitel 2.2).

Die erhaltenen Vollsequenzen wurden zusammen mit den nahe verwandten Sequenzen der öffentlichen Sequenzdatenbanken unter Verwendung des Software-Paketes ARB phylogenetisch analysiert. Der Konsensus-Stammbaum (siehe Abbildung 3 in Warnecke *et al.*, 2004) zeigte, daß 60 der erhaltenen Sequenzen in 4 Gruppen fielen. Diese Gruppen wurden als acI bis acIV bezeichnet, wobei acI der von Glöckner *et al.* postulierten hgcl-Sequenzgruppe entspricht (Glöckner *et al.*, 2000). Mehr als 75% aller publizierten Sequenzen der acI-, acII- und acIV-Sequenzgruppen wurden aus limnischen Habitaten (Seen, Flüsse, Estuare) gewonnen (siehe Tabelle 3 in Warnecke *et al.*, 2004). Die Sequenzgruppe acIII setzt sich demhingegen zu etwa gleichen Teilen aus Sequenzen der Chemokline des Brackwassersees Sælenvannet und des hypersalinen Soda-Sees Mono Lake zusammen (Humayoun *et al.*, 2003). Die phylogenetischen Analysen schlossen auch >300 Umweltsequenzen ein, welche aus terrestrischen oder marinen Proben gewonnen worden. Diese Sequenztypen unterschieden sich deutlich in ihrer phylogenetischen Position im Konsensus-Stammbaum von den limnischen Sequenztypen und bildeten separate Sequenzgruppen (siehe Abbildung

3 in Warnecke *et al.*, 2004). Es kann also eine Habitat-spezifische und damit ökologisch relevante phylogenetische Gruppierung von actinobakteriellen Umweltsequenzen entsprechend ihres Ursprungs – Süßwasser-, marines oder terrestrisches Habitat – vermutet werden.

Die Mehrzahl der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Sequenzen fielen in die Sequenzgruppen *acI* und *acII* (21 bzw 24). Die *acI*-Sequenztypen wurden dabei aus 6 verschiedenen Beprobungsstandorten gewonnen, die *acII*-Sequenztypen sogar aus allen 7 Habitaten. Demgegenüber enthält die *acIII*-Sequenzgruppe nur Sequenzen aus einem Habitat, und zwar aus der Chemokline des Sælenvannet. Aus der anoxischen Schicht dieses Sees konnten hingegen keine Actinobakterien-Sequenzen erhalten werden, und aus den 1 m- und 2 m-Genbanken kein Sequenztyp der *acI*-Sequenzgruppe. Damit stellt der See Sælenvannet – vermutlich aufgrund seiner Salinität und der beprobten Schichten – ein einzigartiges Habitat innerhalb dieser Studie dar. Ansonsten lassen sich bedingt durch die niedrige Anzahl von positiven Klonen keine weiteren Rückschlüsse auf die Verteilung und Verbreitung einzelner Sequenzgruppen in verschiedenen Süßwasserhabitaten machen. Dies betrifft die einzelnen Abschnitte des imov-Stausees, die hydrographisch verbundenen Seen der Masuren und die beiden untersuchten Becken der Fuchskuhle. In den Genbanken aus Anreicherungsexperimenten mit Wasser der Fuchskuhle konnten keine Actinobakterien nachgewiesen werden; dieser Befund wurde durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bestätigt (Burkert *et al.*, 2003).

Die Sequenzgruppen *acI* und *acII* besaßen einen monophyletischen Ursprung in allen durchgeführten phylogenetischen Analysen, trotzdem besitzen sie eine hohe interne Diversität: Die minimale Sequenzähnlichkeit innerhalb der *acI*-Sequenzgruppe beträgt 90%, die der *acII*-Sequenzgruppe 94%. Diese Resultate lassen vermuten, daß sich beide Sequenzgruppen evolutiv aus nur jeweils einem Sequenztyp entwickelt haben und anschließend eine Diversifizierung im Habitat stattfand. Die Sequenzgruppe *acIV* ist demhingegen durch einen größeren Anteil von Sequenzen aus Boden- (7%) und marinen Proben (8%) gekennzeichnet.

Innerhalb der Sequenzgruppen *acI*, *acII* und *acIV* wurden nahezu identische Sequenztypen (Sequenzähnlichkeit >99%) aus bis zu 3 verschiedenen Habitaten mit deutlich unterschiedlichen wasserchemischen Parametern gewonnen. Diese Ergebnisse lassen eine ökologisch relevante Diversität der LAB vermuten, die mit den hier eingesetzten Methoden und der Sequenz der 16S rRNA nicht aufgelöst werden konnte. Zu einer ähnlichen Schlußfolgerung gelangten Boenigk *et al.* in Laborversuchen (Boenigk *et al.*, 2004): Vertreter der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe mit nahezu identischen 16S rRNA-Sequenzen (Sequenzähnlichkeit 99,6%) zeichneten sich durch eine unterschiedlich ausgeprägte Fraßresistenz gegenüber Nanoflagellaten aus (Boenigk *et al.*, 2004).

Für biogeographische Verbreitungsstudien von Mikroorganismen werden meist mehrere phylogenetische Marker und Sequenzen von funktionellen Genen analysiert (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Habitaten ver-

schiedener geographischer Lage gewonnenen 16S rRNA-Sequenzinformationen eignen sich aufgrund des geringen Auflösungsvermögens deshalb nicht für derartige Fragestellungen. Für diese Art von Studien müßten zusätzlich auch weniger konservierte genomische Abschnitte wie z.B. die ITS-Region zwischen 16S- und 23S rRNA-Gen für die Sequenzanalyse herangezogen werden (Bach *et al.*, 2003; Bergamo *et al.*, 2004; Yannarell und Triplett, 2004).

Darüberhinaus wurden nahezu identische Sequenztypen auch aus einzelnen Habitaten gewonnen (z.B. aus der Fuchskuhle innerhalb acI und aus dem See Sælenvannet innerhalb der Sequenzgruppe acIII). In einer neueren Studie (Acinas *et al.*, 2004) wird dieses Auftreten von Sequenzgruppen sehr hoher Sequenzähnlichkeit (>99%, Mikrodiversität) innerhalb eines Habitats als Konzept zur Beschreibung der evolutiven Diversifizierung und der Populationsgenetik von mikrobiellen Gemeinschaften diskutiert.

Bei all diesen Überlegungen sollte jedoch beachtet werden, daß die Umwelt-Relevanz der erhaltenen Sequenztypen durch PCR-unabhängige Methoden (z.B. FISH) verifiziert werden muß.

**Tabelle 7:** Verteilung der gewonnenen Sequenzen auf die ac-Sequenzgruppen.

Habitat	Sequenzgruppe				außerhalb	Summe
	acI	acII	acIII	acIV		
imov-Stausee						<b>7</b>
Einfluß	1	4	0	0	0	
Mittelteil	1	0	0	0	0	
Staudamm	1	0	0	0	0	
Schöhsee	3	3	0	5	0	<b>11</b>
Sælenvannet						<b>13</b>
1 m Tiefe	0	7	0	0	0	
2 m Tiefe	0	1	5	0	0	
6 m Tiefe	0	0	0	0	0	
Masurische Seen						<b>12</b>
Niegocin	3	2	0	1	0	
Dargin	0	2	0	1	0	
Mamry	2	0	0	1	0	
Wümmewiesen	1	1	0	0	2	<b>4</b>
Thermalquelle	1	1	0	0	0	<b>2</b>
Fuchskuhle						<b>14</b>
SW-Becken	6	2	0	0	1	
SW-Anreicherung	0	0	0	0	0	
NO-Becken	2	1	0	2	0	
NO-Anreicherung	0	0	0	0	0	
<b>Summe</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>63</b>

**Mögliche Limitierungen der Methoden.** Die für die 16S rRNA-Diversitätsstudie ausgewählten Habitate decken nicht die gesamte Vielfalt des Süßwasserpelagials ab. Zum Beispiel wurde kein oligotropher See beprobt, da diese schon in anderen Studien untersucht wurden (Gossenköllesee und Baikalsee, Glöckner *et al.*, 2000; Crater Lake, Urbach *et al.*, 2001; Toolik Lake, Crump *et al.*, 2003). Ebenso wurden keine Fließgewässer beprobt, da angenommen wurde, daß die relativ kurze Verweildauer des Wassers nicht die Ausbildung von spezifisch angepaßten planktischen Populationen erlaubt. Zwischenzeitlich veröffentlichte Studien konnten jedoch von *aci*-Sequenztypen im Columbia River (Crump *et al.*, 1999), im Parker River (Crump *et al.*, 2004; Zwart *et al.*, 2002), im San Joaquin River (Stepanauskas *et al.*, 2003) und in der Weser (Selje und Simon, 2003) nachweisen. Weiterhin wurden die Genbanken meist nur von einem Probenahmezeitpunkt erstellt (Ausnahme: Schöhsee), d.h. eine Jahreszeiten abhängige Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft konnte so nicht berücksichtigt werden. Verschiedene Studien in den huminstoffreichen Seen Fuchskuhle (Burkert *et al.*, 2003) und Crystal bog (Newton *et al.*, 2004) sowie den eutrophen Masurischen Seen (siehe Kapitel 3.2) belegen jedoch einen signifikanten Anteil der Actinobakterien an der mikrobiellen Gemeinschaft im gesamten Jahresverlauf in diesen Habitaten.

Als Inokulum für die PCR wurden ganze und fixierte Zellen auf Polycarbonatfiltern verwendet. Es ist daher möglich, daß durch die Erhitzung während der PCR nicht die DNA aller Zellen freigesetzt wurde. Als Folge wäre eine Einschränkung der Diversität gegenüber der Ausgangsprobe denkbar. Eventuell läßt sich so auch die niedrige relative Häufigkeit von *aci*-Sequenztypen in den Genbanken erklären. Jedoch kann es bei einer DNA-Extraktion ebenfalls zu einer selektiven Lysis der Zellen (More *et al.*, 1994) kommen. Kleine Gram-positive Kokken erwiesen sich als besonders resistent gegenüber den üblichen Extraktionsprotokollen (More *et al.*, 1994). Außerdem kann es durch die verwendeten Reagenzien und Enzyme bei der DNA-Extraktion zu einer Kontamination des Ausgangsmaterials für die PCR kommen (Tanner *et al.*, 1998).

Für die Amplifikation der 16S rRNA-Gene wurden die weithin gebräuchlichen universellen Primer GM3 und GM4 verwendet. Allerdings ist auch hierbei eine Einschränkung der Diversität nicht auszuschließen (Baker *et al.*, 2003). Eine Minimierung dieses Artefakts hätte z.B. durch die Erstellung von Parallel-Genbanken mit anderen universellen Primern und verschiedenen Kombinationen von diesen erreicht werden können. Ein Beispiel für die Einschränkung der Diversität bei der Verwendung von spezifischen Primern lieferte eine Studie der Actinobakterien in terrestrischen und marinen Habitaten (Stach *et al.*, 2003): Die vorgestellten Primer erfaßten eine Vielzahl von Boden- und Süßwassersequenzen nicht.

Bei der PCR selbst kann es zu einer Verschiebung der Häufigkeit von einzelnen Sequenztypen im Verhältnis zur Gesamtpopulation kommen (Farrelly *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki und Giovannoni, 1996; v. Wintzingerode *et al.*, 1997). Dieser Effekt ist besonders bei hohen Zyklenzahlen ausgeprägt (Acinas *et al.*, 2004). In der vorliegenden

Arbeit waren hohe Zyklenzahlen (30 bis 35) notwendig, was wiederum zu einer Einschränkung der Diversität in den Genbanken geführt haben könnte. Um dennoch diesen Effekt zu minimieren, wurden parallele PCR-Reaktionen vor der Klonierung vereinigt. Weiterhin können während der PCR drei Arten von Sequenz-Artefakten auftreten: (1) Fehler der Taq-Polymerase, (2) Chimären-Bildung und (3) Heteroduplex-Bildung. Alle drei Artefakte lassen sich im Idealfall durch vergleichende Sequenzanalyse identifizieren. Die Heteroduplex-Bildung kann durch die so genannte Rekonditionierungs-PCR minimiert werden (Thompson *et al.*, 2002).

**Screening-Verfahren.** Das verwendete Screening-Verfahren erwies sich als äußerst effektiv: Es konnten Actinobakterien-verwandte Sequenztypen zuverlässig in großen 16S rRNA-Genbanken identifiziert werden (siehe Abbildung 2 in Warnecke *et al.*, 2004). Trotzdem ermöglichten die relativ unstringenten PCR-Bedingungen die Identifizierung von Klonen mit Sequenzabweichungen zu den verwendeten Primern: Insgesamt besaßen >50% aller gewonnenen Sequenzen 1-2 Fehlpaarungen in der Zielregion der Primer. Diese Sequenztypen wären bei Verwendung der Primer als FISH-Sonden und bei optimalen Hybridisierungsbedingungen nicht detektiert worden. Dies hätte zu einer Unterschätzung der relativen Abundanzen an limnischen Actinobakterien geführt. Das eingesetzte Screening-Verfahren ermöglichte somit den Erhalt einer breiteren Diversität an Sequenztypen.

Eine PCR-basierte Methode hat den Vorteil, daß sich die Arbeitsabläufe bei Verwendung von Mikrotiterplatten automatisieren lassen. Bei zu erwartender niedriger Frequenz von positiven Klonen läßt sich die Probenzahl noch deutlich durch Vereinigen von ganzen Mikrotiterplatten, oder einzelnen Reihen oder Spalten verringern. Diese Strategie hat sich bei der Auswertung von Metagenom-Genbanken bereits bewährt (Mußmann und Meyerdierks, pers. Mitteilung).

Parallel wurde dieses PCR-Screening-Verfahren zum Auffinden von *Bacterioidetes*-verwandten Sequenztypen in 16S rRNA-Genbanken von Süßwasser-Habitaten und der Küsten-nahen Nordsee eingesetzt. Hierfür wurden die ebenfalls von FISH-Sonden abgeleiteten Primer CF319a-F und CF563-R verwendet. Die Identifizierung von positiven Klonen erwies sich jedoch als deutlich schwieriger: Je nach PCR-Bedingungen wurden falsch-positive und falsch-negative Klone ermittelt. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist also entscheidend von der Qualität der verwendeten Primer abhängig.

Als alternative Screening-Methoden für Genbanken wäre z.B. die Terminale Restriktionsfragmentlängenanalyse (T-RFLP) anwendbar (Moeseneder *et al.*, 2001). Diese Methode erlaubt jedoch nur eine Identifizierung von identischen Klonen und eignet sich somit zum De-replizieren von Genbanken. Für eine gerichtete Identifizierung von bestimmten Sequenztypen kann das so genannte Koloniehybridisierungsverfahren eingesetzt werden. Hierbei werden die Kolonien der Klone auf eine Membran übertragen, lysiert und mit einer enzymatisch- oder radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert (Roche, Mannheim). Eine direkte Partialsequen-

zierung aller Klone ermöglicht die sicherste phylogenetische Identifizierung, ist aber auch mit hohen Kosten und Arbeitsaufwand (Sequenzanalyse) verbunden.

**Phylogenetische Analyse.** Die ribosomalen RNAs eignen sich vorzüglich für phylogenetische Analysen: Sie sind in allen Organismen vorhanden, funktionell konserviert und besitzen einen relativ hohen Informationsgehalt (Embley und Stackebrandt, 1994; Ludwig und Klenk, 2001). Trotzdem reflektieren rRNA-basierte Phylogenien in erster Linie die Evolution des Moleküls und nicht zwangsläufig die des gesamten Organismus (Doolittle, 1999; Embley und Stackebrandt, 1994).

Die eingesetzten phylogenetischen Methoden waren umfassend. Das Software-Paket ARB ermöglicht eine hohe Qualität der vergleichenden Sequenzanalyse, da es die Sekundärstruktur des 16S rRNA-Moleküls berücksichtigt (Ludwig *et al.*, 2004). Für die vorliegende Studie wurden nur Sequenzen mit mehr als 1400 Nukleotiden herangezogen; vorangegangene phylogenetische Untersuchungen der LAB beschränkten sich auf 416 (Crump *et al.*, 1999) bzw. 304 Nukleotide (Zwart *et al.*, 2002). Es wurden Algorithmen mit verschiedenen evolutiven Annahmen eingesetzt, um so die Stabilität der erhaltenen Phylogenie zu testen (Felsenstein, 1985). Eine umfassende und stabile Phylogenie ist für die Auswahl von Zielgruppen für diskriminatorische Oligonukleotide notwendig. Trotzdem bleibt die Analyse auf die bekannten Sequenzinformationen beschränkt, d.h. mit dem Auftreten von neuen Sequenztypen kann sich die Topologie des Konsensus-Stammbaumes theoretisch verändern.



## 2.2 Abundanzen und Populationsstruktur

In Kapitel 2.1 wurden Umweltsequenzdaten der limnischen Actinobakterien gesammelt und phylogenetisch analysiert. Durch die verschiedenen Limitierungen PCR-generierter 16S rRNA-Diversität ist jedoch ein Rückschluß auf die natürlichen Abundanzen der Sequenztypen in den untersuchten Seen nicht möglich (Farrelly *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki und Giovannoni, 1996). Die Verbreitung und Abundanzen der einzelnen Sequenzgruppen in ausgewählten Süßwasser-Habitaten sollte im folgenden Kapitel durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) aufgeklärt werden. Zu diesem Ziel sollten spezifische Sonden für die Sequenzgruppen *acl* bis *aclV* durch bioinformatische Methoden entwickelt und durch Austesten der Hybridisierungsbedingungen etabliert werden. Vor allem sollte die Frage untersucht werden, ob die häufig aufgefundenen Sequenztypen der Sequenzgruppen *acl* (21 Sequenzen; entspricht *hgcl*-Sequenzgruppe, Glöckner *et al.*, 2000) und *aclII* (23 Sequenzen; u.a. *Luna*-Sequenzgruppe, Hahn *et al.*, 2003) einen wesentlichen Bestandteil des Bakterioplanktons im Süßwasser darstellen.

**Sonden-Design.** Für die Entwicklung spezifischer Sonden wurden nur nahezu vollständige 16S rRNA-Sequenzen (>1400 nt) herangezogen, um einen möglichst hohen Informationsgehalt zu nutzen. Für die Computer-unterstützte Suche nach diskriminatorischen Oligonukleotiden wurden das Linux-basierte Software-Paket ARB ([www.arb-home.de](http://www.arb-home.de); Ludwig *et al.*, 2004) und das Microsoft Windows-basierte Programm Primrose (Ashelford *et al.*, 2002) eingesetzt. Eine Sonde (*Acl-840c*) wurde jedoch auch durch manuellen Vergleich von verwandten Sequenzen ermittelt. ARB verwendet für das Sonden-Design (Funktion: *Probe\_Design*) den so genannten *PT\_Server*. Dies ist ein spezielles Format der Sequenzdatenbank und ermöglicht die schnelle Suche von Oligonukleotiden. Die ermittelten Sonden werden nach ihren theoretischen Eigenschaften (z.B. Schmelztemperatur, Abdeckung der Zielgruppe, Zugänglichkeit der Zielregion) klassifiziert und lassen sich jeweils gegen die Gesamtdatenbank abgleichen (Funktion: *Probe\_Match*). Die Entwicklung von Sonden mit verschiedenen Nukleotiden an einer Position der Sonde (*wobble*) wird von ARB nicht unterstützt; demhingegen ermöglicht Primrose bis zu zwei dieser variablen Positionen.

Primrose vermag jedoch nur eine begrenzte Datenmenge zu verarbeiten. Aus diesem Grund wurden zum einen ca. 1000 bakterielle Sequenzen als Basisdatenbank und zum anderen 10 bis 50 Sequenzen der jeweiligen Zielgruppe aus ARB exportiert (unter Beibehaltung des Sequenz-Alignments). Das Programm errechnet anschließend eine Konsensussequenz der Zielgruppe und vergleicht diese gegen die Basisdatenbank. Die ermittelten Sonden-Sequenzen wurden daraufhin ebenfalls gegen den Gesamtdatensatz von ARB abgeglichen. Die Erstellung von Oligonukleotiden mit variablen Positionen stellt zwar theoretisch einen Vorteil von Primrose dar, war in Bezug auf deren Anwendung als FISH-Sonden eher weniger geeignet, da eine hohe Auflösung nahe verwandter phylogenetischer Popula-

tionen der limnischen Actinobakterien angestrebt wurde. Außer dem Spezifitätsabgleich gegen die ARB-Datenbank wurden alle Sondensequenzen auch einer BLAST-Suche (<http://ngfnblast.gbf.de/blast.html>) unterzogen und die theoretische Zugänglichkeit ihrer 16S rRNA-Zielregion (Behrens *et al.*, 2003) untersucht. In einigen Fällen erwies sich die zusätzliche Entwicklung von so genannten Helfer-Oligonukleotiden als notwendig. Diese unmarkierten Helfer binden benachbart zu den eigentlichen FISH-Sonden und helfen so die Zugänglichkeit der Zielregion zu erhöhen (Fuchs *et al.*, 2000). Beim Design dieser Helfer-Oligonukleotide ist zu beachten, daß diese mindestens die gleiche Zielgruppe der FISH-Sonde erfassen und eine höhere Schmelztemperatur als diese aufweisen.

**Bestimmung spezifischer Hybridisierungsbedingungen.** In der nächsten Phase der Etablierung von neuen FISH-Sonden mußten spezifische Hybridisierungsbedingungen ausgetestet werden. Im Idealfall hybridisiert die Sonde nur an die revers-komplementäre Sequenz der Zielgruppe, und bindet nicht an Sequenzen mit mindestens einem Nukleotid Sequenzabweichung. Allerdings können sich Sequenzunterschiede verschieden stark auf das Hybrid auswirken: Ein zentrale Fehlpaarung läßt sich z.B. einfacher diskriminieren als eine endständige Sequenzabweichung. Im Gegensatz dazu lassen sich in PCR-Primern 3'-endständige Fehlpaarungen am besten diskriminieren (Dieffenbach *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2001). Für die vorliegende Arbeit wurde ein FISH-Protokoll verwendet, bei dem stringent hybridisiert und unstringent nach der Hybridisierung gewaschen wird, wobei die Stringenz mithilfe der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer eingestellt wird (Pernthaler *et al.*, 2002; Sekar *et al.*, 2003). Da in der Umweltmikrobiologie meist keine Isolate der Zielgruppe zur Verfügung stehen, mußten Kultur-unabhängige Testverfahren entwickelt werden.

Die als **Clone-FISH** (Schramm *et al.*, 2002) beschriebene Methodik bedient sich der meist ohnehin vorhandenen 16S rRNA-Umweltgenbanken: Es werden Klone mit der Zielsequenz und solche mit Fehlpaarungen selektiert. Anschließend wird das 16S rRNA-Gen durch Induktion der RNA-Polymerase über einen Plasmid-kodierten Promoter transkribiert. Die so entstandenen Transkripte lassen sich mit rRNA-gerichteten Sonden hybridisieren (Schramm *et al.*, 2002). Allerdings ist zu beachten, daß keine Sonden, die auch an die rRNA der *E.coli*-Wirtszellen binden (z.B. die Sonde GAM42a, Manz *et al.*, 1992), getestet werden können. Außerdem war bekannt, daß sich die Wirtszellen in dem verwendeten System nicht einheitlich und reproduzierbar induzieren ließen, was wiederum die Auswertung der Hybridisierungen sehr erschwerte (D. Wöbken, Diplomarbeit). Aus diesem Grund wurden im Verlaufe der vorliegenden Arbeit mehrere LAB-Klone in ein hoch-effizientes Expressionssystem, den pBAD-Vektor der Firma Invitrogen (Karlsruhe) umklontiert. Dieses System wurde erfolgreich zur Einstellung von mRNA-Sonden eingesetzt (A. Pernthaler, MPI, persönl. Mitteilung), erwies sich in Bezug auf die Optimierung der FISH-Sonden für die Actinobakterien jedoch als ungeeignet.

Anschließend wurde versucht, ein an die **Microarray-Methodik** angelehntes Verfahren zum Einstellen der spezifischen Hybridisierungsbedingungen von neuen FISH-Sonden zu etablieren. Hierbei wird *in vitro*-transkribierte RNA von 16S rRNA-Klonen auf beschichteten Glasobjektträgern in einer definierten Anordnung immobilisiert (C. Würdemann und A. Ellrott, MPI, persönl. Mitteilung). Durch die verwendeten Instrumente (Microarray-Spotting-Roboter, Microarray-Reader) läßt sich eine hochparallele Versuchsanordnung realisieren: Neben einer Vielzahl von Replikaten eines Transkripts lassen sich auch eine Vielzahl von verschiedenen Transkripten analysieren. So ist es möglich, neben mehreren Klonen mit der entsprechenden Sonden-Zielsequenz auch eine Anzahl von Klonen mit unterschiedlich vielen Fehlpaarungen zur Zielsequenz einzusetzen. Außerdem lassen sich mehrere identische Arrays auf einem Objektträger anordnen und somit parallel mit verschiedenen Sonden oder – bei Verwendung entsprechender Kammern – bei unterschiedlichen Formamid-Konzentrationen hybridisieren. Für diese Versuche wurden Fluorochrom-markierte Sonden (CY5) und der RNA-Farbstoff RiboGreen (Molecular Probes, Leiden, NL) zur Quantifizierung der Transkriptmenge auf dem Objektträger eingesetzt. Während der Entwicklungsphase der Methode wurde eine Vielzahl von Parametern variiert (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Variierte Parameter zur Etablierung der Microarray-Methodik für das Einstellen von FISH-Sonden.

Parameter	Variationen
Immobilisierte Nukleinsäuren:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrahierte Gesamt-RNA von Kulturen</li> <li>- <i>in vitro</i>-transkribierte 16S rRNA von Klonen</li> <li>- (Ganze Zellen von Klonen)</li> </ul>
Konzentration der immobilisierten Nukleinsäuren:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 - 250 ng <math>\mu\text{l}^{-1}</math></li> </ul>
Konzentrationsbestimmung der immobilisierten Nukleinsäuren	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RiboGreen (Molecular Probes)</li> <li>- Hybridisierung mit zweiter Sonde (EUB)</li> <li>- Markierung der Nukleinsäuren bei der Transkription</li> </ul>
Markierung der Sonden:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CY3</li> <li>- CY5</li> </ul>
Hybridisierungstemperatur:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46°C</li> <li>- 35°C</li> </ul>
Hybridisierungsdauer:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 - 10 h</li> </ul>
Hybridisierungspuffer:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mit / ohne Blocking-Reagenz</li> </ul>
Waschpuffer:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Waschpuffer der Firma Corning (Wiesbaden)</li> <li>- Waschpuffer nach (Pernthaler <i>et al.</i>, 2001)</li> <li>- Phosphat-gepufferte Saline (PBS)</li> </ul>
Multikammer-Hybridisierungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 - 14 separate Hybridisierungskammern pro Objektträger</li> </ul>

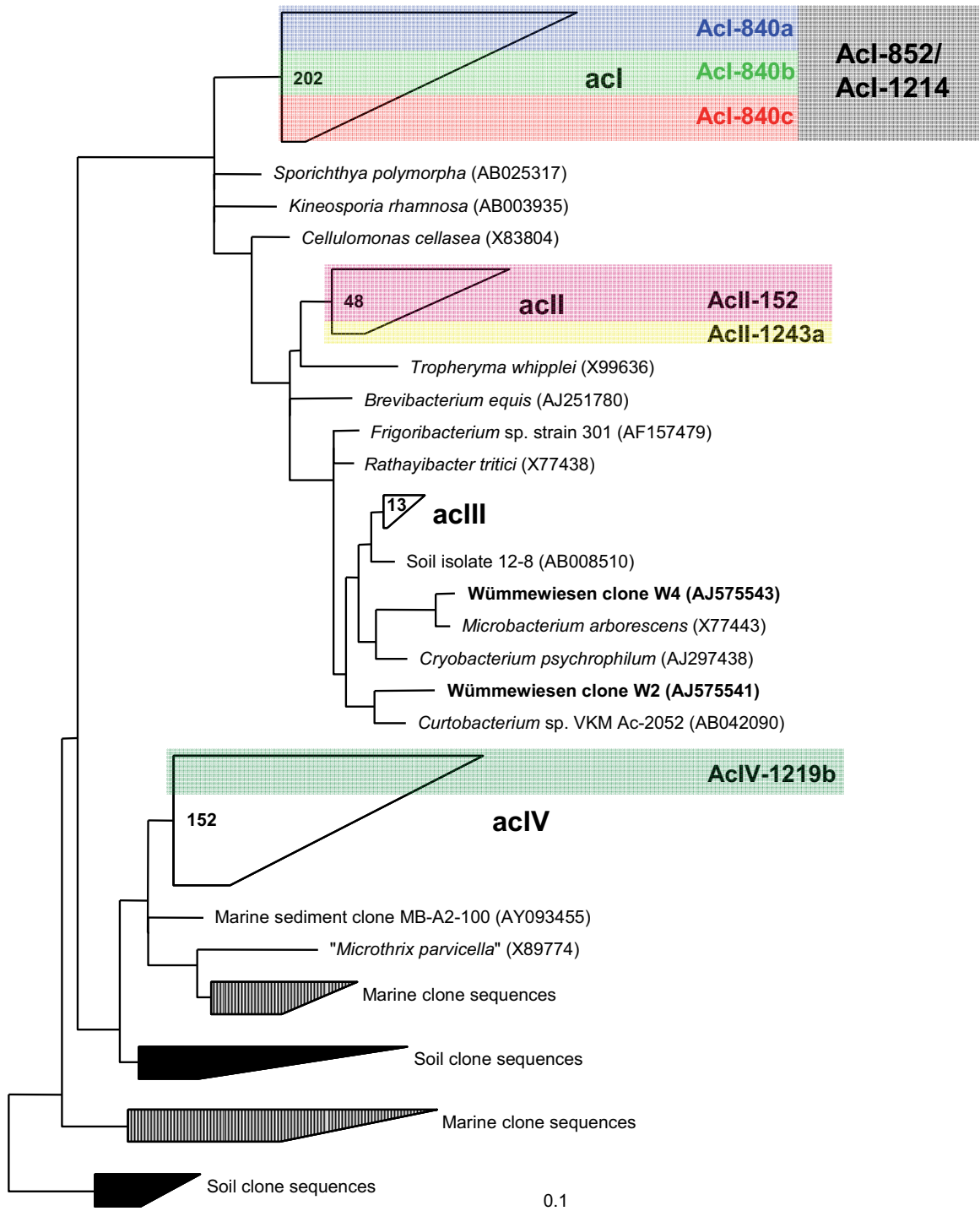
Beide Ansätze, Clone-FISH und die Microarray-Analyse von immobilisierten Transkripten, stellen ein künstliches System dar und sind nur bedingt mit den Bedingungen in den Zellen der Zielorganismen vergleichbar: In beiden Fällen wird ein klonierter DNA-Abschnitt transkribiert, dieses Transkript wird sich u.U. nicht wie die native rRNA dreidimensional falten und

die ribosomalen Proteine sind nicht vorhanden. Allerdings verursacht vermutlich die für die FISH-Analyse notwendige Fixierung von Mikroorganismen aus Umweltproben ebenfalls eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Ribosomen (Behrens *et al.*, 2003).

In einem alternativen und vereinfachten Ansatz wird eine Umweltprobe mit hoher Abundanz der Zielzellen parallel zu einer Kultur mit einer Fehlpaarung in der Zielsequenz bei aufsteigenden Formamidkonzentrationen hybridisiert (= Formamid-Reihe). Anhand der Auftragungen der hybridisierten Zellzahlen wird eine Formamidkonzentration ausgewählt, bei der die Fehlpaarung der Kultur diskriminiert werden kann (siehe Abbildung 6).

In einem anderen Ansatz wird eine Sonde mit einer Fehlpaarung zur Zielsequenz als Kontrolle eingesetzt. Anschließend wird die Formamid-Konzentration ausgewählt, bei der die zu etablierende Sonde hybridisiert, die Kontroll-Sonde aber nicht mehr binden kann. Allerdings ist hierbei zu beachten, daß sich die Hybridstabilität unterscheidet, abhängig davon, ob es sich um eine RNA- oder DNA-Fehlpaarung handelt (Stahl und Amann, 1991).

**Ergebnisse.** Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 24 Sonden für FISH *in silico* entwickelt. Davon wurden 11 Sonden mit dem Software-Paket ARB (Ludwig *et al.*, 2004), 12 mit dem Programm Primrose (Ashelford *et al.*, 2002) und eine Sonde manuell entworfen. Für insgesamt 5 Sonden (ARB: 2, Primrose: 2 und manuell: 1) konnten spezifische Hybridisierungsbedingungen realisiert werden (Abbildung 5 und Tabelle 9); die Hybridisierungsbedingungen für 3 weitere Sonden (ARB: 1 und Primrose: 2) konnten nur vorläufig etabliert werden. Aufgrund der relativ geringen Anzahl von Sonden und der Beschränkung auf eine Zielgruppe kann hier keine abschließende Bewertung über die Qualität und Unterschiede dieser beiden Programme vorgenommen werden. Es soll jedoch angemerkt werden, daß die Entwicklung von neuen Sonden für die gesamte *acI*-Sequenzgruppe nur mit dem Programm Primrose gelang (siehe unten: *AcI*-852 und *AcI*-1214). Die Zielsequenzen der Sonden *AcI*-852 und *AcI*-840a, *AcI*-840b und *AcI*-840c befanden sich in einem relativ unzugänglichen Bereich der 16S rRNA (Helligkeitsklasse: IV bis V nach Behrens *et al.*, 2003). Diese Sonden erforderten den Einsatz von Helfer-Oligonukleotiden, die manuell entworfen wurden. Ohne diese Helfer konnten selbst mit CARD-FISH keine auswertbaren Signale erreicht werden.



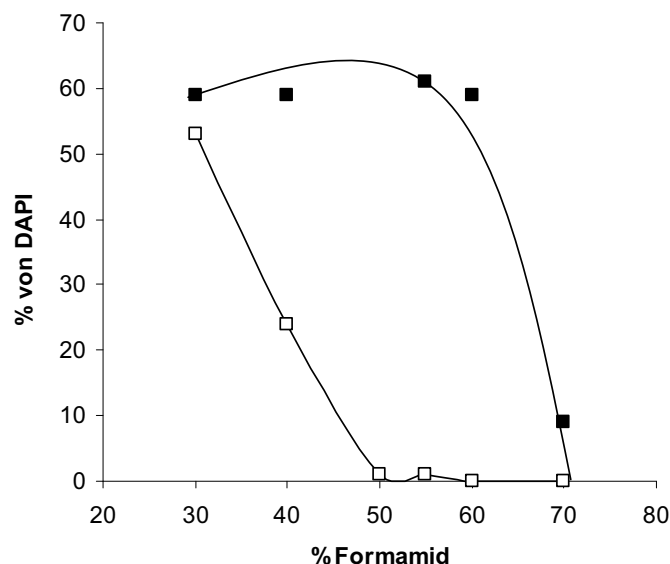
**Abbildung 5:** Konsensus-16S rRNA-Stammbaum der Actinobakterien und schematische Darstellung der Zielgruppen der entwickelten FISH-Sonden

**Tabelle 9:** Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte FISH-Sonden.

<b>Sonde</b>	<b>5'-3'- Sequenz</b>	<b>5'- Position<sup>1</sup></b>	<b>BC<sup>2</sup></b>	<b>Ziel- gruppe</b>	<b>Software</b>	<b>Einstellung</b>	<b>FA<sup>3</sup> [%]</b>	<b>[% DAPI]</b>	<b>Maximal-Abundanz</b>	<b>Datum</b>
Acl-852	AAT GCG TTA GCT GCG TCG CA	852	IV	acl	Primrose	Umweltprobe und Kultur ( <i>Actinoplanes</i> )	55	62	Schwarzsee ob Sölden	20.07.03
Acl-852-H1 <sup>4</sup>	AAA CCG TGG AAG GTY CSC ACA ACTAG	826					55			
Acl-852-H2 <sup>4</sup>	TCC CCA GGC GGG GCR CTT	872					55			
Acl-1214	CAT GCG TGC AGC CCA AGA CA	1214	II	acl	Primrose	Microarray-Analyse von Transkripten, Vergleich zu Acl-852	60		Schwarzsee ob Sölden	20.07.03
Acl-840a	TCG CAC AAA CCG TGG AAG	840	V	sub-acl	ARB	Umweltprobe, vergleichend mit Acl-840b+Acl-840c	30	23	Oberer Plendersee	18.07.03
Acl-840b	TCG CAG AAA CCG TGG AAG	840	V	sub-acl	ARB	Umweltprobe, vergleichend mit Acl-840a+Acl-840c	30	54	Schwarzsee ob Sölden	20.07.03
Acl-840c	TCG CAG AGA CCG TGG AAG	840	V	sub-acl	manuell	Umweltprobe, vergleichend mit Acl-840a+Acl-840b	30	20	Roffelsee	16.07.03
Acl-840-H1 <sup>4,5</sup>	CTA GYG CCC AYC GTT TAC GG	810					30			
Acl-840-H2 <sup>4,5</sup>	GTT CSC ACA ACT AGY GCC CA	820					30			
Acl-840-H3 <sup>4,5</sup>	GGG GCR CTT AAT GCG TTA GCT G	859					30			
Acl-152	GCT ACA GTT TCC CGC AGT	152	I	sub-acl	ARB	Umweltprobe	20	1	Fuchskühle NO-Becken	11.11.03
Acl-1243a	ATT GCA GCC CTC TGT ATC GG	1243	II	acl-D	Primrose	Umweltprobe	55	9	Dargin	Frühjahr 03
Acl-1219b	TAG CGT GTT TGC AGC CCT	1219	II	acIV-A+B	Primrose	Umweltprobe	40	5	Dargin	Herbst 03

<sup>1</sup> Position nach Brosius *et al.*, 1981; <sup>2</sup> Zielsequenzzugänglichkeit (Brightness class) nach Behrens *et al.*, 2003; <sup>3</sup> Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bei Hybridisierung bei 35°C (CARD-FISH); <sup>4</sup> Helfer-Sonden; <sup>5</sup> wurden von Glöckner *et al.* entwickelt (Glöckner *et al.*, 2000).

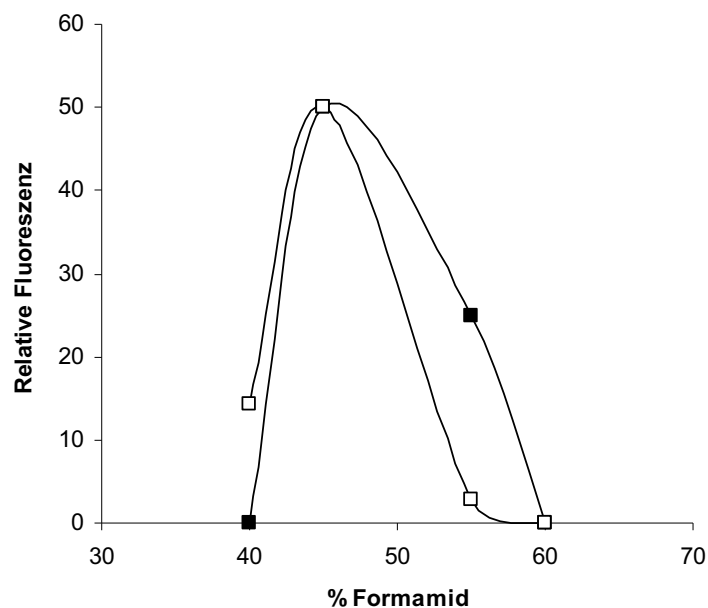
Die Sonden Acl-852 und Acl-1214 detektieren die gesamte acl-Sequenzgruppe. Aus Mangel an verfügbaren Kulturen mit den entsprechenden Zielsequenzen wurden im Falle der Acl-852 Hybridisierungen parallel in einer Umweltprobe (Schwarzsee ob Sölden) und einer Reinkultur mit einer zentralen Fehlpaarung (*Actinoplanes philippinensis* Stamm DSM 43019) durchgeführt. Diese Sequenzabweichung war charakteristisch für alle weiteren Fälle mit einer einzelnen Fehlpaarung in der Datenbank; alle anderen 16S rRNA-Sequenzen waren durch mindestens zwei Nukleotide Unterschied gekennzeichnet. Bei ansteigender Formamid-Konzentration (30-70%) wurden die Zellen der *Actinoplanes*-Kultur bereits bei 50% Formamid nicht mehr hybridisiert, wohingegen die Umweltprobe einen gleichbleibenden Anteil von hybridisierten Zellen bis zu 60% Formamid zeigte (Abbildung 6). Allerdings wurde das Fluoreszenz-Signal bei 60% Formamid deutlich schwächer, so daß diese Sonde im folgenden bei 55% Formamid eingesetzt wurde.



**Abbildung 6:** Hybridisierung der Sonde Acl-852 bei ansteigender Formamidkonzentration: Geschlossene Quadrate, Umweltprobe (Schwarzsee ob Sölden); Offene Quadrate, *A. philippinensis*-Kultur mit einer zentralen Fehlpaarung.

Die Sonde Acl-852 wies eine gute Abdeckung der Zielgruppe auf (79%), wobei fast ausschließlich kurze und Sequenzen niedriger Qualität, d.h. mit unbestimmten Nukleotiden nicht erfaßt wurden. Demgegenüber zeichnete sich die Sonde Acl-1214 durch eine höhere Abdeckung der Zielgruppe (88%), jedoch auch durch erfaßte Organismen außerhalb der Zielgruppe aus. Es erscheint allerdings unwahrscheinlich, phytopathogene Mikroorganismen wie Vertreter der Gattung *Cryptosporangium* in aquatischen Habitaten anzutreffen. Andererseits wurden von Venter *et al.* die komplette Genomsequenz von *Burkholderia*-Sp. aus dem marinen Pelagial gewonnen (Venter *et al.*, 2004), obwohl allgemein angenommen wurde, daß dieser Organismus terrestrische Habitate besiedelt.

Alle sonstigen Sequenzen der ARB-Datenbank wiesen mindestens eine einzelne Fehlpaarung in zentraler Position der Zielsequenz für die Sonde Acl-1214 auf. Die spezifischen Hybridisierungsbedingungen dieser Sonde wurden mit der oben-beschriebenen Microarray-Methode ausgetestet. Die höchste Differenz der Signalintensitäten zwischen Transkripten mit der Zielsequenz und solchen mit einfacher Fehlpaarung wurde bei 55% Formamid festgestellt (Abbildung 7). Die Auszählung von Umweltproben (siehe unten: Feldstudie Alpenseen) lieferte vergleichbare Ergebnisse mit den Sonden Acl-852 und Acl-1214; die Abweichungen lagen innerhalb der normalen Fehlergrenzen von FISH-Zählungen (meist <5%).



**Abbildung 7:** Hybridisierung der Sonde Acl-1214 bei ansteigender Formamidkonzentration an Klonsequenz-Transkripte: Geschlossene Quadrate, Klon NZZ2 ohne Fehlpaarung; Offene Quadrate, Klon NO7 mit einer zentralen Fehlpaarung.

Die Microarray-Methodik konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur teilweise etabliert werden. Sowohl die reproduzierbare Hybridisierung von Transkripten bei gleichzeitiger Quantifizierung durch Gegenfärbung, als auch die Mehrkammer-Hybridisierung auf einem Objektträger bedürfen noch weiterer Optimierung. Dahingegen konnten Formamid-Reihen mit extrahierter RNA aus Zielsequenzkulturen und solchen mit einzelner Nukleotidabweichung reproduzierbar aufgenommen werden.

Die beiden Sonden Acl-840a und Acl-840b basieren auf der von Glöckner *et al.* entwickelten Sonde HG1-840 (Glöckner *et al.*, 2000). Diese Sonde wurde mit einem variablen Nukleotid (C oder G) in zentraler Position entworfen und deckte damit die damals bekannten Sequenztypen der acl- (bzw. hgcl-) Sequenzgruppe ab. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Sequenzvarianten Acl-840a und Acl-840b getrennt voneinander eingesetzt, um so eine höhere phylogenetische Auflösung zu erzielen. In Abbildung 8 ist der Konsensus-



Stammbaum der *acl*-Sequenzgruppe mit den jeweiligen Zielgruppen der *Acl*-840-Sonden dargestellt. Interessanterweise decken sich die Zielgruppen dieser Sonden nicht mit den postulierten Sequenzgruppen *acl*-A, *acl*-B oder *acl*-C. Die Sonde *Acl*-840b detektiert z.B. Sequenztypen aller drei Sequenzgruppen. Anfängliche FISH-Zählungen deuteten auf eine Diskrepanz zwischen den Abundanz der gesamten *acl*-Sequenzgruppe (Sonden *Acl*-852 und *Acl*-1214) und der Summe der Zählungen mit den Sonden *Acl*-840a und *Acl*-840b in einigen Habitaten hin. Es wurde deshalb und aufgrund einer manuellen Sequenzanalyse eine weitere Sonde entwickelt: *Acl*-840c. Diese Sonde bindet an die gleiche Region der 16S rRNA und unterscheidet sich von der Sonde *Acl*-840b wiederum nur in einer Nukleotid-Position (Tabelle 9). Eine erfolgreiche Diskriminierung einer einzelnen Fehlpaarung wurde bereits mit anderen Sondenpaaren nachgewiesen (z.B. *Bet42a* und *Gam42a*, (Manz *et al.*, 1992))

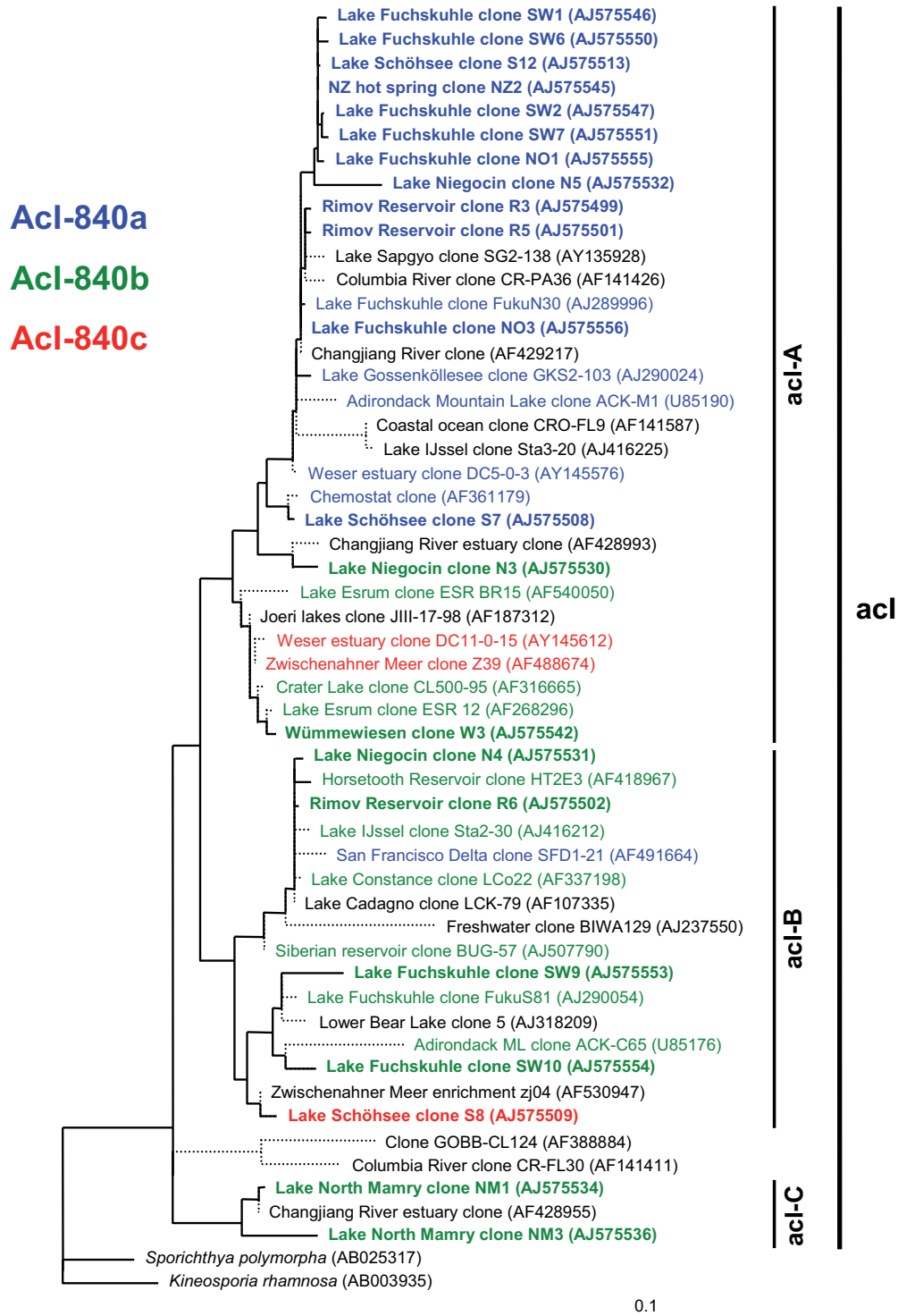
Es werden insgesamt 10 Sequenzen von dieser Sonde getroffen: 6 aus dem Weser-Estuar (Selje und Simon, 2003), 2 aus dem Zwischenahner Meer (Bruns *et al.*, 2003), eine Sequenz aus einem Sibirischen Stausee (Trusova und Gladyshev, 2002) und eine Sequenz aus dem Schöhsee (vorliegende Arbeit). Es handelt sich demnach höchstwahrscheinlich nicht um einen Sequenzierfehler, sondern um einen unterrepräsentierten Sequenztyp innerhalb der *acl*-Sequenzgruppe.

Es wurde damit ein Set von Sonden für die Sequenzgruppe *acl* entwickelt, die über eine gute Abdeckung und Auflösung der bekannten Sequenztypen verfügt: Die gesamte *acl*-Sequenzgruppe umfaßt 202 Teil- und Vollsequenzen, von denen nur 16 Sequenzen (mit Sequenzinformation im entsprechenden Bereich) nicht von einer der drei Sonden getroffen werden: Diese Sequenzen wurden vorwiegend aus dem Baikalsee (Glöckner *et al.*, 2000), den Adirondack-Seen (Hiorns *et al.*, 1997) und dem Bodensee (Zwisler *et al.*, 2003) gewonnen und wiesen einen relativ hohen Anteil von undefinierten Basen auf. Es wird daher vermutet, daß es sich bei den Abweichungen um Sequenzierfehler oder PCR-Artefakte (z.B. Chimären) handelt.

Die Sonden *Acl*-840a, *Acl*-840b und *Acl*-840c treffen jeweils 14, 9 bzw. 1 Sequenz(en) mit mindestens 1400 Nukleotiden Länge innerhalb der *acl*-Sequenzgruppe, wobei die überwiegende Mehrzahl dieser langen Sequenzen (12, 8 bzw. 1) im Verlaufe der vorliegenden Arbeit gewonnen wurde (Warnecke *et al.*, 2004).

Alle *Acl*-840-Sonden wurden auf die Bedingungen der CARD-FISH (Hybridisierung bei 35°C, (Pernthaler *et al.*, 2002)) eingestellt; auch unter diesen Signal-verstärkenden Bedingungen waren die von Glöckner *et al.* entworfenen Helfer-Oligonukleotide (Glöckner *et al.*, 2000) notwendig. Bei einer Hybridisierung mit 30% Formamid im Hybridisierungspuffer erwiesen sich die drei Sonden als wechselseitige Kontrollmöglichkeit ihrer jeweiligen Spezifität: So wurden zum Beispiel mit der Sonde *Acl*-840b im Schwarzsee ob Sölden 54% des Bakterioplanktons angefärbt; die Zählungen mit *Acl*-840a ergab dahingegen nur 5%. Im Rotfelsen-see waren die *Acl*-840c-Sequenztypen dominant (20%), wohingegen mit den anderen beiden

Sonden nur 4 bzw. 1% der Gesamtpopulation hybridisierte (Abbildung 1B in (Warnecke *et al.*, 2004)). Aufgrund dieser unterschiedlichen Detektionsraten mit den 3 Sonden konnte eine unspezifische Hybridisierung ausgeschlossen werden. Die angewandten Hybridisierungsbedingungen (Formamid-Konzentrationen) sind in Tabelle 9 zusammengefasst.



**Abbildung 8:** Konsensus-16S rRNA-Stammbaum der acI-Sequenzgruppe und Zielgruppen der Sonden Acl-840a, Acl-840b und Acl-840c.

Die Sonden AcII-152 (acII-A, -B und -C-Sequenzgruppen), AcII-1243a (acII-D- oder Luna-Sequenzgruppe, siehe Hahn *et al.*, 2003) und AcIV-1219b (acIV-A und -B-Sequenzgruppen) wurden nur mithilfe von Umweltproben und einer Formamid-Reihe eingestellt. Aus Mangel an Kontrollen müssen diese Bedingungen und Ergebnisse als vorläufig angesehen werden.

**Abundanzen der LAB in verschiedenen Tiroler Gebirgsseen.** In einer Feldstudie wurden die Populationsstruktur und Verbreitung der limnischen Actinobakterien untersucht. Dazu wurden 10 alpine Seen unterschiedlicher Höhenlage ausgewählt, die schon seit längerer Zeit im Mittelpunkt limnologischer Forschung standen (Laurion *et al.*, 2000; Tartarotti *et al.*, 2001). Hochalpine Seen befinden sich oberhalb der Baumgrenze und unterscheiden sich in weiteren wesentlichen Charakteristika von Seen niedrigerer Höhenlage. Sie sind meist durch eine niedrige Wassertemperatur gekennzeichnet und bis zu  $\frac{3}{4}$  des Jahres mit einer Eisdecke bedeckt; daraus folgt eine kurze Wachstumsperiode. Der Nährstoffeintrag ist aufgrund der meist fehlenden Vegetation im Einzugsgebiet des Sees niedrig. Ein Untergrund aus kristallinem Gestein verursacht in der Regel einen relativ niedrigen pH-Wert, demhingegen ist das Wasser auf Kalk-haltigem Untergrund gut gepuffert (Laurion *et al.*, 2000; Sommaruga, 2001). Aus vorangegangenen Studien (Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001) war bekannt, daß die LAB hohe Abundanzen in derartigen Seen erreichen können. Durch die Beprobung von oligotrophen alpinen Seen (z.B. GKS und SOS) zusammen mit eutrophen Seen niedrigerer Höhenlage (z.B. PIB und ACH) sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der UV-B-Strahlung und den relativen Abundanzen der LAB untersucht werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß der hohe molare G+C-Gehalt der genomischen DNA der Actinobakterien eine höhere Resistenz gegenüber der DNA-schädigenden Wirkung der UV-B-Strahlung vermittelt und dementsprechend höhere relative Abundanzen in Seen mit größerer UV-B-Belastung ermöglicht.

Die ausgewählten Seen unterscheiden sich in ihrer Größe (0,4 – 680 ha), maximalen Tiefe (1 – 133 m), Höhenlage (913 – 2799 m), Wassereinzugsgebiet (offenes Geröll oder Wald), Gestein und anderen Parametern. Die Probennahme erfolgte im Juli 2003. Von 7 der 10 Seen wurde nur Oberflächenwasser beprobt und von den restlichen drei Seen ein Tiefenprofil an Proben aufgenommen: Schwarzsee ob Sölden (2 Schichten, 10 m-Abstufung), Gosenköllesee (5 Schichten, 2 m-Abstufung) und Piburgersee (9 Schichten, 3 m-Abstufung). Zu den einzelnen Wasserproben wurden folgende Daten aufgenommen: Temperatur, pH, Leitfähigkeit und Alkalinität, Chlorophyll a- und Phaeophytin-Konzentration, sowie die Konzentrationen von: gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC), gelöstem Stickstoff, Ammonium, Kalzium, Magnesium, Natrium, Kalium, Sulfat, Nitrat, Chlorid, gelösten Phosphaten, sowie Silizium. Außerdem wurden Daten zur UV-Licht-Durchdringung der Wassersäule aufgenommen - die Absorption und der Attenuationskoeffizient  $K_d$  bei 320 nm (UV-B). Für die FISH-Analysen wurden Wasserproben mit Ethanol fixiert und die Filter bei -20°C gelagert (Sekar *et*

al., 2003). Außerdem wurden durch ein Bromdeoxyuridin-Inkorporierungsexperiment die DNA-synthetisierenden Populationen identifiziert (siehe Kapitel 3.3).

Für die FISH-Analysen wurden zusätzlich zu den Actinobakterien-spezifischen Sonden (HGC69a, Acl-852, Acl-1214, Acl-840a, Acl-840b, Acl-840c, AclI-152, AclI-1243a und AclV-1219b; Tabelle 9) noch die in Tabelle 11 aufgelisteten Sonden eingesetzt. Die Sonde EUBI-III diente als Kontrolle der Hybridisierungseffizienz und die Sonden Bet42a, Bet2-870 und R-BT065 detektieren eine weitere wichtige Bakterien-Gruppe im Süßwasserplankton (Beta-proteobakterien, bzw. Sequenzgruppen innerhalb der Betaproteobakterien).

**Tabelle 11:** Zusätzlich eingesetzte FISH-Sonden.

Sonde	5'-3'-Sequenz	Zielgruppe	Referenz
EUBI-III	GCW GCC WCC CGT AGG WGT	alle Bakterien	Daims <i>et al.</i> , 1999
Bet42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	alle Betaproteobakterien	Manz <i>et al.</i> , 1992
R-BT065	GTT GCC CCC TCT ACC GTT	beta I-Sequenzgruppe*	Simek <i>et al.</i> , 2001
Bet2-870	CCC AGG CGG CTG ACT TCA	Polynucleobacter-Sequenzgruppe, beta II-Sequenzgruppe*	Burkert <i>et al.</i> , 2003

\* wie von Glöckner *et al.*, 2000 vorgeschlagen.

Die Detektionsrate (EUBI-III) betrug in den Voralpenseen 52% (PIB) bis 95% (MPL, siehe Tabelle 1 in (Warnecke *et al.*, 2004)); es wurden signifikant mehr Bakterien in den oligotrophen und höher-gelegenen Seen detektiert ( $p < 0,05$ ). Der Anteil an Bakterien, die weder zu den Actinobakterien noch zu den Betaproteobakterien gehörten (EUBI-III minus HGC69a minus Bet42a), lag zwischen 7% (z.B. OPL) und 79% (MPL). Diese beiden Seen liegen nur wenige Hundert Meter voneinander entfernt, unterschieden sich jedoch auch in weiteren Parametern (Transparenz, Chlorophyll a-Konzentration) und FISH-Zählungen. Es wurden zwischen 3% (PIB) und 38% (SEE) Betaproteobakterien mit der allgemeinen Sonde Bet42a detektiert, jedoch nur relativ niedrige Abundanzen mit den spezifischeren Sonden Bet2-870 (0-8%) und R-BT065 (0-14%).

Mit der allgemeinen actinobakteriellen Sonde HGC69a wurde eine weite Spannweite von 3% (MPL) bis zu 58% (SOS) gemessen, wobei die meisten Proben Werte von 20-30% aufwiesen. Mit den verbleibenden Sonden sollten die LAB in Subpopulationen aufgelöst werden. Der Anteil von Vertretern der acII- und acIV-A und -B-Sequenzgruppen (AclI-152, AclI-1243a und AclV-1219b) war in allen untersuchten Proben niedrig (0-1%). Es kann also geschlossen werden, daß die kultivierten Ultramikrobakterien der Luna-Sequenzgruppe (Hahn *et al.*, 2003; entspricht acII-D, Warnecke *et al.*, 2004) in den Alpenseen nicht abundant sind.

Der Anteil der acI-Vertreter an der Gesamtzahl der Actinobakterien lag in wenigen Fällen bei ca. 70% und häufig bei ca. 100% mit einem Durchschnitt aller Proben von ca. 90% (Abbildung 1A in Warnecke *et al.*, 2004). Das heißt, diese Sequenztypen bilden mit Abstand die dominante Fraktion innerhalb der LAB. Die Sonden Acl-852 und Acl-1214 detektieren jeweils

identische Zielgruppen (gesamte *acl*-Population). Die Abweichungen dieser beiden Datensätze betragen 0-5% mit einem Durchschnitt von 3%.

Mit den Sonden *Acl*-840a, *Acl*-840b und *Acl*-840c konnte eine weitere Aufgliederung der LAB in Sub-Populationen erreicht werden. Der absolute Anteil betrug <1-23% (*Acl*-840a), <1-54% (*Acl*-840b) und <1-20% (*Acl*-840c). Einige Seen wiesen große *Acl*-840a-Populationen auf (GKS, OPL), wohingegen die Actinobakterien im Schwarzsee ob Sölden sehr stark von *Acl*-840b-Sequenztypen und im Rotfelssee und Drachensee von *Acl*-840c-Vertretern dominiert wurde. Der Piburgersee war durch ähnlich großen Anteil von *Acl*-840a (6%), *Acl*-840b (10%) und *Acl*-840c-Sequenztypen (5%) gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der FISH-Zählungen mit der Sonde *Acl*-852 und der Summe der Sonden *Acl*-840a + *Acl*-840b + *Acl*-840c weist eine Differenz von <1-20% auf. Es kann also spekuliert werden, daß eine weitere und ebenso abundante Sequenzgruppe bisher nicht in den Genbanken vertreten ist. Eine erneute Etablierung von 16S rRNA-Genbanken von diesen spezifischen Habitaten (z.B. ROT, GEI, DRA, SEE) in Verbindung mit abgewandelten Methoden (DNA-Extraktion, andere Primer) könnte zum Auffinden dieser Sequenztypen führen.

Im Tiefenprofil des Gossenkölleesees nehmen LAB und Betaproteobakterien tendenziell zu, wohingegen die LAB in den tiefen Schichten des Piburgersees tendenziell abnehmen.

**Zusammenhang zwischen LAB-Abundanzen und UV-Strahlung?** Alpine Seen sind einer hohen Einstrahlung von Licht im ultravioletten Bereich (UV) des Spektrums ausgesetzt. Die hohe Belastung des Ökosystems durch UV-Einstrahlung ergibt sich aus der Höhenlage (ca. 19% Strahlungsanstieg je 1000 Höhenmeter) und dem meist sehr transparentem Wasser dieser Seen (Sommaruga, 2001). Hinzu kommt der Anstieg der UV-Strahlung infolge der Zerstörung der schützenden Ozonschicht in der Stratosphäre. Weiterhin bestehen starke saisonale Unterschiede der Lichtbedingungen im See aufgrund der Schnee- und Eisdecke im Winter. Durch den globalen Treibhauseffekt und die einhergehende Erwärmung kann es zu einer Verkürzung der Eisperiode und damit ebenfalls zu einer Erhöhung der UV-Einstrahlung kommen (Sommaruga, 2001). In Flachlandseen läßt sich die UV-Durchdringung der Wassersäule recht gut anhand der Konzentration von gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) modellieren. In alpinen Seen spielt hingegen auch das Phytoplankton eine wichtige Rolle bei der Abschätzung der UV-Durchdringung (Laurion *et al.*, 2000).

UV-Strahlung der Wellenlänge 280-320 nm (UV-B) kann zu einer direkten Schädigung der DNA führen. Meist kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen benachbarten Thymin-Basen (Lyons *et al.*, 1998). Die so entstandenen Thymin-Dimere lassen sich durch eine Antikörperreaktion nachweisen und quantifizieren (Mitchel *et al.*, 1985). Weiterhin ist bekannt, daß das Sonnenlicht auch auf das gelöste organische Material im Wasser einwirkt und dadurch dessen Abbaubarkeit fördert (Wetzel *et al.*, 1995). Bei diesen photochemischen Reaktionen kann es außerdem zur Bildung von hochreaktiven Sauerstoff-Verbindungen kommen, welche sich toxisch auf verschiedene Organismen auswirken (Xenopoulos und

Bird, 1997). Die aquatischen Organismen haben verschiedene Strategien entwickelt, um sich vor UV-Strahlungsschädigung zu schützen: Einige Gruppen produzieren absorbierende Verbindungen wie Melanin, Karotenoide oder Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (Tartarotti *et al.*, 2001). Heterotrophe Bakterien zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung: Nach kurzzeitiger Inkubation wurde eine stark erniedrigte Aktivität (ca. 30% der Leucin-Inkorporierung) gemessen (Sommaruga *et al.*, 1997).

Die erfaßten wasserchemischen Daten dienten der Abschätzung der UV-Durchdringung und deren Ursachen. Dabei erzielten die aufgrund der DOC-Konzentration berechneten Werte für den UV-Attenuierungskoeffizienten  $K_d320$  (Laurion *et al.*, 2000) sehr hohe Übereinstimmungen mit den tatsächlich gemessenen Werten der Seen GKS, PIB und ACH.

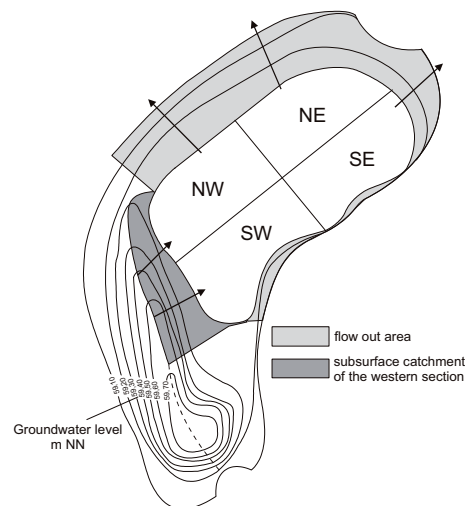
Die durch FISH ermittelten Abundanzen der einzelnen Bakteriengruppen wurden mit anderen gemessenen Parametern verglichen (Spearman-Rangsummen-Korrelation). Dabei konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen den relativen Abundanzen der *acl*-Sequenzgruppe (Sonde *Acl*-852) und dem modellierten  $K_d320$ -Wert festgestellt werden ( $r_s=0,64$ ;  $p < 0,05$ ). Dies bedeutet, die *acl*-Vertreter waren abundanter in Seen mit einer hohen UV-Einstrahlung. Es konnten sogar 73% der Variabilität dieser beiden Parameter statistisch erklärt werden, wenn die Werte der beiden Seen unterhalb der Baumgrenze (PIB und ACH) unberücksichtigt blieben. Eine weitere negative Korrelation ( $r^2=0,69$ ) ergab sich zwischen den relativen Abundanzen der *acl*-Vertreter und dem Quotienten aus Absorption bei 320 nm ( $a_{320}$ ) und der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC). Dieser Quotient ist ein Ausdruck für die UV-relevante Färbung des Wassers aufgrund der gelösten Kohlenstoffverbindungen.

Es konnten keine Korrelationen zwischen den wasserchemischen Parametern und den Abundanzen der *acl*-Subpopulationen (Sonden *Acl*-840a, *Acl*-840b und *Acl*-840c) festgestellt werden.

#### **LAB-Abundanzen in anderen Habitaten.**

Die **Große Fuchskuhle** ist ein huminstoffreiches Kleingewässer und ist seit den Jahren 1986 und 1990 als Experimentalgewässer in zwei bzw. vier Kompartimente unterteilt (Abbildung 9). Durch die Kompartimentierung hat sich der Zustand dieses Ökosystems auf verschiedenen Ebenen nachhaltig verändert. So wurden die Westbecken in ihrer Wasserchemie 1998 stärker durch das angrenzende Moor beeinflusst als die Ostbecken (Sachse *et al.*, 2001). Besonders deutlich wurde dies an den Unterschieden in der Zusammensetzung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) sichtbar. Die durch den Oberflächenabfluss des Moores stärker beeinflussten Westteile zeichneten sich durch einen erhöhten Gehalt an Huminstoffen (bis zu 58% des DOCs) aus, während ihr Anteil in den östlichen Teilen deutlich geringer war (bis zu 40% des DOC). Dagegen waren in den Ostteilen labile Polysaccharide (vermutlich aus der Primärproduktion) deutlich erhöht (bis zu 35%) (Sachse *et al.*, 2001). Die Fuchskuhle hat sich durch die Kompartimentierung innerhalb weniger Jahre ohne jegliche

Veränderung ihres Einzugsgebietes und damit des äußeren Nährstoffeintrages von einer oligotrophen Ausgangslage zu einem eutrophen Zustand hinentwickelt. Durch die unterschiedlichen Nahrungskettengefüge der westlichen und östlichen Seeteile ergeben sich u.U. sehr unterschiedliche Lebensbedingungen für das aerobe heterotrophe Bakterioplankton (Simek *et al.*, 1998). So haben sich - höchstwahrscheinlich auch aufgrund der erhöhten Primärproduktion die Zellzahl und die Biomasse, die heterotrophe Aktivität, sowie die extrazelluläre Enzymaktivität heterotropher Bakterien stark erhöht (Bittl und Babenzien, 1996).



**Abbildung 9:** Untersuchungsgebiet Große Fuchskuhle mit Darstellung der Kompartimentierung und Zu- und Abflussareale. NE, Nordostbecken; SE, Südostbecken; SW, Südwestbecken; NW, Nordwestbecken.

In der huminstoffreichen Fuchskuhle wurden wiederholt Proben zur FISH-Analyse genommen. In Tabelle 11 wurden die Ergebnisse für die Probennahme am 11.11.2003 zusammengefaßt. Das Südwest-Becken wurde von Vertretern der *aci*-Sequenzgruppe (*Aci*-852 und *Aci*-1214) klar dominiert. Wiederum wurden mit der Sonde *Aci*-840b die Mehrzahl der *aci*-Vertreter detektiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde in dem alpinen Schwarzsee ob Sölden erzielt (siehe oben), wobei es aber nahelegt, daß es sich in diesen beiden Fällen um ökologisch unterschiedlich adaptierte LAB handeln muß. Im Plankton der Fuchskuhle spielt die UV-B-Einstrahlung aufgrund der Wasserfarbe (Huminstoff-Gehalt) und der schattigen Lage im Flachland vermutlich keine große Rolle. Es könnte sich also um Organismen mit identischer oder sehr-ähnlicher 16S rRNA-Sequenz, aber unterschiedlichen ökologischen und/oder physiologischen Eigenschaften handeln. Zum Beispiel zeigten 11 *Brevundimonas alba*-Isolate mit nahezu identischen 16S rRNA-Sequenzen deutlich verschiedene Substratverwertungsmuster, was als Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen gewertet wurde (Jaspers und Overmann, 2004).

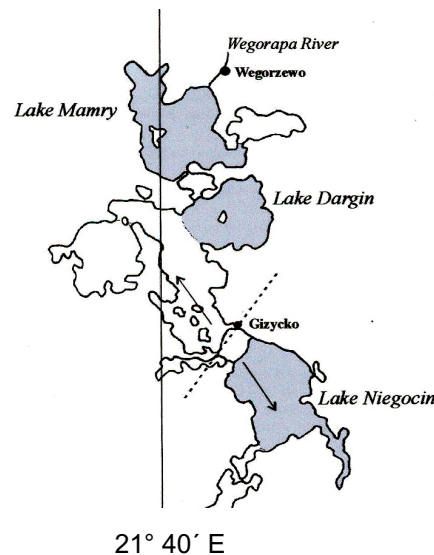
Vertreter der acII-Sequenzgruppe (Sonden AcII-152 und AcII-1243a) spielten zu diesem Probennahme-Zeitpunkt nur eine untergeordnete Rolle, obwohl dieser Sequenztyp relativ häufig in den 16S rRNA-Genbanken der Fuchskuhle vertreten war. Eventuell ist diese Unterschied auf einen PCR-Artefakt zurückzuführen (Cottrell und Kirchman, 2000).

**Tabelle 11:** LAB-Abundanzen in der Fuchskuhle.

Becken	FISH-Sonde [% DAPI]							
	HGC69a	AcI-852	AcI-1214	AcI-840a	AcI-840b	AcII-152	AcII-1243a	AcIV-1219b
SW*	44	41	43	<1	35	0	<1	0
NO*	38	n.b.	n.b.	n.b.	16	<1	<1	0

SW, Südwest-Becken; NO, Nordost-Becken. n.b., nicht bestimmt. Für die Zielgruppen der Sonden siehe Tabelle 9.

Die **Masurischen Seen** stellen das größte Süßwassersystem Polens dar. Das Gebiet besteht aus 30 Seen verschiedener Größe und bedeckt eine Fläche von 310 km<sup>2</sup>. Die Seen wurden im 17. Jahrhundert durch Kanäle verbunden, um so die Schifffahrt zu erleichtern. Das Seensystem besitzt eine nördliche (über den Fluß Wegorapa) und eine südliche Abflußrichtung (über den Fluß Pisa). Die Wasserscheide befindet sich in der Nähe der Stadt Gizycko (Abbildung 10) (Kufel und Kufel, 1999). Die Seen Mamry und Dargin befinden sich somit im nördlichen Abflußgebiet und Niegocin entwässert nach Süden. Die Seen besitzen eine Wasseroberfläche von 2,5 - 3,0 km<sup>2</sup> und sind eutroph und dimiktisch (Zdanowski und Hutorowicz, 1994).



**Abbildung 10:** Die Masurischen Seen mit den Gewässern Mamry, Dargin und Niegocin. Die gestrichelte Linie symbolisiert die Wasserscheide, die Pfeile geben die Abflußrichtung an.



In den Masurischen Seen Mamry, Dargin und Niegocin wurden FISH-Zählungen mit der allgemeinen Actinobakterien-Sonde HGC69a durchgeführt. Die Probennahmen erstreckten sich über alle Jahreszeiten im Jahr 2002 und so konnte gezeigt werden, daß in diesen eutrophen Gewässern die LAB einen relativ hohen und stabilen Anteil des Bakterioplanktons bilden. Die Auswertungen mit den spezifischen Sonden der typischen Süßwasser-Sequenzgruppen sind noch nicht abgeschlossen; es konnten jedoch bis zu 9% an Vertretern der Luna-Sequenzgruppe (acII-D-Sequenzgruppe) festgestellt werden.

**Tabelle 12:** LAB-Abundanzen in den Masurischen Seen im Jahr 2002.

<b>FISH-Zählungen mit Sonde HGC69a [% DAPI]</b>				
<b>See</b>	<b>Frühjahr</b>	<b>Sommer</b>	<b>Herbst</b>	<b>Winter</b>
Mamry	25 ± 3	28 ± 1	24 ± 5	17 ± 2
Dargin	25 ± 3	36 ± 5	24 ± 3	25 ± 6
Niegocin	16 ± 1	33 ± 8	19 ± 3	22 ± 6

## 2.3 Aktivität und Kultivierung limnischer Actinobakterien

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die phylogenetische Diversität und die Verbreitung sowie die Populationsstruktur der limnischen Actinobakterien in ausgewählten Habitaten diskutiert. Um einen Einblick in die Ökologie dieser Gruppe von Mikroorganismen zu erhalten, sollte deren Aktivität am natürlichen Standort (*in situ*) untersucht werden. Einleitend wird ein kurzer Überblick über das Methodenspektrum gegeben, welches in der mikrobiellen Ökologie zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden kann.

**Untersuchungen zur funktionellen Rolle und Ökologie limnischer Actinobakterien (LAB).** Actinobakterien sind physiologisch sehr vielseitig (Ensign, 1998). Einige Vertreter sind ausgesprochen wichtig für industrielle und pharmazeutische Anwendungen, da sie eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten und Antibiotika produzieren (Krsek *et al.*, 2000). Allerdings beziehen sich alle diese Erkenntnisse auf kultivierte Vertreter der Actinobakterien aus terrestrischen Habitaten.

Die vorangegangenen Kapitel dieser Arbeit haben gezeigt, daß sich die abundanten limnischen Actinobakterien bisher nicht in Kultur befinden. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß sich die Organismen der *aci*-Sequenzgruppe phylogenetisch deutlich von allen kultivierten Vertretern der Actinobakterien unterscheiden. Die phylogenetische Position ist aber nur begrenzt aussagekräftig in Bezug auf die metabolischen Fähigkeiten von Mikroorganismen: Wiederholt zeigten Isolate mit identischen oder fast-identischen 16S rRNA-Sequenzen deutlich unterschiedliche Phänotypen (Achenbach und Coates, 2000; Jaspers und Overmann, 2004; Moore *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1998). Zusammengefaßt bedeutet dies, daß faktisch nichts über den Metabolismus der abundanten limnischen Actinobakterien bekannt war.

Indirekte Erkenntnisse über die Ökologie der limnischen Actinobakterien konnten durch Klonierung und FISH in verschiedenen Studien erzielt werden. So wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hohe Abundanzen ausschließlich im oxischen Teil der Wassersäule verschiedener Habitats festgestellt. Demgegenüber konnten keine 16S rRNA-Sequenzen von Actinobakterien aus dem anoxischen Teil des Brackwassersees Sælenvannet (siehe Kapitel 3.1) und dem hypersalinen See Mono Lake (Humayoun *et al.*, 2003) gewonnen werden. Dies läßt auf einen aeroben Stoffwechsellyp der limnischen Actinobakterien schließen.

In einem Inkubationsversuch von Burkert *et al.* (Burkert *et al.*, 2003) führte die erhöhte Verfügbarkeit von gelösten natürlichen Kohlenstoffverbindungen zu einer Verringerung des relativen Anteils der LAB an der Gesamtpopulation. Dagegen stieg der relative Anteil der Betaproteobakterien der *Polynucleobacter necessarius*-Sequenzgruppe deutlich an. Die LAB wurden also unter den eingesetzten Bedingungen von einer anderen häufigen Gruppe von limnischen Bakterien überwachsen (Burkert *et al.*, 2003). Demnach scheinen sich diese beiden Gruppen – LAB und die Vertreter der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe – in ihrer ökologischen Strategie und ihrer Rolle im Habitat der Fuchskuhle zu unterscheiden. Die

Betaproteobakterien verhalten sich wie r-Strategen, die umgehend auf die Änderung an verfügbaren Substraten reagieren können. Demgegenüber scheinen die LAB zu den K-Strategen zu zählen: Sie verfügen vermutlich über effiziente Aufnahmesysteme, die es ihnen auch bei niedrigen Substratkonzentrationen ermöglichen, am natürlichen Standort eine hohe Abundanz zu verwirklichen.

Ein anderes Verhalten zeigten *acl*- und *aclII*-Populationen der LAB in Labor-Experimenten (Hahn *et al.*, 2003; Pernthaler *et al.*, 2001). Bei gröÙenselektivem FraÙdruck durch einen mixotrophen Nanoflagellaten (*Ochromonas*) reicherten sich die *acl*-LAB in einem Chemostat innerhalb von 5 bis 8 Tagen bis auf maximal 80% der Gesamtzellzahl an (Pernthaler *et al.*, 2001). Ebenso erwies sich ein kultivierter *aclII*-Vertreter (Luna-Sequenzgruppe) als resistent gegenüber FraÙdruck durch *Ochromonas* (Hahn *et al.*, 2003). Unter diesen sehr speziellen Bedingungen konnten die LAB also erfolgreich mit den übrigen Planktonbakterien konkurrieren.

Im nachfolgenden Teil der Arbeit kamen Methoden zur Anwendung, mit deren Hilfe die Aktivität der limnischen Actinobakterien *in situ* und kultivierungsunabhängig untersucht werden sollte. Die Ergebnisse dieser Versuche könnten letztendlich auch entscheidende Hinweise und Ideen für eine erfolgreiche Isolierungsstrategie der limnischen Actinobakterien liefern.

**DNA-Synthese von limnischen Actinobakterien in Gebirgsseen.** Dieses Experiment sollte untersuchen, ob die LAB unter *in situ*-Bedingungen DNA synthetisieren. Dazu wurde die von Pernthaler *et al.* (Pernthaler *et al.*, 2002) für die mikrobielle Ökologie angepaÙte Methode der Bromdeoxyuridin (BrdU)-Inkorporierung verwendet. Als Untersuchungshabitate wurden die schon in Kapitel 2.2 vorgestellten 10 Alpenseen in Tirol ausgewählt (siehe Tabelle 1 in Warnecke *et al.*, 2004). Die Probenahme und -verarbeitung vollzog sich in den folgenden Schritten:

- Probenahme von Oberflächenwasser (Seemitte)
- Befüllen von je 3 dunkel gefärbten Flaschen mit je 100 ml Probenwasser
- Start der Inkubation durch Zugabe von Bromdeoxyuridin (Endkonzentration = 20 µM)
- 4-stündige Inkubation bei *in situ*-Temperatur und im Dunkeln
- Abstoppen der Inkubation und Fixierung der Bakterien durch Zugabe von 100 ml absolutem Ethanol
- Filtrierung der Proben auf 0,2 µm Polycarbonatfilter
- Lagerung der Filter bis zur Auswertung bei -20°C

Als Kontrolle wurden einzelne Proben sofort fixiert und anschließend mit BrdU inkubiert.

Die Auswertung des BrdU-Experiments vollzog sich in Anlehnung an Pernthaler *et al.* (Pernthaler *et al.*, 2002), wurde jedoch für das SüÙwasserplankton und speziell für die LAB angepaÙt. Sie bestand aus den folgenden Schritten:

- Einbettung der Filter in Agarose
- Permeabilisierung der Bakterien mit Lysozym und Achromopeptidase (in Anlehnung an Sekar *et al.* (Sekar *et al.*, 2003))
- Hybridisierung der Filter mit rRNA-gerichteten Sonden (markiert mit Peroxidase) zur Identifizierung
- Tyramid-Signal-Amplifikation mit Alexa<sub>488</sub>-Farbstoff
- Inaktivierung der Peroxidasen
- Verdau der genomischen DNA mittels Restriktionsendonucleasen; dadurch wird die Zugänglichkeit der eingebauten BrdU-Moleküle für die Antikörper-Reaktion erhöht
- BrdU-spezifische Antikörperreaktion (markiert mit Peroxidase)
- Tyramid-Signal-Amplifikation mit Alexa<sub>546</sub>-Farbstoff
- Gegenfärbung mit DAPI
- Mikroskopische Auswertung

Für die Auswertung dieses Experiments wurden die HRP-markierten Sonden EUBI-III (Zielgruppe der Sonde: alle Bakterien) und HGC69a (Zielgruppe: alle Actinobakterien) eingesetzt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 13 zusammengefaßt.

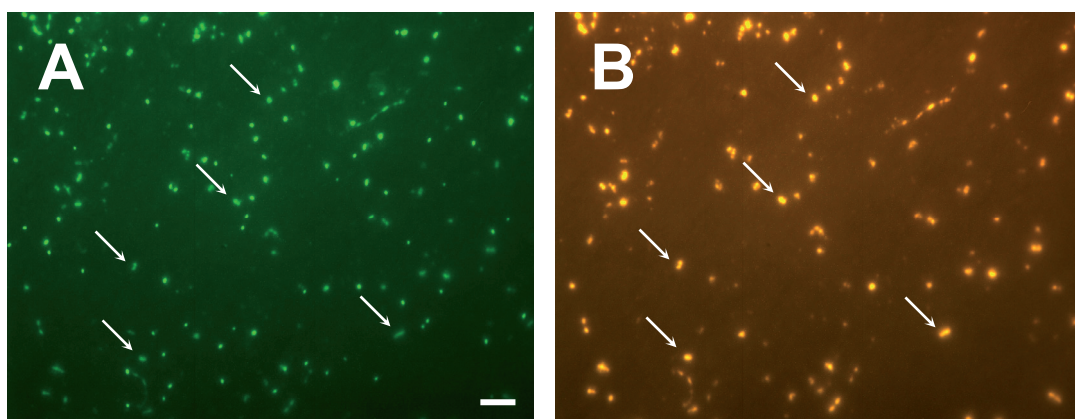
**Tabelle 13:** BrdU-aktive (d.h. DNA-synthetisierende) Fraktionen der Bakterien und der Actinobakterien\*.

Habitat	Abkürzung	Prozent BrdU-aktiver Zellen (± Standardabweichung)	
		EUBI-III	HGC69a
Rotfellssee	ROT	25 ± 3	25 ± 2
Geirneggsee	GEI	21 ± 2	25 ± 5
Gossenköllesee	GKS	15 ± 3	16 ± 3
Oberer Plenderlesee	OPL	21 ± <1	23 ± 1
Mittlerer Plenderlesee	MPL	13 ± 4	12 ± 2
Piburgersee	PIB	33 ± 2	23 ± 1
Schwarzsee ob Sölden	SOS	24 ± 2	23 ± 5
Drachensee	DRA	17 ± 3	23 ± 4
Seebensee	SEE	17 ± 3	37 ± 1
Achensee	ACH	14 ± 2	31 ± 3
Durchschnitt**		20 ± 6	24 ± 7

\*jeweils bezogen auf die hybridisierte Zellen; \*\*Durchschnitt aller 10 untersuchten Habitate.

Mit den hier beschriebenen Modifikationen wurde die BrdU-Inkorporierungsmethode erstmals erfolgreich auf das Süßwasserplankton und die LAB angewendet. Die DNA-synthetisierende Bakterien wurden auf Einzelzellebene mittels rRNA-gerichteter Sonden identifiziert und konnten so den hier untersuchten Kategorien der Domäne *Bacteria* und der Klasse

*Actinobacteria* zugeordnet werden. Der Durchschnitt an EUBI-III-positiven und gleichzeitig BrdU-aktiven Zellen aller untersuchten Habitats betragt  $20 \pm 6\%$ , die der HGC69a-positiven und gleichzeitig BrdU-aktiven Zellen betragt  $24 \pm 7\%$  (siehe Tabelle 13). Dieses Ergebnis widerlegte die ursprünglich aufgestellte Hypothese, denn es besagt, daß der relative Anteil DNA-synthetisierender LAB nicht geringer ist als der Durchschnitt aller Bakterien. Betrachtet man die einzelnen Habitats, so trifft dies auf die Mehrzahl der Seen zu (ROT, GEI, GKS, OPL, MPL, SOS, DRA). Ein signifikant erhöhter Anteil aktiver LAB im Vergleich zur Gesamtbakterienpopulation konnte in den Seen SEE und ACH festgestellt werden. Im Piburger See (PIB) wurden demgegenüber eine deutlich niedrigere Fraktion an aktiven LAB ermittelt. Dieses Habitat zeichnet sich durch den mit Abstand höchsten DOC-Gehalt der untersuchten Seen aus ( $2,5 \text{ mg/l}$ , Tabelle 10). Eventuell vermochten die LAB unter diesen Nährstoffreichen Bedingungen nicht erfolgreich mit anderen limnischen Bakterien zu konkurrieren (vgl. (Burkert *et al.*, 2003). Der Schwarzsee ob Sölden (SOS) mit der höchsten Abundanz an LAB (58%; fast ausschließlich Vertreter des Acl-840b-Sequenztyps) wies einen fast identischen Anteil an BrdU-aktiven LAB im Vergleich zu BrdU-aktiven Bakterien auf (siehe Tabelle 13). Eine hohe Abundanz an LAB ist demnach kein Indiz für eine überdurchschnittlich aktive Population.



**Abbildung 11:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Actinobakterien mit sichtbarer DNA-de novo-Synthese im Geirneggsee. A, Actinobakterien (Sonde Ac840b); B, DNA-synthetisierende Bakterien (BrdU-Nachweis). Die Pfeile zeigen BrdU-positive Actinobakterien.

**Substrataufnahme der limnischen Actinobakterien in der Großen Fuchskuhle.** Dieses Experiment sollte zeigen, ob mittels MAR-FISH die Aufnahme von radioaktiv-markierten Kohlenstoffsubstraten in die LAB-Zellen nachgewiesen werden kann. Ein wesentlicher Unterschied zum oben beschriebenen BrdU-Experiment bestand im ausgewählten Habitat und dem Probennahme-Zeitpunkt. Der relative Anteil an LAB an der Gesamtpopulation von Bakterien variierte im Jahresverlauf 2000-2001 stark mit einem Maximum im Spätherbst (bis zu 54%; (Burkert *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde die Probennahme für das MAR-

FISH-Experiment im November durchgeführt. Als Substrat wurde Tritium-markierte Glucose in einer Endkonzentration von 10 nM und einer spezifischen Aktivität von 35 Ci mmol<sup>-1</sup> eingesetzt. Die Glucose stellt ein energetisch attraktives und leicht zu metabolisierendes Substrat dar, welches vermutlich von vielen Mikroorganismen verwertet werden kann (Ittekkot *et al.*, 1981). Die Probennahme und -verarbeitung vollzog sich in den folgenden Schritten:

- Probennahme von Oberflächenwasser aus dem SW- und NO-Becken (Seemitte)
- Vorfiltrierung (100 µm)
- Befüllen von je 3 Gefäßen mit je 15 ml Probenwasser
- Start der Inkubation durch Zugabe von markierten Substraten (jeweils ein Substrat pro Versuch)
- 4-stündige Inkubation bei *in situ*-Temperatur (4,5°C)
- Abstoppen der Inkubation und Fixierung der Bakterien durch Zugabe von 15 ml absolutem Ethanol
- Lagerung der Inkubationen bis zur Filtrierung bei -80°C
- Filtrierung der Proben auf 0,2 µm Polycarbonatfilter
- Lagerung der Filter bis zur Auswertung bei -20°C

Als Kontrolle wurde ein Ansatz sofort fixiert und anschließend mit den radioaktiv-markierten Substrat inkubiert. Die Auswertung der MAR-FISH-Experimente vollzog sich in Anlehnung an Alonso *et al.* (Alonso und Pernthaler), wurde jedoch für das Süßwasserplankton und speziell für die LAB angepaßt. Sie bestand aus den folgenden Schritten:

- Einbettung der Filter in Agarose
- Permeabilisierung der Bakterien mit Lysozym und Achromopeptidase (in Anlehnung an Sekar *et al.*, 2003)
- Hybridisierung der Filter mit rRNA-gerichteten Sonden (markiert mit Peroxidase) zur Identifizierung
- Tyramid-Signal-Amplifikation
- Aufkleben der Filterabschnitte auf einen Objektträger
- Einbetten der Filter + Objektträger in fotografischer Emulsion
- Lichtgeschützte Inkubation für 24 Stunden bei 4°C
- Entwicklung der fotografischen Emulsion
- Gegenfärbung mit DAPI
- Mikroskopische Auswertung (Computer-unterstützte Bildanalyse)

Zunächst wurden die Abundanzen einiger Gruppen von wichtigen Süßwasserbakterien mittels CARD-FISH bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 14 zusammengefaßt.

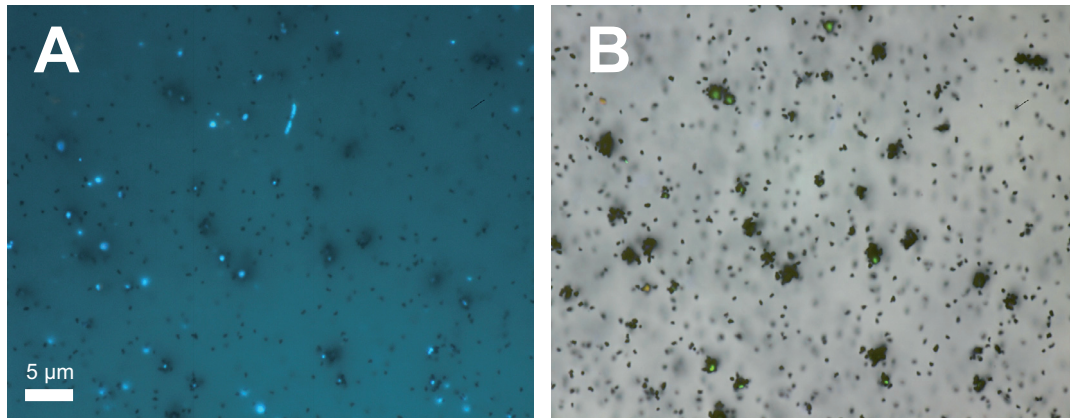
**Tabelle 14:** CARD-FISH-Zählungen im Glucose-Aufnahmeversuch.

Wasserprobe	CARD-FISH-Zählungen [% DAPI $\pm$ Standardabweichung]				
	EUBI-III	HGC69a	Acl-840b	Bet42a	Bet1-870
SW-Becken	88 $\pm$ 3	40 $\pm$ 2	30 $\pm$ 6	31 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1
NO-Becken	88 $\pm$ 5	35 $\pm$ <1	16 $\pm$ 2	33 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1

Für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der Fuchskuhle wurde schon von Babenzien und Babenzien Glucose als radioaktiv-markiertes Substrat eingesetzt (Babenzien und Babenzien, 1990). Mit dem hier beschriebenen Experiment konnten jedoch erstmals die Glucose-aufnehmenden Populationen identifiziert werden. Der Vergleich von Südwest- und Nordost-Becken ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Glucose-assimilierenden Populationen. Nur ca. ein Viertel der mit der Sonde EUBI-III hybridisierten Zellen nahm Glucose auf. Der MAR-positive Anteil der Vertreter der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe (Sonde Bet2-870) lag sogar nur bei ca. 10%. Demgegenüber konnte bei ca. 40% der Actinobakterien (Sonde Acl-840b) Glucoseaufnahme festgestellt werden. Eine ähnlich hohe Präferenz für Glucose weisen im marinen Plankton Vertreter der *Roseobacter*-Sequenzgruppe auf: >80% der durch FISH identifizierten Zellen waren in einem ähnlichen Experiment MAR-positiv (Alonso und Pernthaler). Dieser Wert übertrifft damit den Anteil von Glucose-positiven und typischerweise schnell-wachsenden Vertretern des marinen Bakterioplanktons: Nur etwa 20% der Gammaproteobakterien nahmen das angebotene Substrat auf (Alonso und Pernthaler). Die Actinobakterien stellen also eventuell eine auf die Aufnahme von Zuckern spezialisierte Gruppe von Bakterien dar. Polysaccharide werden z.B. vom Phytoplankton ausgeschieden und könnten anschließend als Substrat für die Actinobakterien dienen. Die Ergebnisse des MAR-FISH-Experiments wurden in Tabelle 15 zusammengefaßt.

**Tabelle 15:** MAR-FISH-Zählungen im Glucose-Aufnahmeversuch.

Wasserprobe	MAR-positive Zellen [% Sonden-positive Zellen $\pm$ Standardabweichung]		
	EUBI-III	Acl-840b	Bet1-870
SW-Becken	27 $\pm$ 4	41 $\pm$ 8	9 $\pm$ 1
NO-Becken	24 $\pm$ 6	38 $\pm$ 9	10 $\pm$ 2



**Abbildung 12:** Mikroskopische Aufnahmen des MAR-FISH-Experiments (Glucose-Aufnahme). A, DAPI-Färbung; B, kombiniertes Bild aus MAR-Präparation (Durchlicht) und FISH mit Sonde HGC69a (Epifluoreszenz).

**Kultivierung und Isolierung in der Umweltmikrobiologie.** In den folgenden Abschnitten sollen der allgemeine Kenntnisstand und die eigenen Versuche zur Isolierung der LAB dargestellt werden. Unter Kultivierung versteht man das gezielte Einstellen von Bedingungen, so daß der entsprechende Mikroorganismus im Labor zu wachsen vermag. Das bedeutet, unter den ausgewählten spezifischen Laborbedingungen kommt es zur Zellteilung und zur Zunahme des Biovolumens; dies kann sich auch in einer Misch- z.B. Anreicherungskultur vollziehen. Unter Isolierung versteht man dahingegen den Erhalt einer Reinkultur. Eine Reinkultur ist die Nachkommenschaft einer einzelnen Zelle (klonale Zelllinie) und damit genetisch und physiologisch homogen. H.G. Schlegel schreibt in seinem Lehrbuch dazu: *Eine Reinkultur herzustellen, die Reinheit zweifelsfrei zu beweisen und die Reinkultur von Kontaminanten freizuhalten, ist die vornehmlichste Aufgabe des Mikrobiologen* (Schlegel, 1992).

Die Reinkultur bietet den sehr wichtigen Vorteil, mit einem einzelnen Organismus unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen im Labor zu arbeiten. Es treten keine biotischen Wechselwirkungen mit anderen Stämmen/Arten oder Organismen anderer trophischer Ebenen auf. Dies stellt jedoch zugleich auch einen Nachteil in Bezug auf die Untersuchung der Ökologie eines Organismus dar, da genau diese Interaktionen entscheidend für die Überlebensstrategie sein können. In einer Reinkultur treten jedoch auch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Individuen des selben Isolats auf; dies kann u.U. notwendig für die Kultivierbarkeit sein (z.B. Austausch von Signalstoffen, (Bruns *et al.*, 2003).

Die Reinkultur ist aus ökologischer Sicht ein artifizielles Konzept, deren Erkenntnisse über einen Mikroorganismus sich nicht ohne Einschränkungen auf *in situ*-Bedingungen übertragen lassen. Die Reinkultur bietet auf der anderen Seite aber die Möglichkeit, bestimmte Fragestellungen zu untersuchen, welche methodisch sonst nicht oder nur wesentlich schwieriger zu bearbeiten wären. Die Reinkultur bietet die Möglichkeit, mittels klassisch-mikrobiologischer Testverfahren, die Verwertung von verschiedenen Substraten (z.B. Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen) zu untersuchen (Brock *et al.*, 1994). Chromatographische



und enzymatische Methoden werden eingesetzt, um die Metabolite und/oder Endprodukte eines Stoffwechselweges zu analysieren. Andere Tests untersuchen die Exoenzymaktivität im Kulturüberstand (Admiraal und Tubbing, 1991). Mittels molekularbiologischer Methoden (z.B. PCR) läßt sich das Vorhandensein von (bekannten) Genen, die für Schlüsselenzyme bestimmter Stoffwechselleistungen kodieren, überprüfen (Kharel *et al.*, 2003). In einer Mischkultur ließe sich ein positives Ergebnis nicht einfach einer Art oder Population zuordnen; dazu müßten aufwändigere Methoden, wie z.B. die mRNA-FISH (Pernthaler und Amann, 2004) angewendet werden. Die Reinkultur ermöglicht auch die vergleichsweise einfache Sequenzierung größerer genomischer Bereiche bis hin zum vollständigen Genom.

Demgegenüber ist die Genomsequenzierung unkultivierter Mikroorganismen aus gemischten Gemeinschaften zwar prinzipiell möglich (Tyson *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004), birgt jedoch zusätzliche Schwierigkeiten. Zum Beispiel entstammt das Ausgangsmaterial – die DNA – nicht einer klonalen Zelllinie sondern einer Vielzahl von potentiell unterschiedlichen Individuen. Diese Einzelzellen können sich, obwohl aufgrund der Sequenz ihrer phylogenetischen Markergene einer Art zugerechnet, in ihrer Genomstruktur und -sequenz deutlich unterscheiden (Tyson *et al.*, 2004). Insgesamt erscheint die Umweltgenomsequenzierung bisher nur in einfachen Systemen mit wenigen dominanten Populationen sinnvoll, obwohl die Zuordnung und Assemblierung von genomischen Fragmenten zunehmend erleichtert wird, u.a. durch die Tetranukleotid-Methode (Teeling *et al.*, 2004). Durch die Genomsequenzierung von Reinkulturen und die Rekonstruktion von potentiellen Stoffwechselwegen können metabolische Eigenschaften nachgewiesen werden, die zuvor nicht im Labor gezeigt werden konnten. So wurden im Genom von *Rhodopirellula baltica* alle erforderlichen Gene für die heterofermentative Milchsäuregärung und wichtige Enzyme für den C1-Metabolismus gefunden (Glöckner *et al.*, 2003).

**Kultivierung und Isolierung limnischer Actinobakterien.** Die limnischen Actinobakterien der phylogenetischen Sequenzgruppen *acl*, *acIII* und *acIV* (siehe Kapitel 2.1) konnten bisher nicht in Reinkultur gebracht werden. Demgegenüber wurden Vertreter der *acII*-Sequenzgruppe kürzlich aus verschiedenen europäischen und asiatischen Seen isoliert (Hahn *et al.*, 2003). Aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird vermutet, daß diese Sequenzgruppe in sauren, oligo- bis mesotrophen Gebirgsseen selten sind. Dies bedeutet wiederum auch, daß die numerisch-abundanten LAB – vor allem die der *acl*-Sequenzgruppe – bisher nicht in Reinkultur vorliegen.

In der Vergangenheit wurden wiederholt Versuche unternommen, die abundanten LAB zu isolieren. Glöckner *et al.* analysierten mehr als 200 Isolate aus dem Baikalsee und der Großen Fuchskuhle auf ihre *acl*-Zugehörigkeit – ohne ein entsprechendes Isolat zu erhalten (Glöckner *et al.*, 2000). In einem Chemostat-Experiment konnten *acl*-LAB kultiviert und bis auf etwa 80% der totalen Zellzahl angereichert werden; eine Isolierung scheiterte jedoch ebenfalls (Pernthaler *et al.*, 2001). In einer anderen Studie konnten Vertreter der *acI*-

Sequenzgruppe aus dem eutrophen See Zwischenahner Meer in Flüssigmedium kultiviert, aber nicht in Reinkultur gebracht werden (Bruns *et al.*, 2003).

**Methoden zur Kultivierung und Isolierung limnischer Actinobakterien.** In der klassischen Mikrobiologie wird dem Isolierungsversuch meist eine Anreicherung vorangestellt, um so den relativen Anteil des Zielorganismus an der Gesamtpopulation zu erhöhen. Für diese Strategie sind jedoch Kenntnisse der metabolischen Eigenschaften oder der ökologischen Nische des zu isolierenden Organismus unabdingbar. Im Falle des oben erwähnten Chemostat-Experimentes konnte durch Zugabe eines gröÙenselektiv fressenden Nanoflagellaten die *acl*-Population angereichert werden (Pernthaler *et al.*, 2001), wohingegen die erhöhte Verfügbarkeit von natürlichem gelöstem Kohlenstoff (DOC) in einer anderen Studie nicht zu einer Anreicherung der LAB führte (Burkert *et al.*, 2003). Als Alternative zur Anreicherung kann die Direktisolierung angesehen werden. Diese Strategie bietet sich an, wenn der Zielorganismus in einer Anreicherungskultur ansonsten von schneller wachsenden Organismen verdrängt wird. Als Beispiel sei hier die erwähnte Inkubation von Wasser aus der Fuchskuhle genannt: Betaproteobakterien der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe dominierten nach wenigen Tagen die Kulturen (Burkert *et al.*, 2003). Zur direkten Isolierung können feste oder flüssige Nährmedien verwendet werden. Das Ausbringen und Verteilen von Probenmaterial auf einer Nährmediumsoberfläche ermöglicht die physikalische Trennung von einzelnen Zellen und erlaubt somit die Entwicklung von Kolonien von sowohl schnell- als auch langsamwachsenden Mikroorganismen. Theoretisch bildet eine einzelne Zelle den Ursprung für eine Kolonie; ein wiederholtes Ausstreichen einer vereinzelter Kolonie führt so zum Erhalt einer Reinkultur. In der klassischen Mikrobiologie wird überwiegend Agar zur Verfestigung von Nährmedien eingesetzt. Es wurde jedoch gezeigt, daß Agar toxische Effekte auf einige Umweltmikroorganismen ausübt und diese somit keine Kolonien ausbilden können (Liesack *et al.*, 1997). In einer Studie zur Kultivierbarkeit von Boden-Mikroorganismen konnte eine erhöhte Kultivierungseffizienz bei Verwendung von Gellan Gum als alternativem Verfestigungsmittel festgestellt werden (Janssen *et al.*, 2002).

Die Direktisolierung in Flüssigmedium erfordert das serielle Ausverdünnen der Ausgangsprobe bis zu der Stufe, daß nur noch eine einzelne Zelle als Impfmateriel für eine Kultur dient (→ *extinction cultures*) (Button *et al.*, 1993; Connon und Giovannoni, 2002) (Schut *et al.*, 1993). Die höchste Verdünnungsstufe mit Wachstum wird nachfolgend als Ausgangsmateriel für eine weitere Verdünnungsserie ausgewählt. Diese Methode erfordert somit die Erstellung einer Vielzahl von Parallelkulturen und dadurch auch ein effizientes Screening-Verfahren, um die gesuchten Kulturen letztendlich identifizieren zu können. Dieser Ansatz ist laut Ferris und Ward dazu geeignet, häufige, aber langsam wachsende Mikroorganismen zu isolieren (Ferris *et al.*, 1996). Verdünnungskulturen bieten darüber hinaus das Potential, auch obligat-syntrophe Assoziierungen verschiedener Organismen zu isolieren, die in Reinkultur und auf festen Oberflächen (d.h. getrennt von ihrem syntrophen Partner) nicht lebensfähig wären

(Glaeser und Overmann, 2004). Erfolgreich – in Bezug auf die LAB – wurde die Verdünnungsstrategie von Bruns *et al.* angewendet: Aus dem Zwischenahner Meer konnten acII-Vertreter angereichert werden; die Isolierung bzw. Subkultivierung dieser Stämme scheiterten jedoch (siehe unten) (Bruns *et al.*, 2003). Hahn *et al.* begannen ihre Kultivierungsversuche mit einer aufwendigen Akklimatisierungsphase, in der Temperatur und Substratkonzentration allmählich angehoben wurde (Hahn *et al.*, 2004). Dieser Ansatz führte zur Isolierung von acII-Vertretern der LAB (Hahn *et al.*, 2003) und Betaproteobakterien der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe (Hahn, 2003).

Der Substratkonzentration im festen oder flüssigen Medium kommt eine besondere Bedeutung zu (Busmann *et al.*, 2001). In der klassischen Kultivierung von Mikroorganismen im Labor werden Substratkonzentrationen eingesetzt, die weit über den üblichen *in situ*-Konzentrationen z.B. im Süßwasserpelagial liegen (Bsp. R2A-Medium, Reasoner und Geldreich, 1985). Bei Verwendung dieser Medien für die Anreicherung und/oder Isolierung wird auf Mikroorganismen selektiert, die diese hohen Konzentrationen tolerieren können (Keller und Zengler, 2004). Calcott *et al.* fanden heraus, daß ein abrupter Anstieg der Substratkonzentration lethal auf hungernde Bakterien wirken kann (→ *substrate-accelerated death*; Calcott und Postgate, 1972). Neben der niedrigen Substratkonzentration kann sich auch eine erniedrigte Sauerstoffkonzentration vorteilhaft auf die Kultivierungseffizienz auswirken (Bruns *et al.*, 2003; Busmann *et al.*, 2001). Am natürlichen Standort verbraucht die mikrobielle Gemeinschaft kontinuierlich den molekularen Sauerstoff und detoxifiziert auftretende Sauerstoffradikale. In einer Verdünnungskultur mit nur einer bakteriellen Zelle können diese Umstände ein Wachstum der Kultur verhindern (Busmann *et al.*, 2001).

Daneben bieten sich noch zahlreiche weitere Möglichkeiten die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums zu variieren und dadurch eventuell neue Arten bzw. Stämme zu isolieren. Dies betrifft z.B. das Puffersystem, die Art und Kombination der Kohlenstoffquelle, sowie die Zusetzung von Signalstoffen. Gerade letzteres erlangte im Zuge der Erforschung der Zell-Zell-Kommunikation verstärkt Beachtung. In verschiedenen Studien wurden dem Medium Homoserinlactone oder cAMP in niedrigen Konzentrationen zugesetzt und so die Kultivierungseffizienz gesteigert (Bruns *et al.*, 2002; Bruns *et al.*, 2003; Busmann *et al.*, 2001). Man vermutet, daß diese Signalstoffe für das Wachstum von einigen Mikroorganismen essentiell sind (Guan *et al.*, 2000; Mukamolova *et al.*, 1998). In einer hochverdünnten Kultur in synthetischem Medium könnte somit das Fehlen der Zell-Zell-Kommunikation ein Wachstum verhindern. Diesem Umstand wurde u.a. auch mit verschiedenen technischen Lösungen Rechnung getragen. Kaeberlein *et al.* entwickelten so genannte Diffusionskammern (Kaeberlein *et al.*, 2002): Hierbei wird das verdünnte Probenmaterial in Softagar eingebettet, und die Kammern werden anschließend mit Membranfiltern verschlossen. Diese Technik ermöglicht somit die Diffusion von niedermolekularen Substraten und Signalstoffen zu den eingebetteten Mikroorganismen. Die Anwendung dieser Methode führte zur Isolierung von neuartigen

Stämmen, welche bisher nicht in synthetischem Nährmedium wuchsen (Kaeberlein *et al.*, 2002).

Aus der industriellen Forschung stammt die Hochdurchsatztechnologie der *Gel Micro-Droplets* (Zengler *et al.*, 2002): Hierbei werden einzelne Zellen der Ausgangsprobe in Tropfen einer gel-artigen Substanz eingebettet. Die polymerisierten Kügelchen werden anschließend in eine Chromatographie-Säule gefüllt und mit Nährmedium umspült. Im Durchflußzytometer wird die Ausbildung von Mikrokolonien verfolgt und die entsprechend Wachstums-positiven Gel-Kügelchen werden anschließend aussortiert. Mit den beiden zuvor beschriebenen Technologien lassen sich Substrat- und Endproduktkonzentrationen konstant halten. Somit wird ein wichtiges Problem der klassischen mikrobiologischen Kultivierung in geschlossenen Kulturgefäßen (*batch*) überwunden; es können damit annähernd natürliche Bedingungen simuliert werden. Dieser Vorteil wird mit der physischen Isolierung einzelner Zellen durch Einbettung in eine Polymermatrix verbunden.

Nach einer erfolgreichen Kultivierung sind möglichst einfache und verlässliche Screening-Methoden notwendig, um die Kulturen des gesuchten Mikroorganismus identifizieren zu können. Das Screening kann auf den Phänotyp, also z.B. auf bestimmte Stoffwechselleistungen oder den Genotyp, also z.B. die phylogenetische Zugehörigkeit abzielen. In der klassischen Mikrobiologie wird häufig die Koloniemorphologie für eine Einordnung des Isolats herangezogen. Einige kultivierte Vertreter der Actinobakterien besitzen eine typische Koloniemorphologie: Sie bilden Filamente und Myzel-ähnliche Strukturen auf Agaroberflächen aus (Lechevalier und Lechevalier, 1967). Die Isolate der *aclI*-Sequenzgruppe bildeten kein Myzel aus, sondern sehr kleine, gelb- oder rot-pigmentierte Kolonien (Hahn *et al.*, 2003).

Da die *acl*-LAB bisher nicht isoliert werden konnten, eignete sich die Koloniemorphologie ebenso wenig wie die Physiologie als Erkennungskriterium. Vielmehr sind die *acl*-LAB bisher vorwiegend aufgrund ihrer phylogenetischen Position definiert worden. Dies bedeutet, daß für das Screening molekularbiologische Methoden eingesetzt werden müssen. Bruns *et al.* setzten die Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) zum Screening der Verdünnungskulturen ein und verglichen das Laufverhalten der Banden in den Kulturen mit denen in der Ausgangsprobe. Zwei Kulturen lieferten eine einzelne Bande, welche mit einer häufig auftretenden Umweltbande korrespondierte. Die Sequenzierung führte zu Sequenzen der *acl*-Sequenzgruppe; die Kulturen wurden jedoch nicht weiter bearbeitet (Bruns *et al.*, 2003). Bei diesem Ergebnis sollte angemerkt werden, daß eine einzelne DGGE-Bande nicht zwangsläufig auf eine Reinkultur hinweist (Kisand und Wikner, 2003). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für eine eindeutige phylogenetische Identifizierung eines Isolats die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens erforderlich ist.

**Kultivierungs- und Isolierungsversuche limnischer Actinobakterien im Rahmen der vorliegenden Arbeit.** Die LAB der *acl*-Sequenzgruppe konnten bisher nicht in Reinkultur gebracht werden. Sie stellen jedoch einen bedeutenden Anteil des Bakterioplanktons in den

hier untersuchten Habitaten dar. Die mit der spezifischen Sonde Acl-840b detektierten LAB innerhalb der acl-Sequenzgruppe bildeten in einigen Seen mit über 50% der Gesamtzellzahl einen numerisch dominante Population (siehe Kapitel 3.2). Zahlreiche ungerichtete Kultivierungsexperimente führten in der Vergangenheit nicht zu einer zufälligen Isolierung (Bartscht *et al.*, 1999; Bruns *et al.*, 2003; Bruns *et al.*, 2003; Busmann *et al.*, 2001; Jaspers *et al.*, 2001) und selbst gezielte Isolierungsversuche scheiterten bisher (Glöckner *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 2001). Es konnte geschlußfolgert werden, daß die Standardmethoden der Mikrobiologie bzw. die in den oben erwähnten Studien angewendeten Methoden ungeeignet zur Isolierung der abundanten LAB waren. In der klassischen Mikrobiologie werden Reinkulturen meist über die Vereinzelnung von Kolonien auf Agar-Nährmedien erzielt. Bei den LAB handelt es sich vermutlich um obligat planktonische Organismen, die eventuell nicht auf festen Oberflächen wachsen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Direktisolierung angestrebt. Eine Anreicherungsstrategie wurde nicht entwickelt, da sich die Zielgruppe über deren phylogenetische Position und nicht aufgrund einer bestimmten Stoffwechselleistung definierte. Rückschlüsse von der Phylogenie eines Mikroorganismus auf dessen Metabolismus bzw. Ökologische Strategie sind kaum möglich (Achenbach und Coates, 2000). Zum Beispiel ist die einzige beschriebene Art der im Süßwasser abundanten *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe ein obligater Endosymbiont eines Ciliaten (Heckmann und Schmidt, 1987). Darüberhinaus stellte das Ausgangsmaterial der Isolierungsversuche schon eine natürliche Anreicherung dar (Tabelle 16).

Als potentielle Stoffwechselleistung wurde jedoch eine Beteiligung der LAB am Abbau von Huminstoffen vermutet. Diese Vermutung gründete sich auf indirekte Befunde, wie die hohen Abundanzen der LAB in huminstoffreichen Gewässern und die darin gemessene hohe Aktivität extrazellulärer Peroxidasen (Burkert *et al.*, 2003; Burkert, unveröffentl. Ergebnisse). Diese Enzyme terrestrischer Actinobakterien sind nachweislich am Abbau von Huminstoffen und anderen komplexen Verbindungen beteiligt (Mercer *et al.*, 1996; Ramachandra *et al.*, 1988). Allerdings treten die acl-LAB ebenfalls in oligotrophen Habitaten ohne Huminstoff-Einfluß in hohen Abundanzen auf (z.B. Schwarzsee ob Sölden, siehe Kapitel 2.2).

Eine weitere Ursache für die bisherige Erfolglosigkeit der Kultivierung könnte in der ökologischen Strategie der LAB begründet sein. In der Großen Fuchskuhle wurden im Spätherbst und somit bei einer Wassertemperatur von ca. 5°C die höchsten relativen Abundanzen an Actinobakterien gemessen (Burkert *et al.*, 2003). Außerdem zeigten sich Vertreter der LAB resistent gegen das Fraßverhalten bestimmter Nanoflagellaten (Hahn *et al.*, 2003; Pernthaler *et al.*, 2001). Aus diesen Befunden könnte geschlußfolgert werden, daß die LAB weniger aktiv, aber ausgesprochen ausdauernd am natürlichen Standort sind. Dieser Vermutung konnte jedoch im Verlauf der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener Methoden widersprochen werden: Die LAB zeigten sich nicht minder aktiv als der Durchschnitt der

mikrobiellen Gemeinschaft unter *in situ*-Bedingungen (siehe BrdU- und MAR-FISH-Experimente). Demnach scheint es sich bei den per FISH identifizierten LAB-Zellen nicht um inaktive Dauer- oder Verbreitungsstadien zu handeln.

Ebenso scheint ein extrem langsames Wachstum als grundsätzliche Ursache für fehlende Kulturen auszuschließen: Unter geeigneten Bedingungen – im Chemostat-Experiment und unter Fraßdruck – reicherten sich die LAB innerhalb weniger Tage bis auf 80% der Gesamtpopulation an, dabei stiegen die absoluten Zellzahlen von  $<10^4$  auf ca.  $10^6$  ml<sup>-1</sup> an (Pernthaler *et al.*, 2001).

**Tabelle 16:** Probennahmen für Kultivierungsexperimente.

Nr.	Habitat	Charakteristika	Datum der Probennahme	Wassertemperatur, pH	Abundanzen der LAB* (verwendete Sonde)
1	Gr. Fuchskuhle, SW	huminstoffreich, Deutschland	04.04.2003	n.b., pH 4,5	40% (HGC69a)
1	Stechlin	oligotroph, Deutschland	04.04.2003	n.b.	28% (HGC69a)
2	Gr. Fuchskuhle, SW	siehe oben	11.11.2003	5°C, pH 4,5	35% (Acl-840b)
3	Gr. Fuchskuhle, SW	siehe oben	23.11.2003	5°C, pH 4,5	38% (Acl-840b)
4	Icehouse Pond	huminstoffreich, USA	11.07.2004	29°C, pH 5,5	49% (Acl-840a+b)

\*Anteil an DAPI-Gesamtzellzahl; SW, Südwest-Becken; n.b., nicht bekannt.

**Medium.** Als Ausgangsmaterial für die Kultivierungsversuche wurde vorwiegend Oberflächenwasser der Großen Fuchskuhle (Versuche Nr. 1, 2 und 3), sowie einmalig auch aus dem Stechlinsee (Nr. 1) und dem Icehouse Pond verwendet (Nr. 4; siehe Tabelle 16). Die Fuchskuhle eignete sich in besonderer Weise für diese Experimente, da sie zuvor und zeitgleich limnologisch und mikrobiologisch untersucht wurde (Burkert *et al.*, 2003; Simek *et al.*, 1998); H.-P. Grossart und M. Allgeier, IGB Neuglobsow, persönl. Mitteilung). Es wurden fein abgestuften Verdünnungsreihen (1:2) der Probe erstellt und die einzelnen Verdünnungsstufen dann als Inokulum für eine hohe Anzahl von Parallelkulturen verwendet. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, daß in einigen dieser Kulturen nur eine einzelne, lebensfähige Zelle als Impfmateriale diene (→ *extinction cultures*). Bei einem Anteil der LAB an der Gesamtpopulation von 35-50% und geeigneten Kultivierungsbedingungen, sollte also in einer der Verdünnungsstufen theoretisch jede zweite bis dritte Kultur eine Reinkultur von limnischen Actinobakterien ergeben.

Im Verlaufe der Experimente wurden verschiedene Medien verwendet: Zum Einsatz kamen z.B. das SF-Medium (*synthetic freshwater*, (Bartscht *et al.*, 1999), NSY-Medium (*nutrient broth-soytone-yeast extract*, (Hahn *et al.*, 2003), DNB-Medium (*dilute nutrient broth*, (Janssen *et al.*, 2002) und das von der DSMZ für *Corynebacterium glutamicum* empfohlene M53-Medium (www.dsmz.de). SF- und NSY-Medium bieten aus mikrobiologischer Sicht den Vorteil der definierten Salz-, Puffer- und Spurenstoffkonzentrationen. Trotzdem wurde in den

Versuchen 2, 3 und 4 nur noch original Habitat-Wasser als Medium eingesetzt. Dieser Ansatz bietet den Vorteil des potentiell identischen Milieus der Kultur im Vergleich zu den *in situ*-Bedingungen, so z.B. auch das Vorhandensein bisher nicht identifizierter natürlicher Spuren- und Signalstoffe. Ein Nachteil jedoch ist, daß das Habitat-Wasser mitunter nur wenig gepuffert ist und sich somit der pH-Wert durch Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen verschieben kann. In jedem Fall mußte das Habitat-Wasser zunächst sterilisiert werden; dazu kamen 3 verschiedene Verfahren teilweise parallel zum Einsatz:

- Zweimalige Sterilfiltration (0,2 µm), Versuche 1, 2 und 3
- Autoklavierung (121°C, 20 min), Versuche 1, 2 und 3
- Einmalige Sterilfiltration (0,2 µm) und anschließendes kurzes Aufkochen in der Mikrowelle, Versuch 4 (J. Waterbury, WHOI Woods Hole, persönl. Mitteilung)

Die Sterilisierungsvariante der zweimaligen Filtration führt vermutlich zu den geringsten Veränderungen des Ausgangswassers. Allerdings wurde bei diesem Verfahren wiederholt Wachstum in den Negativkontrollen (nicht-inokuliertes Medium) festgestellt. Die Kontaminanten besaßen häufig eine Spirocheten-ähnliche Morphologie. Die Sterilisierung durch Autoklavierung kann die chemische Zusammensetzung des Habitat-Wassers durch Denaturierung oder Oxidation organischer Verbindungen verändern. Dies könnte zu einer Erhöhung der verfügbaren Substrate für die Mikroorganismen in den Kulturen geführt haben. Als interessante Variante erwies sich die Kombination aus Filtration und kurzzeitigem Erhitzen. Die Wärmeeinwirkung wurde deutlich reduziert und trotzdem konnte keine Kontamination der Negativkontrollen festgestellt werden. Kulturen, die Wachstum zeigten wurden zur Isolierung von Reinkulturen u.a. auf festem Nährmedium ausgestrichen. Dazu wurde identisches Medium entweder mit Agar oder Gellan Gum verfestigt.

**Inkubationsbedingungen.** Die Inkubation der Kulturen erfolgte im wesentlichen nach der Akklimatisierungsmethode von Hahn *et al.* (Hahn *et al.*, 2003). Allen Medien wurden nur sehr niedrige Konzentrationen an Substraten zugesetzt (10-50 mg l<sup>-1</sup>), um so einen Schock der potentiell hungernden Zellen zu verhindern (→ substrate-accelerated death, Calcott und Postgate, 1972). Es wurden folgende Substrate einzeln oder in Kombination verwendet: Glucose, N-Acetylglucosamin, Pepton, Hefe- und Soya-Extrakt. Im Falle der synthetischen Medien wurde Parallelkulturen cAMP zugesetzt (10 µM; (Bruns *et al.*, 2002); ein positiver Effekt wurde jedoch nicht festgestellt.

Neben der Vermeidung eines Substratschocks sollte auch ein Temperaturschock umgangen werden. Dazu wurde das Probenmaterial bei *in situ*-Wassertemperatur (5°C) ins Labor transportiert und die Kulturen im Kühlraum angelegt. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur in Schritten von 1°C pro Tag auf 15°C angehoben. Die erste Substratzugabe erfolgte nach 5 Tagen und wurde dann alle 3 Tage wiederholt. Aufgrund der höheren *in situ*-Wassertemperatur im Icehouse Pond (29°C) konnte die Akklimatisierungsphase vereinfacht werden; die Inkubation erfolgte bei 30°C. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte

in 96er oder 24er Mikrotiterplatten im 100 µl- bzw. 1 ml-Maßstab. So konnte eine große Anzahl von Parallelkulturen angelegt werden; Versuch 3 bestand z.B. aus über 2000 Einzelkulturen.

**Screening-Verfahren.** In Anbetracht der hohen Zahl von Einzelkulturen war ein effizientes Screening-Verfahren unabdinglich. In einer ersten Stufe des Screenings sollten die höchsten Verdünnungsstufen mit Wachstum selektiert werden, da in den niedrigeren Verdünnungsstufen die LAB vermutlich von schnell wachsenden Mikroorganismen überwachsen wurden (Eilers *et al.*, 2000). Jedoch erwies sich das Feststellen von Wachstum als schwierig: Kulturen mit sichtbarer Trübung des Mediums enthielten keine oder nur in geringem Anteil LAB, sondern meist Spirocheten-ähnliche Morphotypen. Kulturen, die positiv auf LAB getestet wurden, zeigten hingegen keine sichtbare Trübung. Eventuell würde sich die Durchflußzytometrie in Bezug auf Sensitivität und Durchsatz für die Optimierung dieser Aufgabe eignen (Button *et al.*, 1993; Schut *et al.*, 1993).

Für die zweite Stufe des Screenings – des qualitativen Nachweises von LAB in einer Kultur – sollte die schon für die 16S rRNA-Genbanken verwendete Screening-PCR eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.1). Zum Screenen der Genbanken wurde 1 µl Zellsuspension der Klonkulturen als Inokulum für die PCR verwendet; im Falle der Fuchskuhlen-Kulturen erwiesen sich 1 µl Kulturflüssigkeit als inhibitorisch für die PCR. Dieser inhibitorische Effekt – vermutlich durch Huminstoffe (Kreader, 1996; LaMontagne *et al.*, 2002) im Fuchskuhle-Wasser ausgelöst – konnte durch Waschen der Zellen in PBS aufgehoben werden. Jedoch erwies sich dieser Waschschrift als unpraktikabel im Hinblick auf die hohe Probenzahl, das minimale Probenvolumen und die niedrige Zelldichte in einigen Kulturen. Außerdem bestätigte die Screening-PCR ihre hohe Sensitivität: Auch Kulturen mit äußerst geringem Anteil von LAB lieferten ein positives Signal; somit hätte nicht zwischen wachsenden Reinkulturen von LAB und Kulturen durch das Inokulum transferierten LAB unterschieden werden können. Diese Limitierung könnte durch die Etablierung einer quantitativen PCR überwunden werden.

Mikroskopische Methoden eignen sich nur bedingt zum Screenen einer größeren Anzahl von Kulturen. Sowohl die Vorbereitung der Proben als auch deren Auswertung ist zeitaufwendig. Die einfachste Färbetechnik für die Epifluoreszenz-Mikroskopie ist die DAPI-Färbung (Porter und Feig, 1980); allerdings lassen sich Kulturen anschließend nur aufgrund ihrer Morphologie differenzieren. In der vorliegenden Arbeit eignete sich diese Methode lediglich zum Nachweis von Wachstum aufgrund mangelnder morphologischer Besonderheiten der LAB. Zur Steigerung des Probendurchsatzes wurde ein Filtrierapparat getestet, mit dem alle 96 Einzelkulturen einer Mikrotiterplatte auf einen Membranfilter (47 mm Durchmesser) gefiltert werden können (In Zusammenarbeit mit A. Pernthaler, MPI Bremen). Dieser Apparat erwies sich jedoch als unpraktikabel, da es unter der Basisplatte aufgrund von Kapillarkräften zu einer ungerichteten Verteilung der einzelnen Aliquots kam. Weiterhin wurde das Immobilisieren von ganzen Zellen auf speziell beschichteten Glas-Objektträgern durch



einen Spotting-Roboter getestet (In Zusammenarbeit mit C. Würdemann und K. Ishii, MPI Bremen). Hierfür erwiesen sich die Zusammensetzung des Mediums und die geringe Zelldichte der Kulturen als Hindernis. Außerdem konnte durch das Verfahren nicht garantiert werden, daß alle Zelltypen gleichermaßen und somit unselektiv auf der Oberfläche immobilisiert werden könnten.

Zur verlässlichen Identifizierung von LAB in den Kulturen und Abschätzung deren Anteils in Mischkulturen konnte nur die CARD-FISH mit spezifischen Sonden (siehe Kapitel 3.2) verwendet werden. Diese Methode ist jedoch äußerst arbeitsintensiv und läßt sich somit nur auf eine begrenzte Anzahl von Proben anwenden. Zur Erhöhung des Durchsatzes wurden gesamte Mikrotiterplatten oder einzelne Reihen und Spalten von Mikrotiterplatten vereinigt und anschließend per CARD-FISH ausgewertet.

**Ergebnisse.** Mikrobielles Wachstum wurde in allen getesteten Medien festgestellt. Bei Parallelinkubationen in verschiedenen Medien wurde in doppelt sterilisiertem Medium noch in höheren Verdünnungsstufen Wachstum ermittelt. Diese potentiell höhere Kultivierungseffizienz könnte darauf zurückzuführen sein, daß das Standortwasser die zum Habitat ähnlichsten Wachstumsbedingungen bietet. Alternativ könnte diese Beobachtung auch der mangelnden Sterilität (siehe oben) zu schulden sein. Der Zusammenhang zwischen Medium und Kultivierungseffizienz wurde nicht systematisch untersucht.

Aliquots von gewachsenen Kulturen der Versuche 1 und 2 wurden auf Gellan Gum-Medium ausplattiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kolonien überimpft und die 16S rRNA-Sequenz der Stämme partial bestimmt. Auf diese Weise konnte ein Isolat aus dem Stechlinsee der Gattung *Microbacterium* innerhalb der Actinobakterien zugeordnet werden. Neun weitere Isolate – 2 aus dem Stechlinsee und 7 aus der Fuchskuhle – zeigten hohe Ähnlichkeit zur *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe bzw. anderen Sequenzgruppen der Betaproteobakterien.

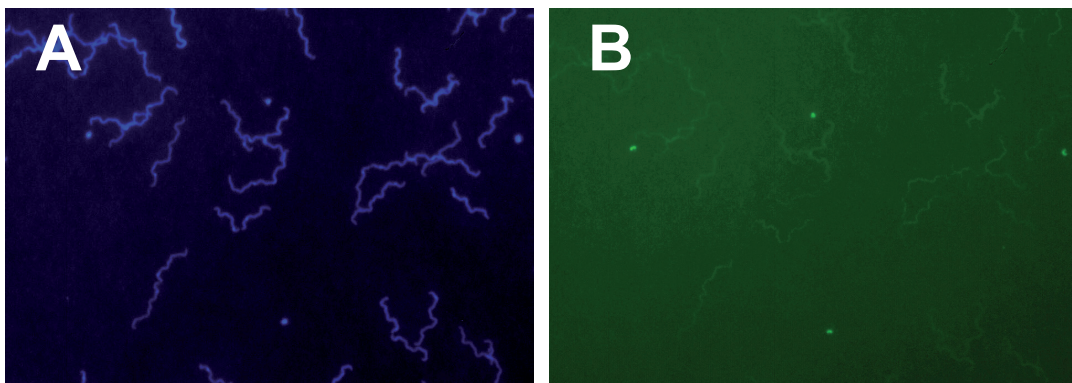
**Tabelle 17:** Phylogenetische Einordnung von Stechlin- und Fuchskuhlen-Isolaten.

Isolat	Ursprungskultur	Nächster Verwandter*	Phylogenetische Gruppe	Sequenzähnlichkeit [%]
Isolat 1	Stechlin	<i>Microbacterium</i> sp.	Actinobakterien	99
Isolat 2	Stechlin	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	99
Isolat 3	Stechlin	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	97
Isolat 4	Fuchskuhle	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	98
Isolat 5	Fuchskuhle	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	98
Isolat 7	Fuchskuhle	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	98
Isolat 9	Fuchskuhle	<i>Polynucleobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	99
Isolat 10	Fuchskuhle	<i>Herbaspirillum</i> sp.	Betaproteobakterien	96
Isolat 11	Fuchskuhle	<i>Flexibacter</i> sp.	<i>Bacteroidetes</i>	92
Isolat 12	Fuchskuhle	unkultiviertes Bakterium	Betaproteobakterien	99

\*basierend auf BLAST-Analyse der Partialsequenzen.

In Kulturen der Großen Fuchskuhle und des Icehouse Pond konnte mittels CARD-FISH Wachstum von limnischen Actinobakterien der *aci*-Sequenzgruppe nachgewiesen werden. Die Zellgröße und -morphologie entsprach denen der abundanten LAB der Ausgangsprobe. In einigen Fällen konnten diese Kulturen auch mehrfach erfolgreich in neues Medium transferiert werden. Die Zelldichte blieb aber jeweils niedrig und das Wachstum dieser Bakterien konnte auch durch Erhöhung der Substratkonzentration nicht stimuliert werden. Die Zelldichte wurde auf  $10^4 - 10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  geschätzt; eine Trübung des Mediums war mit bloßem Auge nicht feststellbar. Der relative Anteil der LAB innerhalb dieser Kulturen variierte stark und reichte von <1% bis zu einer deutlichen Dominanz.

In einer Fuchskuhlen-Kultur konnten nach CARD-FISH mit der *Aci*-840b-Sonde keine nicht-hybridisierten Zellen festgestellt werden. Dieser Befund kann jedoch nicht als Beweis für eine Reinkultur angesehen werden. Das Vereinen von 96 Kulturen einer Mikrotiterplatte oder einzelner Reihen oder Spalten eignete sich nicht zur Durchsatzsteigerung. Dies kann durch das Auftreten von LAB in fast allen Ansätzen mit nachweisbarem Wachstum erklärt werden. Der relative Anteil bzw. die Dominanz der LAB in einzelnen Kulturen konnte nur durch Einzelhybridisierungen festgestellt werden. In den Fuchskuhlen-Kulturen traten die LAB meist in Co-Kultur mit einem Spirocheten-ähnlichen Morphotyp auf (Abbildung 13). Dieser Morphotyp ähnelte den Kontaminanten in den doppelt-sterilfiltrierten Negativkontrollen (siehe oben). Das Ausplattieren von Aliquots auf Gellan Gum- oder Agar-Medium führte nicht zur Ausbildung von sichtbaren Kolonien. Die Fuchskuhlen-Kulturen wurden 2 Monate lang nicht bearbeitet und konnten anschließend nicht erneut transferiert werden.



**Abbildung 13:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Kultur aus der Fuchskuhle. A, DAPI-Färbung; B, CARD-FISH mit der Sonde *Aci*-840b.

Die LAB-Kulturen des Icehouse Pond zeichneten sich durch deutlich schnelleres Wachstum bei 30°C Inkubationstemperatur aus. Nach 5-fachem Transfer schien sich in 2 Kulturen eine stabile Co-Kultur aus LAB (ca 1%) und Vertretern der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe (ca 99%) eingestellt zu haben. Diese Kulturen könnten einen Ausgangspunkt

für Anreicherungsexperimente darstellen: Kann der Anteil der LAB an der Gesamtpopulation durch Zugabe von Glucose angehoben werden?

Aus diesen Kulturen wurden durch Ausplattieren auf Gellan Gum-Platten verschiedene Kolonien erhalten. Die Partialsequenzierung dieser Isolate ergab keine Zugehörigkeit zu den LAB oder der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe (Tabelle 18). Demzufolge besiedelten – in niedrigen Abundanzen – auch noch weitere Phylotypen diese Kulturen.

**Tabelle 18:** Phylogenetische Einordnung von Icehouse Pond-Isolaten.

Isolat	Nächster Verwandter*	Phylogenetische Gruppe	Sequenz-ähnlichkeit [%]
Isolat 2	<i>Moraxella osloensis</i>	Gammaproteobakterien	99
Isolat 3	<i>Micrococcus</i> sp.	Actinobakterien	99
Isolat 4	<i>Micrococcus</i> sp.	Actinobakterien	99
Isolat 5	<i>Oxalobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	98
Isolat 6	<i>Aquaspirillum</i> sp.	Betaproteobakterien	97
Isolat 10	<i>Moraxella osloensis</i>	Gammaproteobakterien	100
Isolat 11	<i>Oxalobacter</i> sp.	Betaproteobakterien	98

\*basierend auf BLAST-Analyse der Partialsequenzen.

**Zusammenfassung.** Die Kultivierung von *acl*-Vertretern der limnischen Actinobakterien im Labor ist möglich, jedoch konnten bisher keine Reinkulturen isoliert werden. Dieser Befund unterstreicht eine andere Schlußfolgerung der vorliegenden Arbeit, nämlich, daß es sich bei den abundanten Zellen der LAB nicht um inaktive Dauer- oder Verbreitungsstadien handelt. Die niedrige Zelldichte zusammen mit dem Unvermögen der Koloniebildung auf festen Nährmedien können als die Hauptursachen des bisherigen Scheiterns der Isolierung der LAB angesehen werden.

## 2.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die phylogenetische Diversität der limnischen Actinobakterien zwar erschlossen, aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Diese Einschätzung ergibt sich aus z.B. der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der FISH-Zählungen mit der Sonde für die gesamte *acI*-Sequenzgruppe (Ac852) und der Summe der FISH-Zählungen mit den Unter-Gruppen spezifischen Ac840-Sonden. Obwohl alle verfügbaren und verlässlichen Sequenztypen von diesen 3 Sonden erfaßt wurden, blieb ein teilweise erheblicher Anteil der LAB undetektiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung weiterer 16S rRNA-Genbanken zur Beschreibung der Diversität. Folgende methodische Veränderungen erscheinen in diesem Zusammenhang sinnvoll: Die Durchführung einer DNA-Extraktion anstelle der PCR direkt vom Membranfilter, sowie die Verwendung von alternativen universellen Primern bzw. verschiedenen Kombinationen von diesen. Es sollte weiterhin auf eine niedrige Zyklenzahl incl. Rekonditionierung (Thompson *et al.*, 2002) geachtet werden. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß die eingesetzten Screening-Primer zu einer Reduzierung der Diversität geführt haben. Um diese Einschränkung zu umgehen, könnten Klone ohne vorheriges Screenen direkt partial sequenziert werden. Bei der Auswahl der Habitats für neue Diversitätsstudien sollten solche mit einem hohen Anteil an nicht-detektierten *acI*-Sequenztypen ausgewählt werden (z.B. Rotfelsessee oder Drachensee).

Die entwickelten Sonden für die Sequenzgruppen *acII* (Ac152 und Ac1243a) und *acIV* (Ac1219b) konnten nur provisorisch ausgetestet werden. Um eine spezifische und verlässliche Hybridisierung zu gewährleisten, wären weitere Experimente mit Kulturen, die eine Fehlpaarung in der Zielsequenz aufweisen (siehe Ac852), Versuche mit der *in vitro*-transkribierten und auf Objektträgern immobilisierten rRNA der Klone (Microarray-Technik) oder slot blot-Hybridisierungen erforderlich (Pernthaler *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen zur Ökologie der LAB können mit kultivierungsunabhängigen und erneuten Kultivierungsversuchen vorangetrieben werden. Die Metagenomik bietet hierfür vielversprechende Werkzeuge: Durch die Entschlüsselung größerer genomischer Abschnitte lassen sich eventuell Rückschlüsse auf den Stoffwechsel oder die ökologische Strategie (Beja *et al.*, 2000) ziehen. Häufig wird bei der Auswertung von Metagenom-Genbanken zunächst nach einem phylogenetischen Markergen gesucht und dann anschließend die flankierenden Bereiche sequenziert. Diese Vorgehensweise ermöglicht die phylogenetische Zuordnung der Sequenzen. Alternativ wurden Modelle getestet, die die Zuordnung aufgrund der Häufigkeit von Tetranukleotiden ermöglichen (Teeling *et al.*, 2004); dazu muß jedoch zunächst die Sequenzinformation vorliegen. Im Falle der Actinobakterien wäre diese Aufgabe eventuell schon durch den molaren G+C-Gehalt eines genomischen Fragments und damit ohne vorheriges Sequenzieren zu lösen. Die so klassifizierten Fragmente (Hoch- oder Niedrig-G+C-Gehalt) ließen sich anschließend auf das Vorhandensein bestimmter Schlüssel-

enzyme (z.B. von Peroxidasen) durchsuchen. Es könnte somit die Frage beantwortet werden, ob die LAB im Vergleich zu den Niedrig-G+C-Organismen einen erhöhten Anteil an diesen für den Huminstoffabbau wichtigen Enzymen aufweisen. Bei diesem methodischen Ansatz ist jedoch zu beachten, daß der hohe molare G+C-Gehalt der LAB nicht nachgewiesen, sondern nur vom G+C-Gehalt des 16S rRNA-Gens abgeleitet wurde. Außerdem kann dieser Wert in den verschiedenen Abschnitten eines Genoms deutlich variieren (Poly *et al.*, 2004). Darüberhinaus beweist das Vorhandensein eines Gens im Genom noch nicht dessen Exprimierung unter *in situ*-Bedingungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden nahezu identische 16S rRNA-Sequenzen aus sehr unterschiedlichen Habitaten gewonnen (z.B. Fuchskuhle und Schöhsee). Weiterhin wiesen stark verschiedene Habitate dominante Populationen von LAB mit vermutlich identischen oder sehr ähnlichen 16S rRNA-Genen auf (z.B. Fuchskuhle und Schwarzsee ob Sölden). Aus der Genom- und Metagenomforschung von pathogenen und nicht-pathogenen Vertretern ist bekannt, daß sich diese Organismen trotzdem grundlegend in ihrer Genomstruktur und ihren ökophysiologischen Eigenschaften unterscheiden können (Beja, 2002; Blattner *et al.*, 1997; Jaspers und Overmann, 2004; Perna *et al.*, 2001). Mithilfe von Metagenom-Genbanken könnte untersucht werden, ob sich die flankierenden Bereiche des rRNA-Operons von *acl*-Vertretern aus verschiedenen Habitaten unterscheiden. Zum Beispiel könnte die vergleichende Sequenzanalyse der Region zwischen 16S und 23S rRNA-Gen (ITS) eine feinere Auflösung der Phylogenie der LAB ermöglichen (Bergamo *et al.*, 2004; Casamayor *et al.*, 2002; Rocap *et al.*, 2002). Bei einer entsprechend hohen Anzahl von Sequenzdaten aus verschiedenen benachbarten und weiter entfernten Seen wären so auch Rückschlüsse auf eine biogeographische Verteilung von Sequenztypen möglich (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003).

Bei der Kultivierung von *acl*-Vertretern konnten erste Erfolge erzielt werden: Sie ließen sich im Labor kultivieren, jedoch bisher nicht in Reinkultur bringen. Für eine erfolgreiche Isolierung wäre eine Verbesserung der Screening-Methoden zur Durchsatzsteigerung notwendig. Dieses Screening könnte mittels PCR durchgeführt werden, wobei jedoch ein effizientes Verfahren zur Entfernung der PCR-hemmenden Huminstoffe aus dem Wasser der Fuchskuhlen gefunden werden müßte. Alternativ könnte das Screening auch wieder über die Hybridisierung von ganzen Zellen mit spezifischen FISH-Sonden erfolgen. Zur Durchsatzsteigerung könnten bis zu 96 Kulturen einer Mikrotiterplatte durch einen Pipettier-Roboter auf einem 47 mm-Membranfilter (mit anliegendem Unterdruck) in einem rechtwinkligen Muster immobilisiert werden. Bei einem Probenvolumen von 10 µl und einer Zelldichte von  $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$  würden durchschnittlich 100 Zellen filtriert. Der Membranfilter könnte anschließend unzerteilt nach Standardprotokoll hybridisiert und auf einem Glasobjektträger befestigt werden. Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale würde in einem Microarray-Lesegerät erfolgen.

Ein Isolat der *acl*-Sequenzgruppe könnte den Ausgangspunkt für die Beschreibung einer neuen Gattung oder Art dienen. Darüberhinaus ließen sich eine Vielzahl von Labor- und Feldversuchen realisieren. Zum Beispiel könnte in Dialyseschlauch-Experimenten das Wachstumsverhalten von LAB-Reinkulturen unter *in situ*-Bedingungen untersucht werden. Im Labor ließen sich künstliche Mischkulturen aus verschiedenen Süßwasserisolaten (Betaproteobakterien der *Polynucleobacter*-Sequenzgruppe, Vertretern der *Bacterioidetes* und den LAB) herstellen und die Wachstumsbedingungen in Bezug auf Kohlenstoffquelle, -konzentration und Art der Zugabe (gleichbleibend niedrige Konzentration oder gepulst; Pernthaler *et al.*, 2001) variieren. Für die Auswertung bzw. das Monitoring der Kulturen sollte eine Methode mit hohem Probendurchsatz gewählt werden. Hierfür würde sich eventuell die Computer-unterstützte Auszählung von FISH-Präparaten (Pernthaler *et al.*, 2003) oder die quantitative PCR eignen (Bach *et al.*, 2003). Die Ermittlung der Bedingungen unter denen die LAB die Konkurrenz-Situation bestehen, würde wichtige Informationen zur Ökologie dieser bedeutenden Gruppe von limnischen Bakterien liefern. Die vergleichende Analyse von LAB-Isolaten aus Flachland- und alpinen Seen könnte darüberhinaus zur Aufklärung von Unterschieden und Resistenzmechanismen gegenüber der UV-Strahlung führen.

## 3 Publikationen

### 3.1 Publikationsliste

**Warnecke, F., R. Amann, und J. Pernthaler. 2004.** Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* **6**:242-253.

**Warnecke, F., R. Sommaruga, R. Sekar, J. Hofer, und J. Pernthaler. 2004.** Abundances, identity and growth state of *Actinobacteria* in high mountain lakes of the Austrian Alps. *In Bearbeitung*.

**Warnecke, F., und F. O. Glöckner. 2004.** Quick Reference Guide for ARB. Version 2.1. [www.arb-home.de](http://www.arb-home.de).

**Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann, und J. Pernthaler. 2003.** Members of a readily enriched  $\beta$ -proteobacterial clade are common in the surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550-6559.

**Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, und R. Amann. 2003.** An Improved Protocol for Quantification of Freshwater *Actinobacteria* by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2928-2935.

**Pernthaler, J., E. Zöllner, F. Warnecke, und K. Jürgens. 2004.** Bloom of Filamentous Bacteria in a Mesotrophic Lake: Identity and Potential Controlling Mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6272-6281.

**Klausen, C., B. W. Strobel, F. Warnecke, J. L. Nielsen, und N. O. G. Jørgensen. 2004.** Occurrence of *Actinobacteria* and production of geosmin and MIB in Danish streams and fish ponds. *Eingereicht bei FEMS Microbiol. Ecology*.

# Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages

Falk Warnecke, Rudolf Amann and Jakob Pernthaler\*

Max Planck Institute for Marine Microbiology,  
Celsiusstraße 1, D-28359 Bremen, Germany.

## Summary

We analysed the phylogenetic relatedness of 16S rRNA genes from freshwater bacteria affiliated with the class Actinobacteria. A polymerase chain reaction assay was developed to identify reliably rare Actinobacteria-related inserts within 16S rRNA gene clone libraries. In 18 libraries constructed from seven freshwater systems, altogether 63 actinobacterial sequence types were collected from a total of >1800 clones. Sixty of the newly obtained sequences grouped within four distinct phylogenetic lineages. They constitute approximately 75% of the nearly complete sequences within these clusters that are presently available. A comparison with >300 sequences from various soil habitats revealed that two of these monophyletic actinobacterial clades (acI and acII) almost exclusively harbour 16S rRNA sequence types from freshwaters and estuaries. This may indicate that such bacteria are not inoculated to freshwaters from terrestrial sources, but are autochthonous components of freshwater microbial assemblages. In contrast, sequence types from freshwaters, marine sediments and soils were clearly mixed in another of the actinobacterial lineages (acIV). Sequence divergence within acIV was the highest of all four lineages (88% minimum similarity), which potentially reflects its radiation across several habitat types. Within the freshwater lineages, groups of essentially identical sequence types were retrieved from geographically distant aquatic systems with strikingly different hydrological and limnological characteristics. This points to the necessity to investigate genotypic variability, *in situ* abundances and activities of these Actinobacteria in freshwater plankton in greater detail by cultivation-independent techniques.

## Introduction

Evidence is accumulating that there are fundamental differences in the composition of marine and freshwater pelagic microbial communities (Méthé *et al.*, 1998; Glöckner *et al.*, 1999; Zwart *et al.*, 2002). One conspicuous group within the freshwater picoplankton are the Actinobacteria. This class of Gram-positive bacteria with a high genomic G+C content comprises a great variety of validly described species and environmental isolates (Iizuka *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2003), including biotechnologically important metabolite and antibiotic producers (e.g. *Corynebacterium glutamicum*, *Streptomyces griseus*). Traditionally, the Actinobacteria have been associated with soil (Goodfellow and Williams, 1983; Rheims *et al.*, 1999). However, the class also accommodates several lineages of 16S rRNA sequences of uncultivated bacteria from various aquatic environments (Hiorns *et al.*, 1997; Méthé *et al.*, 1998; Crump *et al.*, 1999; Rappe *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Donachie *et al.*, 2002; Zwart *et al.*, 2002; Humayoun *et al.*, 2003).

Actinobacteria are probably one of the most abundant groups of freshwater bacterioplankton (Glöckner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*, 2003), yet almost nothing is known about their role in the aquatic environment. Until recently, a direct visualization of these bacteria in environmental samples by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with oligonucleotide probes was hampered by their small cell size and supposedly Gram-positive cell wall (Glöckner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*, 2003). Some Actinobacteria are possibly common in the plankton because they resist protistan predation (Pernthaler *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2003). However, bacteria from this lineage were also abundant in waters of an ultra-oligotrophic high mountain lake where grazing plays a minor role (Glöckner *et al.*, 2000).

Such unresolved contradictions point to the necessity for further differentiating between individual actinobacterial groups in field studies, e.g. by the design of more specific rRNA-targeted FISH probes. Presently, this is hampered by the small number of available full-length 16S rRNA sequences from this lineage. Most previous investigations of microbial diversity of freshwater picoplankton have predominantly produced partial sequence data (Méthé *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 2001; Humay-

Received 11 July, 2003; revised 17 October, 2003; accepted 17 October, 2003. \*For correspondence. E-mail jpernthaler@mpi-bremen.de; Tel. (+49) 421 2028 940; Fax (+49) 421 2028 580.

© 2004 Blackwell Publishing Ltd



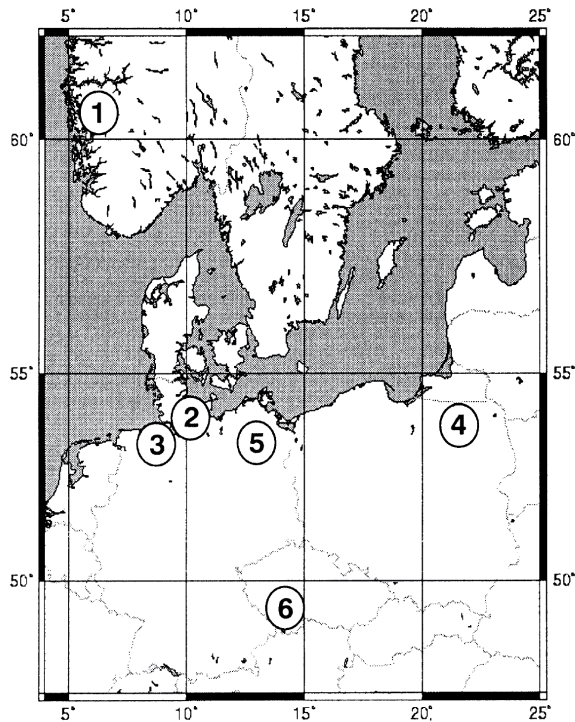


Fig. 1. Map of central Europe indicating the locations of the study sites. 1, Lake Sælenvannet; 2, Lake Schöhsee; 3, Wümmewiesen; 4, Great Masurian Lakes; 5, Lake Fuchskuhle; 6, Rimov Reservoir.

oun *et al.*, 2003). Moreover, many studies have unselectively collected environmental rRNA gene sequences irrespective of their phylogenetic affiliation (Hiorns *et al.*, 1997; Methé *et al.*, 1998; Crump *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001). Although the Actinobacteria are common in various lakes (Sekar *et al.*, 2003), they are, like the marine Bacteroidetes (Cottrell and Kirchman, 2000), apparently under-represented in 16S rRNA clone libraries generated with general bacterial primers.

Consequently, current phylogenies of freshwater Actinobacteria are contradictory, and the 16S rRNA diversity within this ecologically defined group is probably underestimated (Glöckner *et al.*, 2000; Zwart *et al.*, 2002; Humayoun *et al.*, 2003). We therefore selectively collected sequence information of freshwater Actinobacteria from a set of systems that is already in the focus of limnological and microbiological research (Babenzien and Babenzien, 1990; Šimek and Straskrabova, 1992; Jürgens *et al.*, 1994; Tuomi *et al.*, 1997; Kufel and Kufel, 1999) (Fig. 1). In particular, we aimed at providing a more solid phylogenetic framework for this group of abundant environmental bacteria by producing a substantially larger data set of almost full-length 16S rRNA sequences.

© 2004 Blackwell Publishing Ltd, *Environmental Microbiology*, 6, 242–253

## Results

### *Actinobacterial 16S rRNA sequence types in environmental clone libraries*

Clones carrying actinobacterial 16S rRNA inserts could be readily distinguished from those with inserts from other phylogenetic lineages by our polymerase chain reaction (PCR) screening assay (Fig. 2). Fluorescence values after 30 PCR cycles ranged from 0.39 to 1.04 (mean 0.88) for the positive clones, from 0.02 to 0.15 (mean 0.04) for the negative control clones and from 0.00 to 0.02 (mean 0.01) for the no-template controls. Sequence analysis revealed a varying number of mismatches at the target sites of the primers HGC236F and HGC664R. One positive clone had 2 + 4 mismatches to these primers, which was reflected in its low fluorescence signal (0.39). The number of mismatches of the negative control clones at the primer sites varied between 0 + 8 and 6 + 8.

Altogether 18 environmental 16S rRNA gene clone libraries were established from seven different habitats (see Table 1). More than 1800 environmental clones were analysed using the described PCR assay. This led to the identification of 72 clones harbouring Actinobacteria-related inserts (see Table 1). The relative abundances of positive clones within the different clone libraries ranged from 0% (e.g. Lake Sælenvannet, 6 m depth) to 31% (Lake Fuchskuhle south-western basin). Sixty-three nearly full-length 16S rRNA sequences related to the class Actinobacteria were produced. Based on partial sequences, the remaining nine positive clones (Lake Sælenvannet, 1 m and 2 m depth) were found to be identical to already fully sequenced clones from the same libraries and were thus excluded from further analysis.

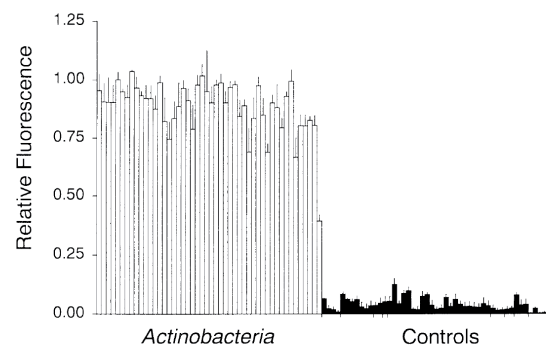


Fig. 2. Discrimination of actinobacterial and non-actinobacterial sequence types in freshwater 16S rRNA clone libraries by PCR screening (relative fluorescence  $\pm 1$  standard error,  $n = 4$ ). Negative controls were clones from freshwater libraries related to other phylogenetic lineages. These were (from left to right): alpha- (4 clones), beta- (7), gamma- (2) and delta-Proteobacteria (1), Bacteroidetes (22), Acidobacteria (3), Gram positive bacteria with low genomic G+C content (2) and Verrucomicrobia (3). The last four data points represent no-template controls.

**Table 1.** Origin of environmental 16S rRNA clone libraries analysed in this study.

Location	Sampling site/habitat	Sampling date	No. of clones	
			Screened	Positive
Řimov Reservoir	River (near inflow)	May 1999	48	5
	Station 3A (half-way of total length)	May 1999	48	1
	Dam (near outflow)	May 1999	48	1
Lake Schöhsee	Parallel library no. 1	July + August 2000 <sup>a</sup>	40	3
Lake Schöhsee	Parallel library no. 2	July + August 2000 <sup>a</sup>	36	4
Lake Schöhsee	Parallel library no. 3	July + August 2000 <sup>a</sup>	43	4
Lake Sælenvannet	1 m water depth	June 2000	184	15
	2 m water depth	June 2000	184	7
	6 m water depth	June 2000	184	0
Masurian Lakes	Niegocin	November 2001	150	6
	Dargin	November 2001	122	3
	North Mamry	November 2001	184	3
Wümmewiesen		February 2002	184	4
Acidic hot spring		April 2002	184	2
Lake Fuchskuhle	South-western basin	January 2002	29	9
	SW basin experimental enrichment		48	0
	North-eastern basin	January 2002	48	5
	NE basin experimental enrichment		48	0
Sum			1812	72

a. Samples from July and August 2000 were pooled.

#### Phylogenetic affiliation of freshwater Actinobacteria

Figure 3 depicts an overview consensus tree that summarizes the 16S rRNA-based phylogeny of more than 400 partial and full-length sequences. The backbone (topology) of this tree was reconstructed using almost complete sequences only (longer than 1400 nucleotides). Sixty of 63 actinobacterial sequences obtained in this study grouped into four distinct phylogenetic clusters (Table 2). These clusters, termed acI, acII, acIII and acIV, remained stable in different types of tree reconstructions (neighbour joining, maximum parsimony, maximum likelihood). They were clearly separated from actinobacterial lineages from soil and marine habitats. Two clones from the Wümmewiesen flood plains were not affiliated with any of the proposed ac clusters, and one clone from Lake Fuchskuhle was affiliated with sequence types obtained from soils.

The molar G+C content of the 16S gene of the ac clusters varied from 53% to 57% (Table 2). The minimal

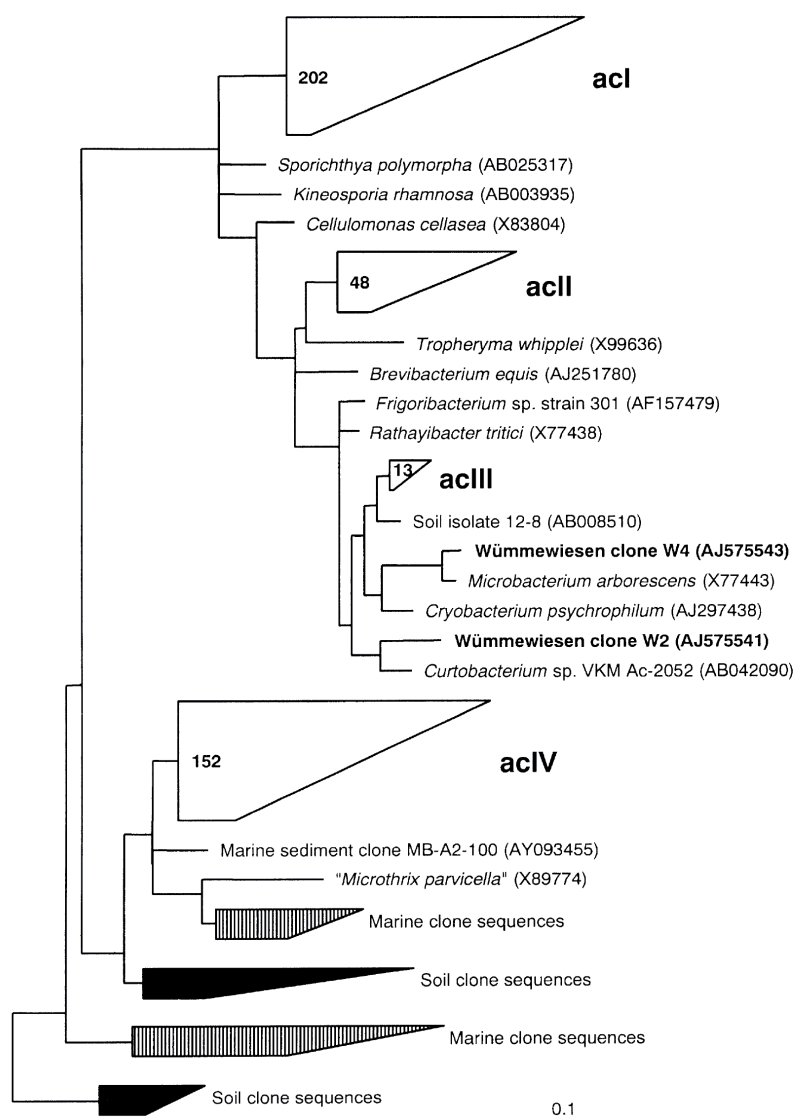
similarities within the individual lineages (sequences longer than 1400 nucleotides) ranged from 88% to 96%. Detailed phylogenetic consensus trees of the proposed freshwater actinobacterial clusters acI–IV are presented in Figs 5–7. In these trees, solid lines depict almost complete sequences (longer than 1400 nucleotides) that were included in the topology-relevant calculations. Dotted lines represent selected partial sequences that were subsequently added to the consensus tree to depict the phylogenetic diversity within clusters.

Actinobacterial sequences from six of the studied habitats were affiliated with cluster acI (none from Lake Sælenvannet) (Fig. 4). Presently, more than 200 environmental clone sequences are positioned within this lineage (Table 2, Figs 3 and 5). Most of these sequences (>95%) originate from lakes, rivers and estuaries (Table 3). Twenty-one of the available 24 nearly complete sequences in cluster acI were produced during this study

**Table 2.** Comparison of the proposed freshwater actinobacterial clusters.

Cluster	Total	No. of sequences		Minimum sequence similarity (%) within each cluster <sup>a</sup>	16S rRNA gene mol% G+C within each cluster <sup>a</sup>
		>1400 nt total	>1400 nt this study		
acI	202	24	21	90	53–55
acII	48	34	23	94	55–56
acIII	13	7	6	96	55
acIV	152	14	10	88	54–57
Outside clusters			3		
Sum			63		

a. Determined using nearly full-length sequences.



**Fig. 3.** Phylogenetic consensus tree of the proposed actinobacterial freshwater clusters. Bifurcations indicate branchings that appeared to be stable and well separated from neighbouring branchings in all calculations, whereas multifurcations indicate tree topologies that could not be resolved unambiguously. For clarity, only a subset of sequences used for calculations is depicted in the tree. Clone sequences obtained in this study are shown in bold. GenBank accession numbers are given in parentheses, and the scale bar indicates 10% estimated sequence divergence. Numbers in the group boxes refer to the total number of available full and partial sequences.

(Table 2). Cluster acI contains no cultured representative. Within this cluster, three separated lineages of at least two nearly complete sequences can be distinguished (Fig. 5). Subcluster acI-A is consistent with cluster ACK-M1 described by Zwart *et al.* (2002), whereas subclusters acI-B and acI-C represent novel lineages.

The acII and acIII clades contain 48 and 13 partial and full-length 16S rRNA gene sequences respectively (Fig. 6). Sequences within cluster acII were obtained from all studied habitats (Fig. 4). Most sequences in this lineage were produced during this investigation. In addition, the cluster harbours sequences of ultramicrobacterial strains that were isolated recently from different lakes in Germany and China (Hahn *et al.*, 2003). Altogether, 83% of all sequence types from this clade have been recov-

ered from freshwater habitats. Two distinct lineages within acII are consistent with the previously described Luna-1 and Luna-2 clusters (Hahn *et al.*, 2003) (acII-B, acII-D). Additionally, two novel lineages of sequences from Lake Sælenvannet (acII-A) and Lake Fuchskuhle, the Řimov Reservoir and the acidic hot spring (acII-C) are proposed. The cluster acIII contains only sequences derived from Lake Sælenvannet, predominantly from the chemocline, and from a hypersaline soda lake in California (Humayoun *et al.*, 2003). It is consistent with the actinobacterial cluster 2 proposed by Humayoun *et al.* (2003). The most closely related cultured representatives of acIII are a soil isolate (Iizuka *et al.*, 1998) and *Cryobacterium psychrophilum* (sequence similarities of 97.2% and 96.6% respectively).

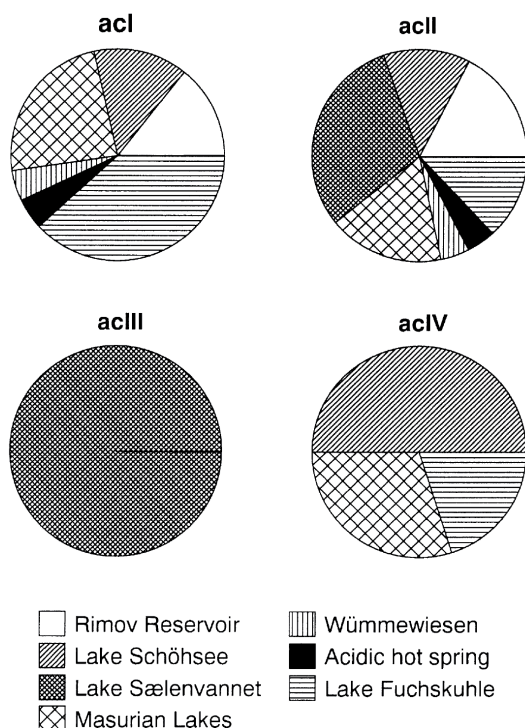


Fig. 4. Relative contribution of the studied habitats to the actinobacterial clusters acI, acII, acIII and acIV. Only three out of the 63 sequences were not affiliated with these clusters.

The actinobacterial cluster acIV contains more than 150 partial and full-length sequences in total (Fig. 7). Again, this cluster harbours no cultured representatives. acIV is predominantly constituted of sequences from freshwaters and estuaries (78%), and a smaller fraction of sequences originates from marine (8%) and soil habitats (7%). Sequence types affiliated to cluster acIV were only retrieved from three of the study sites (Fig. 4). Owing to the limited number of complete sequences, only two separated lineages can be postulated within acIV (acIV-A and acIV-B). The lineage acIV-A is consistent with the previously described cluster CL500-29 (Zwart *et al.*, 2002), whereas the proposed clusters Med0-06 and Urk0-14 (Zwart *et al.*, 2002) are not confirmed by our analysis.

## Discussion

### PCR screening assay

With the rise of environmental metagenomics (DeLong, 2002), protocols for the detection of rare sequence motifs (in particular of specific rRNA genes) in large clone libraries are of increasing importance. We screened 18 libraries by PCR with the specific primers HGC236F and HGC664R (Glöckner *et al.*, 2000) to produce a large set of 16S rRNA sequences affiliated with the Actinobacteria. This was essential because of the low frequencies of such sequence types in our libraries (mean <5%). We wanted to minimize the risk of losing potentially novel actinobacterial lineages by setting the PCR conditions to relatively low stringencies without affecting the reliability of the assay (Fig. 2). Indeed, more than half the positive actinobacterial clones contained inserts with one or two mismatches to the general actinobacterial primers/probes HGC236 and HGC664. This implies that a substantial fraction of the collected actinobacterial phylotypes would not have been detected in lakewater samples by FISH with these probes at optimal hybridization conditions (Glöckner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*, 2003) or by PCR at stringent conditions. Moreover, in contrast to sequence collection by PCR with group-specific primers (Stach *et al.*, 2003), our protocol recovers almost full-length sequences, which is essential for FISH probe design and reliable phylogenetic analysis. In fact, our low-stringency PCR screening assay was probably essential for the detection of the freshwater actinobacterial groups. The novel primers S-C-Act-235-a-s-20 and S-C-Act-878-a-s-19 proposed by Stach *et al.* (2003) have one mismatch each to sequences from clusters acII and acIII, and acI-A and acI-B respectively.

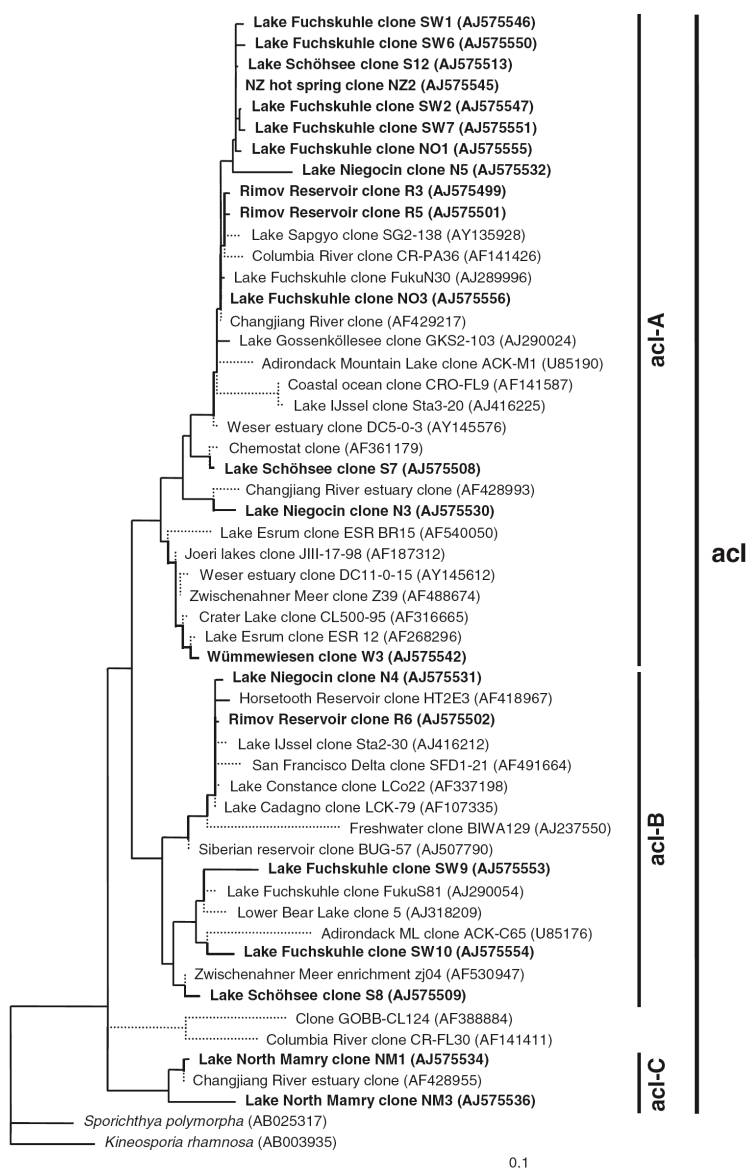
### Reliability of phylogenetic analysis

Our phylogenetic reconstructions are partially in contradiction with previous analyses (Urbach *et al.*, 2001; Zwart *et al.*, 2002; Humayoun *et al.*, 2003), and they also outline hitherto undetected lineages within individual actinobacterial clusters (e.g. acI-C, acII-A, acII-C) (Figs 5 and 6). These results underline the importance of using almost full-length sequences for the reconstruction of microbial

Table 3. Origin of sequences affiliated with the freshwater actinobacterial clusters.

Cluster	Origin of sequences in clusters (%)									
	Lake	River	Estuary	Hypersaline soda lake	Hot spring	Flooded pasture	Soil	Marine	Activated sludge	Unknown
acI	65	17	13	0	1	1	0	1	0	2
acII	75	2	6	0	11	2	0	2	0	2
acIII	0	0	46	54	0	0	0	0	0	0
acIV	39	26	13	3	1	1	7	8	1	1





**Fig. 5.** Detailed view of phylogenetic relationships within the freshwater actinobacterial cluster actI, formerly termed hgcl (Glöckner *et al.*, 2000). Solid lines indicate sequences that were included in the primary analyses (i.e. sequences longer than 1400 nucleotides), whereas dotted lines indicate partial sequences. Clone sequences produced during this study are shown in bold, and GenBank accession numbers are given in parentheses. For clarity, only selected partial sequences are included in this tree. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.

phylogenies (Ludwig and Klenk, 2001). Altogether, our investigation contributes >75% of almost complete sequences to the proposed freshwater actinobacterial clades (Table 2). Owing to the sequencing of different 16S rRNA regions, previous comparative studies have typically reduced the number of alignment positions to the overlapping region of all partial and full-length sequences of interest (Zwart *et al.*, 2002). Hence, previous phylogenetic tree reconstructions have been performed considering only about 200–400 bp, which is less than one-third of the information used for our analyses.

The major techniques for the reconstruction of 16S rRNA sequence relatedness are based on different hypo-

thetical models of evolution, neither of which can be proven or dismissed (Ludwig and Klenk, 2001). Therefore, bootstrapping statistics of one particular treeing method (Crump *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2003; Humayoun *et al.*, 2003) may even conceal branching uncertainties that originate either from the biases of the chosen evolutionary model or from the undersampling of diversity within a particular microbial lineage (Hughes *et al.*, 2001). We therefore compared different treeing approaches during our phylogenetic analysis, and we limited our precision to the minimal phylogenetic information that could be reliably reconstructed by our sequence data set. Consequently, multifurcational topologies were introduced if contradic-

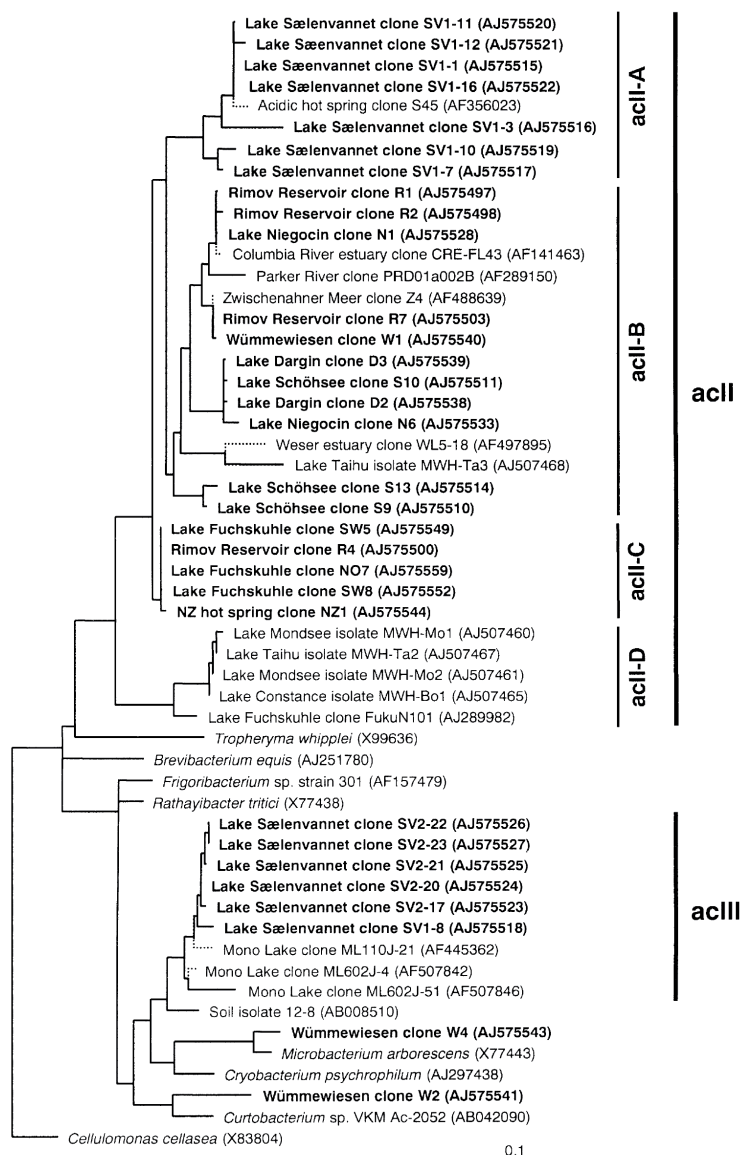


Fig. 6. Detailed view of the phylogenetic relationships within the freshwater actinobacterial lineages acII and acIII. For a further description, see the legend to Figs 3 and 5.

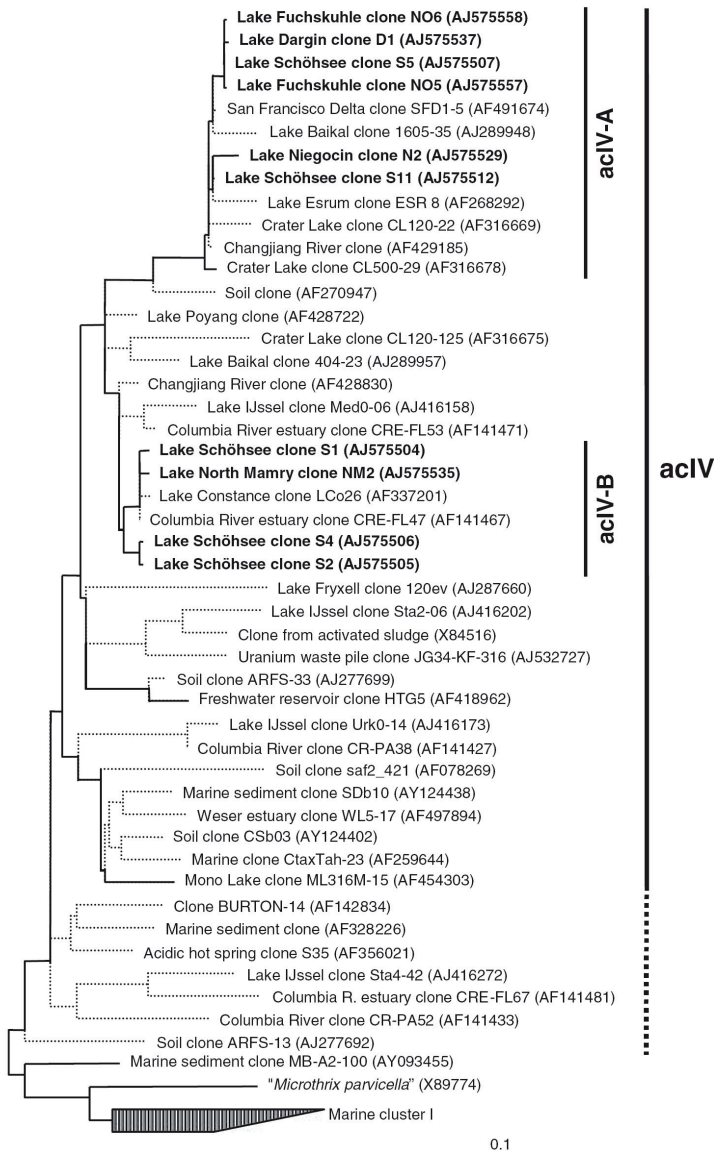
tions between the calculation methods could not be resolved unambiguously (e.g. Fig. 3).

#### *Autochthonous pelagic Actinobacteria?*

In evolutionary timescales, the freshwater pelagic zone might represent an independent stage for the evolution of an autochthonous planktonic microbial community. Alternatively, it might only be regarded as a transient enrichment system for bacterial lineages from other habitats, e.g. the catchment. A comprehensive phylogenetic analysis of actinobacterial 16S rRNA sequence types from freshwaters and other environments might help to decide

between such hypotheses. For example, if the latter scenario was correct (i.e. distinct evolutionary lineages of limnic bacteria do not exist), then the actinobacterial 16S rRNA sequences from the different freshwaters should fall into numerous, deeply branching clades. All these lineages should moreover contain a considerable fraction of sequence types obtained from other environments.

Such a simple pattern is not supported by our data. The large majority of the sequences in the acI and acII clades originate exclusively from freshwater habitats (Table 3). Although the closest relative of acI could not be defined unambiguously, the two highly diversified lineages were nevertheless of monophyletic origin in all performed anal-



**Fig. 7.** Detailed view of the phylogenetic relationships within the freshwater actinobacterial lineage acIV. For a further description, see the legend to Figs 3 and 5. Note that the lower reaches of this cluster are supported by only two almost complete sequences.

yses (Fig. 3). Phylogenetic evidence therefore suggests a single ancestral acI and acII 16S rRNA sequence type and a subsequent adaptive radiation within the freshwater pelagic zone (Figs 5 and 6). In contrast, cluster acIV also harbours a considerable fraction of sequence types from soils, from marine waters and sediments and from brackish water habitats (Fig. 7, Table 3). Moreover, this lineage is closely related to other clades of uncultured Actinobacteria from the marine plankton, sediments and from soils. Members of acIV have apparently radiated across several fundamentally different habitat types.

The conspicuous accumulation of sequences from freshwater systems in acI and acII is a rather counterintuitive result, considering the close physico-chemical connection between terrestrial and aquatic systems via influx from the catchment area. One might argue that a parallel molecular survey of the watershed soil from which the samples were taken would be essential to confirm or reject the freshwater origin of the proposed actinobacterial clusters. However, although the presence of sequences related to our clusters in such libraries from the catchment areas might have been evidence that these clusters do

not represent freshwater lineages, their absence would not have proved the opposite. Interestingly, two of the three actinobacterial sequence types that did not affiliate with any of the proposed freshwater clades originated from the Wümmewiesen flood plains (Fig. 3). This again supports the notion of autochthonous aquatic lineages that are not passively inoculated from the catchment. In clone libraries from the Columbia river, Crump *et al.* (1999) found sequences related to the acl clade in the particle-attached fraction (Fig. 7). However, this is no evidence for a terrestrial origin, because particles in large rivers may well be autochthonously generated (Grossart and Ploug, 2000). In view of the several hundred 16S rRNA gene sequences that have so far been retrieved from various terrestrial habitats, it is furthermore unlikely that another clone library would have substantially revised the current picture of actinobacterial diversity in soils (Rheims *et al.*, 1999). Instead, our investigation was designed to compensate for this unbalance and analyse comparably sized data sets from the two habitat types.

#### Limitations of 16S rRNA diversity analysis

The present study should, however, not be confused with a truly biogeographic investigation (Papke *et al.*, 2003). The analysis of 16S rRNA genes is an essential first step in unveiling the diversity of freshwater Actinobacteria, and provides new ideas about the restriction of the proposed actinobacterial clades to particular habitat types. For example, no sequence types from these groups were detected in the library from the anoxic layer of Lake Sælenvannet. Similarly, Humayoun *et al.* (2003) recovered Actinobacteria-related sequences from the oxic surface water and the chemocline of meromictic Mono Lake, but never from the anoxic zone.

Yet there might be considerable genotypic and physiological diversity beneath the resolution of the 16S rRNA gene. Recent biogeographic studies on microbes have therefore relied upon more rapidly evolving molecular clocks (Crosbie *et al.*, 2003; Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003). Presently, it is still discussed whether biogeographic discontinuities as, e.g. reported by Whitaker *et al.* (2003), are actually rather exceptional for free-living microbes (Fenchel, 2003). Our data nevertheless hint at ecologically relevant diversity within the studied Actinobacteria lineages that could not be resolved by our approach. Groups of nearly identical phylotypes from up to three completely different habitats were obtained in three of the four freshwater clusters (Figs 5–7). For example, within cluster acl, identical sequence types were found in the humic Lake Fuchskuhle, the oligomesotrophic Schöhsee and the acidic hot spring in New Zealand (Fig. 5). This agrees with recent observations by Hahn *et al.* (2003) who isolated actinobacterial strains with iden-

tical 16S rRNA sequences but contrasting physiological traits from very different freshwaters.

Secondly, far-reaching deductions about sequence types based on the habitat they are obtained from may be misleading, because all information about their relative abundances is lost during PCR amplification (Cottrell and Kirchman, 2000). Thus, it cannot be decided by this type of study whether a specific phylotype is common or rare in the environment. FISH or equivalent techniques (MacGregor *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1998; Papke *et al.*, 2003) would be required to quantify the frequencies of members of the individual lineages in the different habitats. There is nevertheless ample evidence that some of these actinobacteria must be among the most common bacteria in freshwaters (Glöckner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*, 2003). In order to prove that a particular actinobacterial group is indeed indigenous to a specific environment, it would furthermore be important to show that it is also capable of growth, e.g. by immunocytochemical or autoradiographic techniques (Pernthaler *et al.*, 2002; Cottrell and Kirchman, 2003). In this context, it is important to note that so far the only successful enrichment of members from the acl cluster was observed in experimental conditions designed to mimic a typical freshwater scenario (high grazing mortality) (Posch *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 2001).

Particular sequence types in environmental 16S rRNA gene clone libraries might sometimes be the result of contaminating DNA (Tanner *et al.*, 1998). It has been suggested that the main sources of this contamination are the chemicals and enzymes used for the preparation of genomic DNA (Tanner *et al.*, 1998). All the actinobacterial 16S rRNA sequences in this study were amplified directly by PCR from cells on membrane filters (Kirchman *et al.*, 2001), thus omitting this critical step. Furthermore, several of our clone libraries did not contain any of the identical sequence types (e.g. Lake Sælenvannet clone library from the anoxic zone), which should have been the case if these sequences had originated from contamination.

In summary, the water column of various oligo- to hypertrophic freshwaters appears to harbour actinobacterial 16S rRNA sequence types that are predominantly affiliated with only four major phylogenetic lineages. Particular identical actinobacterial sequence types were obtained from very different environments. This suggests that these bacteria might be physiologically highly diversified (Hahn *et al.*, 2003), and might have undergone adaptive radiation into different habitats in evolutionary rather recent times. However, without information about *in situ* abundances and activity, the role of these phylotypes in the studied habitats remains unknown. Our collection of almost complete 16S rRNA gene sequences nevertheless provides a comprehensive data set for the design of specific FISH probes, and thus forms a base for future eco-



logical studies about these actinobacterial lineages in freshwater habitats.

## Experimental procedures

### Study sites and sampling

Water samples were collected from a variety of freshwater habitats in Europe (Fig. 1) and from one site in New Zealand (Table 1). These habitats differ substantially in size, trophic state, stratification stability, food webs, water chemistry and other parameters. We put a focus on meso- to eutrophic freshwaters, as oligotrophic systems are better covered by recent studies (Hiorns *et al.*, 1997; Methé *et al.*, 1998; Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001). The meso-eutrophic, dimictic Rimov Reservoir is located in southern Bohemia, Czech Republic (Šimek and Straskrabova, 1992). Lake Schöhsee is an oligomesotrophic shallow lake in northern Germany (Jürgens *et al.*, 1994). Lake Sælenvannet is a meromictic lake in western Norway. The oxic and anoxic strata are separated by a steep salinity gradient (Tuomi *et al.*, 1997). Samples were obtained from oxic waters (1 m), from the chemocline (2 m) and from the anoxic zone (6 m). The lakes Niegocin, Dargin and North Mamry are three interconnected eu- to hypereutrophic lakes in the Great Masurian Lake District, Poland (Kufel and Kufel, 1999). The Wümmewiesen are Germany's largest flood plains, an agricultural pasture land near the city of Bremen that is flooded during the winter months by the river Wümme. Sulphur Point is an acidic hot spring in the Rotorua thermal area, New Zealand (geographic location not shown on Fig. 1) with an average temperature of 53°C and a pH of 2.5. This habitat was included because recently 16S rRNA sequences related to freshwater Actinobacteria have been reported from similar systems (Donachie *et al.*, 2002). Lake Fuchskuhle is a small meso- to acidotrophic and dystrophic forest lake in the Brandenburg-Mecklenburg lake district, Germany (Babenzien and Babenzien, 1990). In 1990, the lake was artificially divided into four basins with different catchment areas, two of which were sampled for this study. Two enrichments of 0.8 µm filtrates from these basins were also included in the screening.

Samples (10–50 ml) were fixed with formaldehyde (2% final concentration) for 2–24 h and filtered onto membrane filters (type GTTP; pore size 0.2 µm; diameter 47 mm; Millipore). Filters were stored at –20°C until further processing.

### Environmental 16S rRNA gene clone libraries

Small subunit rRNA genes were amplified using the primers GM3F and GM4R, specific for the domain Bacteria (Muyzer *et al.*, 1995). Small pieces of the membrane filters were added directly to PCR tubes as inocula, and PCRs were performed as described previously (Kirchman *et al.*, 2001). The resulting PCR product was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and ligated into the pCR4-TOPO vector using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The transformed cells were plated on LB agar plates containing 50 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and incubated overnight at 37°C. Clones were picked and transferred into microtitre plates (MTP) containing 100 µl of LB medium amended with 50 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and

cultivated overnight at 37°C. Glycerol (50% final concentration) was added to each well, and the MTPs were stored at –80°C until further processing. Subsequently, these MTPs served as master plates for the inoculation of the PCR assays.

### Screening of clone libraries

For the detection of actinobacterial phylotypes, the environmental clone libraries were screened by PCR with the primers HGC236F (5'-GCGGCCTATCAGCTTGTT-3', *Escherichia coli* position 236–253) (Brosius *et al.*, 1981) and HGC664R (5'-AGGAATCCAGTCTCCCC-3', position 664–681). These primers were derived from FISH probes that specifically target Actinobacteria (Glöckner *et al.*, 2000). The accumulation of the ≈430 bp amplicons was detected with an ABI SDS 7700 instrument ('Taqman', Applied Biosystems) using the double-stranded DNA-binding dye SYBR Green I®. One microlitre of the respective clone culture was added to 11 µl of PCR mixture [1× ABI SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems), 5 pmol of each primer] in the wells of ABgene PCR-MTPs. Reactions were performed in the following conditions: initial denaturation at 50°C for 2 min and at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles consisting of denaturation (15 s at 95°C), annealing (30 s at 52°C) and extension (1 min at 72°C). Each PCR-MTP featured one well with a positive control (previously sequenced actinobacterial clone) and one well with a no-template control. The relative fluorescence values after 30 PCR cycles were used to detect clones with actinobacterial 16S rRNA inserts.

The reliability of the specific PCR assay was tested by assembling 48 actinobacterial clones and 44 negative control clones in one MTP. These negative controls represented sequenced clones of phylogenetic lineages commonly found in freshwater 16S rRNA gene clone libraries, e.g. alpha-, beta-, gamma-, delta-Proteobacteria, Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroidetes, Acidobacteria, Gram-positive bacteria with low genomic G+C content and Verrucomicrobia. Four replicate PCR-MTPs with this assemblage were subsequently subjected to independent PCR runs.

### Sequence analysis and phylogenetic reconstruction

Plasmids were isolated from clones with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Sequencing reactions were performed using the ABI BigDye® chemistry and an ABI 3100 genetic analyser (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For sequencing, the following primers were used: GM1F (Muyzer *et al.*, 1993), M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13R (5'-CAGGAAA CAGCTATGAC-3'). Partial sequencing files were assembled and corrected manually using the software SEQUENCHER (Gene Codes). Sequencing reactions were repeated if the obtained partial sequences contained ambiguities, so that, on average, more than five sequencing reactions per assembled sequence were performed. The mean number of ambiguous bases per almost complete sequence was <1, and double or triple coverage was given for >500 bases. The assembled sequences were tested for chimeric origin with the program CHIMERA\_CHECK (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Phylogenetic analyses were performed using the ARB software package (<http://www.arb-home.de>). The ARB database (release June 2002) was completed with actinobacterial sequences deposited in GenBank. All sequences were automatically prealigned using the ARB tool FAST\_ALIGNER, and subsequently checked and corrected manually considering the secondary structure of the rRNA molecule. The complete data set contained 4831 partial and full-length small subunit rRNA sequences affiliated with the class Actinobacteria. Actinobacterial sequences used for the phylogenetic analyses are available in aligned ARB format from the authors.

For the reconstruction of phylogenetic trees, only nearly complete 16S rRNA sequences (i.e. longer than 1400 nucleotides; 2533 sequences) were considered. A 50% base frequency filter was calculated on these sequences to exclude highly variable positions. The respective ARB tools were used to perform maximum parsimony (MP), neighbour-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) analyses. All 2533 sequences were considered for the first two algorithms and up to 130 selected sequences for the ML analyses. The calculation methods were combined with different filters, correction models and outgroups. The ML analyses were repeated with different subsets of the sequences to evaluate the stability of the obtained tree topology. The resulting phylogenetic trees were compared manually. The final consensus tree shows bifurcations only if branchings appeared to be stable and well separated from neighbouring branchings in the great majority of analyses. Multifurcations were introduced if tree topologies could not be resolved unambiguously. Partial sequences (shorter than 1400 nucleotides) were added to this consensus tree with the respective ARB tool according to maximum parsimony criteria, without allowing changes in the overall tree topology and applying a 50% base frequency filter for Actinobacteria.

#### Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rRNA gene sequences of the actinobacterial clones obtained during this study were deposited in GenBank with the following accession numbers: AJ575497 to AJ575559 (see also Figs 3, 5, 6 and 7).

#### Acknowledgements

We would like to thank the following people for providing samples: Michal Masin and Karel Šimek (Řimov Reservoir); Klaus Jürgens (Schöhsee); David Bourne, Lise Øvreås and Vigdis Torsvik (Lake Sælenvannet); Agnieszka Skowronska (Masurian Lakes); Ron Ronimus and Hugh Morgan (acidic hot spring); Ulrike Burkert (Lake Fuchskuhle). We thank Frank Oliver Glöckner for helpful discussions on phylogenetic analysis. The excellent technical support by Silke Wetzel is acknowledged. This study was supported by the German Ministry of Education and Research (BIOLOG, BMBF 01 LC0021/TP4) and by the Max Planck Society.

#### References

Babenzien, D., and Babenzien, C. (1990) Microbial activities in a naturally acidotrophic lake. *Arch Hydrobiol Beih* **34**: 175–181.

- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., and Noller, H.F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**: 107–127.
- Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5116–5122.
- Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr* **48**: 168–178.
- Crosbie, N.D., Pockl, M., and Weisse, T. (2003) Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5716–5721.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., and Baross, J.A. (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3192–3204.
- DeLong, E.F. (2002) Microbial population genomics and ecology. *Curr Opin Microbiol* **5**: 520–524.
- Donachie, S.P., Christenson, B.W., Kunkel, D.D., Malahoff, A., and Alam, M. (2002) Microbial community in acidic hydrothermal waters of volcanically active White Island, New Zealand. *Extremophiles* **6**: 419–425.
- Fenchel, T. (2003) Biogeography for bacteria. *Science* **301**: 925–926.
- Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., and Amann, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3721–3726.
- Glöckner, F.-O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., and Amann, R. (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5053–5065.
- Goodfellow, M., and Williams, S.T. (1983) Ecology of Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **37**: 189–216.
- Grossart, H.P., and Ploug, H. (2000) Bacterial production and growth efficiencies: direct measurements on riverine aggregates. *Limnol Oceanogr* **45**: 436–445.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M.G., Boenigk, J., and Stadler, P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- Hiorns, W.D., Methe, B.A., Nierzwicki-Bauer, S.A., and Zehr, J.P. (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2957–2960.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., and Bohannon, B.J.M. (2001) Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4399–4406.
- Humayoun, S.B., Bano, N., and Hollibaugh, J.T. (2003) Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1030–1042.

- Iizuka, T., Yamanaka, S., Nishiyama, T., and Hiraishi, A. (1998) Isolation and phylogenetic analysis of aerobic copiotrophic ultramicrobacteria from urban soil. *J Gen Appl Microbiol* **44**: 75–84.
- Jürgens, K., Arndt, H., and Rothhaupt, K.O. (1994) Zooplankton-mediated change of bacterial community structure. *Microb Ecol* **27**: 27–42.
- Kirchman, D.L., Fuchs, L.Y., Yu, B.M., and Amann, R. (2001) Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquat Microb Ecol* **26**: 13–22.
- Kufel, I., and Kufel, L. (1999) Spatial variability and long-term changes of the trophic parameters in Great Masurian Lakes (Poland). *Polish J Ecol* **47**: 323–333.
- Ludwig, W., and Klenk (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Vol. 1. Garrety, G.M. (ed.). New York: Williams & Wilkins, pp. 49–65.
- MacGregor, B.J., Moser, D.P., Alm, E.W., Nealson, K.H., and Stahl, D.A. (1997) *Crenarchaeota* in Lake Michigan sediment. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1178–1181.
- Méthé, B.A., Hiorns, W.D., and Zehr, J.P. (1998) Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol Oceanogr* **43**: 368–374.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695–700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1995) Phylogenetic relationship 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.
- Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M., and Ward, D.M. (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ Microbiol* **5**: 650–659.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., and Amann, R. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archaea* in a high mountain lake. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4299–4306.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, A., Glöckner, F.O., *et al.* (2001) Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2145–2155.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Schattenhofer, M., and Amann, R. (2002) Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5728–5736.
- Posch, T., Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, S., Nedoma, J., Sattler, B., *et al.* (1999) Predator-induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquat Microb Ecol* **18**: 235–246.
- Rappe, M.S., Gordon, D.A., Vergin, K.L., and Giovannoni, S.J. (1999) Phylogeny of actinobacteria small subunit (SSU) rRNA gene clones recovered from marine bacterioplankton. *Syst Appl Microbiol* **22**: 106–112.
- Rheims, H., Felske, A., Seufert, S., and Stackebrandt, E. (1999) Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. *J Microbiol Methods* **36**: 65–75.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., and Amann, R. (2003) An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2928–2935.
- Šimek, K., and Straskrbova, V. (1992) Bacterioplankton production and protozoan bacterivory in a mesotrophic reservoir. *J Plankton Res* **14**: 773–787.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., and Bull, A.T. (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol* **5**: 828–841.
- Tanner, M.A., Goebel, B.M., Dojka, M.A., and Pace, N.R. (1998) Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3110–3113.
- Tuomi, P., Torsvik, T., Heldal, M., and Bratbak, G. (1997) Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2181–2188.
- Urbach, E., Vergin, K.L., Young, L., Morse, A., Larson, G.L., and Giovannoni, S.J. (2001) Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnol Oceanogr* **46**: 557–572.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W., and Taylor, J.W. (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**: 976–978.
- Zwart, G., Crump, B.C., Agterveld, M., Hagen, F., and Han, S.K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141–155.

**ABUNDANCES, IDENTITY AND GROWTH STATE OF *ACTINOBACTERIA* IN  
HIGH MOUNTAIN LAKES OF THE AUSTRIAN ALPS**

Falk Warnecke<sup>1</sup>, Ruben Sommaruga<sup>2</sup>, Raju Sekar<sup>1</sup>,  
Julia S. Hofer<sup>2</sup>, and Jakob Pernthaler<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany

<sup>2</sup>Institut of Zoology and Limnology, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

Running head: Actinobacteria in Austrian mountain lakes

intended as article in Applied and Environmental Microbiology  
appropriate section: General Microbial Ecology

\*Corresponding author:

Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie

Celsiusstraße 1

D-28359 Bremen

Phone: +49 421 2028940

email: [jperntha@mpi-bremen.de](mailto:jperntha@mpi-bremen.de)

The occurrence of microbes from the class *Actinobacteria* was studied in the surface waters of 10 oligo- to mesotrophic alpine lakes situated between 900m and 2800m above sea level. A set of oligonucleotide probes was constructed to distinguish individual lineages within this group by means of fluorescence in situ hybridisation (FISH) and tyramide signal amplification. Bacteria of a single phylogenetic lineage, the *acl* subcluster, were found to represent >90% of all *Actinobacteria* in the studied lakes. *Acl Actinobacteria* constituted up to 60% of the total bacterial cell numbers. Within this lineage, 3 distinct genotypic subpopulations could be distinguished, which each formed large populations in only some of the lakes. A potential relationship was investigated between the relative importance of *Actinobacteria* in the various microbial assemblages and ambient levels of solar ultraviolet (UV) radiation. In the subset of lakes situated above the timberline, the proportions of bacteria from the *acl* lineage was highly significantly correlated with the modeled *in situ* diffuse attenuation coefficient of UV-B radiation at 320 nm ( $r^2 = 0.73$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=8$ ). The abundances of growing actinobacterial cells was estimated by FISH and immunocytochemical detection of bromodeoxyuridine incorporated into *de novo* synthesized DNA. The fractions of active *Actinobacteria* corresponded well to the average percentage of bacteria with visible DNA synthesis. This indicates that cells from this lineage were not passively introduced from the catchment. We conclude that *Actinobacteria* constituted an important autochthonous element of the microbial assemblages in the studied lakes.



## INTRODUCTION

Members of the class *Actinobacteria* (40) have been traditionally regarded as inhabitants of soil habitats (12), but increasing evidence is accumulating that these bacteria are present (14, 19, 22, 42, 43, 45, 48) and even numerically abundant (7, 11, 32) in freshwater habitats as well. In fact they may represent an integral part of the indigenous microflora of many freshwaters (46).

Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes (FISH) allows a reliable quantification of defined microbial populations at the single cell level (1, 27). Until recently, the direct analysis of freshwater *Actinobacteria* by FISH was hampered by their small cell size and the low signal intensities obtained with fluorescently monolabeled probes. This problem has been recently overcome using horseradish peroxidase labeled probes and catalyzed reporter deposition (CARD) (25) in combination with a permeabilisation and fixation protocol specifically optimized for freshwater bacterioplankton (32). In order to better understand the role of *Actinobacteria* in various types of freshwater systems, it is now important to distinguish between those phylogenetic groups that have been defined by comparative analysis of 16S rRNA gene sequences (11, 44, 45). For this purpose, highly specific FISH probes are needed to determine the abundances of individual populations at an ecologically meaningful level of taxonomic resolution.

However, the occurrence of particular actinobacterial phylotypes in the water column does not necessarily imply that these bacteria are an actively growing element of the respective bacterioplankton assemblage. Alternatively, they might also be passively introduced by influx from the catchment or from terrestrial sources (18). Many cultivated *Actinobacteria* are known to perform a cell cycle which may involve a vegetative and a resting stage (i.e., spores). These spores are highly resistant to unfavourable environmental conditions and can survive for extended periods of time (17). It is, therefore, believed that this life strategy fosters the survival and dispersal of actinobacterial species in soils. Potentially, the actinobacterial phylotypes found in freshwaters are thus but resting stages of predominantly soil-dwelling allochthonous microorganisms. In order to prove that this phylogenetic group is an indigenous component of freshwater planktonic microbial assemblages, it is necessary to demonstrate a potential for cell growth *in situ*, e.g. by visualization of DNA *de novo* synthesis at the single cell level (26).

Solar ultraviolet (UV) radiation is harmful to various aquatic microorganisms, including viruses, bacteria, and unicellular eucaryotes (16, 36, 41), and it is known to inhibit bacteria-mediated processes (37). Tolerance to UV radiation has been related to the solar UV levels present in an organism's natural habitat (8). The first sequence types of freshwater *Actinobacteria* were reported from acidified lakes in the Adirondack mountains (14). Subsequently, high densities of these bacteria were found in the water column of an alpine lake

exposed to high levels of UV radiation (11, 38). It is thus conceivable that freshwater *Actinobacteria* might be favoured in bacterioplankton assemblages of high mountain lakes that are exposed to high levels of solar UV radiation.

In order to explore this possibility, eight alpine lakes located at different altitudes above the timberline (>1500m above sea level [a.s.l.]) and two lakes situated below 1000m a.s.l were chosen for a comparative study of microbial community composition at contrasting UV attenuation characteristics (17). The microbial assemblages in these lakes were analyzed using a set of FISH probes, and focussing on the dominant populations of *Actinobacteria*. In addition, immunocytochemical detection of DNA de novo synthesis (26) was applied to assess the relative proportions of growing *Actinobacteria* in the different lakes, as compared to the total number of growing cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling sites and scheme.** A set of 10 mountain lakes in the Tyrolean Alps (Austria) were selected for sampling: Schwarzsee ob Sölden (SOS), Rotfelssee (ROT), Gossenköllesee (GKS), Geirneggsee (GEI), Oberer Plendelesee (OPL, Mittlerer Plendelesee (MPL), Drachensee (DRA), Seebensee (SEE), Achensee (ACH), and Piburgersee (PIB) (Table 1). These lakes are located at altitudes between 913 and 2799 m above sea level (a.s.l.) and have been in the focus of previous limnological investigations (17, 38, 39). Eight study sites were oligotrophic high mountain lakes of varying transparency above the timberline. Two lakes below 1000 m a.s.l. (ACH and PIB) were included for comparison. Samples of lake surface water were collected between 16 and 22 July 2003 with a 5-liter Schindler-Patalas sampler. Water was stored in the dark and at *in situ* temperature until further processing (usually within 1 h after sampling). Subsamples for FISH analysis (50 ml) were fixed immediately with an equal volume of ethanol (final concentration, 50%) for 24 h, filtered onto white polycarbonate membrane filters (type GTTP; pore size, 0.2  $\mu\text{m}$ ; diameter, 47 mm; Millipore, Eschborn, Germany), and washed with 10 ml of deionized particle-free water. Filters were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing.

**Physical & chemical parameters.** Water samples were analysed with respect to temperature, pH, conductivity, alkalinity, the concentration of dissolved organic carbon (DOC), the concentration of chromophoric DOM (CDOM) and phytoplankton pigments (chlorophyll a and phaeophytin). The *in situ* diffuse attenuation coefficients of UV-B radiation at 320 nm,  $K_d320$ , were deduced from CDOM concentrations using the empirical model of Laurion *et al.* (17). A PUV-500A radiometer (Biospherical Instruments, Inc., San Diego, CA.) was used to measure depth profiles of downwelling irradiance at 320 nm in GKS, ACH and PIB in order to verify the calculated  $K_d320$  values. These profiles were obtained on sunny days within 3 h of solar noon.

**Oligonucleotide probe design and probe testing.** Based on a previously published phylogenetic analysis of a set of 16S rRNA sequences (44) oligonucleotide probes for (FISH) were designed for 4 lineages of freshwater *Actinobacteria* and for subgroups within these lineages.

The search for discriminatory oligonucleotides was performed using the software packages ARB (20) and Primrose (3). In Primrose about 2000 aligned actinobacterial sequences were exported from the ARB database and utilized as a non-target background dataset. Subsequently, groups of sequences from the 4 actinobacterial clusters acI-acIV (44) or from subgroups within



these clusters were exported as the target for the automatic probe design. Primrose - as opposed to ARB - has the ability to design probes with wobbles, i.e., alternative bases at specific positions. Potential probes were always checked against the complete ARB database using the ARB tool Probe\_Match, and against the sequences publically available in Genbank via a BLAST search. Probes were subsequently evaluated according to their coverage of target groups, the number and location of mismatching nucleotides to non-target hits, and the potential *in situ* accessibility of their respective target site on the 16S rRNA (5). A list of newly designed and previously published probes that were applied for the community analysis of the bacterioplankton in the study sites is given in Table 2.

Due to a lack of cultivated representatives of the *acl* lineage, and the unobtainability of cultured strains from the *aclI* cluster (13), different approaches for the establishment of specific hybridization conditions were followed. For probe *Acl*-852 a series of hybridizations with increasing formamide concentrations in the hybridization buffer (formamide series, 30-70%) was performed in parallel on an environmental sample (Schwarzsee ob Sölden) and on cells from a culture of *Actinoplanes philippinensis* (DSMZ 43019). This organism features a single base mismatch to the probe at a central location of the probe target site on the 16S rRNA. It was, therefore, comparable to other database entries of uncultured microbes outside the *acl* group that feature such a mismatch. Probe *Acl*-1214 is targeted to the same group as *Acl*-852, i.e., the *acl* lineage (Table 2). Stringent hybridization conditions for *Acl*-1214 were established by comparative analysis of the fraction of hybridised cells in several environmental samples at increasing stringency (i.e., concentrations of formamide in the hybridization buffer). The hybridization conditions for probes *Acl*-840a to *Acl*-840c were derived from those reported by Glöckner et al (11) for probe HG1-840, and were subsequently recalculated for CARD-FISH hybridization at 35°C (30% of formamide instead of 10%).

**Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH.** Fluorescence *in situ* hybridization with horseradish peroxidase labeled probes and tyramide signal amplification was performed as previously described (25) using the modified permeabilization protocol developed for freshwater bacterioplankton (32). The specificity of the hybridizations at 35°C was ensured by addition of formamide to the hybridization buffers (Table 2). Probe *Acl*-852 and the set of *Acl*-840 probes required the presence of unlabeled helper oligonucleotides to improve the accessibility of the probe target site on the 16S rRNA (10). These helpers were added to the hybridization buffer at the same concentration as the labeled probes (0.5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Counter-staining of CARD-FISH preparations with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), mounting, and microscopic evaluations were performed as described previously (25). Total bacterial abundances and the fractions of FISH-stained bacteria in at least 1000 DAPI-stained cells per sample was quantified

at 1000x magnification on a Zeiss Axioplan II epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

**Leucin and bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation.** Bacterial production was estimated via the incorporation of [<sup>14</sup>C] leucin (Amersham, Amersham, England). Radiolabeled leucin was added at saturating concentrations (20nM) to triplicate subsamples and to one formaldehyde-killed control (3% final concentration). The treatments were incubated at *in situ* temperature in the dark for 1 h and fixed by the addition of formaldehyde (3%). Macromolecule extractions was performed as previously described (37). Measurements of leucin incorporation into bacterial biomass were carried out using a Beckman LS5000TD liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, Calif.).

For the determination of the fraction of cells with DNA *de novo* synthesis (26) portions of 50 ml were incubated in triplicates at *in situ* temperature with 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (final concentration, 20 µM) and thymidine (final concentration, 33 nM) for 4 hours in the dark. Subsequently the samples were fixed with equal volumes of ethanol (final concentration, 50%) and filtered onto polycarbonate membrane filters (type GTTP, diameter, 47mm) as described above for CARD-FISH. One sample that was fixed prior to BrdU and thymidine addition served as control. The immunocytochemical detection of incorporated BrdU in bacterial cells and in members of the *Actinobacteria* was performed using an improved version of the original protocol (26) (A. Pernthaler & J. Pernthaler, in preparation), probes EUB I-III (9), HGC69a (31) and the CARD-FISH procedure of Sekar et al. (32). The fractions of BrdU-incorporating cells in at least 500 probe-positive cells per sample were determined as described before (26) on an Axioplan II epifluorescence microscope (Carl Zeiss) at 1000x magnification.

## RESULTS

**Sampled habitats.** The sampled lakes substantially varied in some of the abiotic parameters (Table 1). The surface water temperature ranged from 11.7 to 23.4°C, the pH varied from 6.25 to 8.41, and DOC concentrations between 0.5 and 2.5 mg l<sup>-1</sup> were determined. As expected the highest DOC concentrations were measured in the lakes situated within a forested catchment area. Bacterial cell numbers varied over one order of magnitude (Table 1). The highest cell densities were found in mesotrophic PIB, the lowest ones in DRA and GKS. The FISH detection

rate of bacteria as determined with the probe set EUBI-III ranged from 63% to 95%, with a trend of higher detection rates in lakes situated at higher altitude.

**Design of FISH probes targeting freshwater *Actinobacteria*.** Two probes targeting the whole *acl* lineage (44) were designed and tested during this study (Table 1). Both probes were found using the Primrose rather than the ARB software. CARD-FISH with probe *acl*-852 at increasing concentrations of formamide revealed that the cells from the *A. philippinensis* culture were no longer visible at 55% formamide in the hybridization buffer (data not shown). This concentration was, therefore, used to determine the abundances of members of the *acl* lineage in the environmental samples (Fig. 1A). Highly similar counts with both probes for the *acl*-lineage, *Acl*-852 and *Acl*-1214 suggested that equivalent populations were targeted, i.e. that specific hybridization conditions had been established. The observed differences ( $\pm 2.5\%$ ) can be considered within the error margin of the FISH counting approach (29).

The probe HG1-840 (11) targeting the *acl* lineage of *Actinobacteria* was originally designed with a wobble at position 6 (G or C). Since we aimed for a higher phylogenetic resolution of actinobacterial community structure these two sequence variants were applied separately (termed probes *Acl*-840a and *Acl*-840b, Table 2). A third sequence variant (*Acl*-840c) was designed manually. Evidence for the high specificities of these three probe variants originated from the contrasting counting results in the environmental samples (Fig. 1b). For example, 23% of total bacterial counts were detected with probe *Acl*-840a in OPL, but only 2% with probe *Acl*-840b (Fig. 1B). In contrast, the majority of bacterial cells in SOS (54%) was detected with probe *Acl*-840b, but only 5% with *Acl*-840a. Based on these observations, unspecific cross-hybridization of the two probes could largely be excluded. Similar unequivocal results were obtained for hybridizations with probes *Acl*-840b and *Acl*-840c (e.g., in ROT and DRA, Fig. 1B).

The application of both probe *Acl*-852 and the *Acl*-840-probe set was hampered by a low *in situ* accessibility of the 16S rRNA target site, as suggested by their location in the lowest accessibility classes IV and V, respectively (5). Consequently, 2 helper oligonucleotides (Table 2) were successfully applied to enhance the signal intensities of probe *Acl*-852. The 3 helper oligonucleotides designed by Glöckner et al. (11) proved sufficient to perform FISH with the *Acl*-840a to *Acl*-840c probe set.

**Abundances of *Actinobacteria*.** The relative community contribution of *Actinobacteria* as determined with the general actinobacterial probe HGC69a varied over a wide range, from 3% in MPL to approximately 60% in SOS (Fig. 1A). FISH with 2 subgroup-specific probes (*Acl*-852, *Acl*-1214) revealed that the vast majority of actinobacterial phylotypes in the studied habitats belonged to the *acl* lineage (Fig. 1A). This was further supported by low counts with other probes

targeting the A-C subclades of the *aciI* lineage, the *aciI* D clade or "Luna" cluster (13), and the *aciV*-A-B subclusters of the *aciV* clade (data not shown).

Large cell populations were detected by the subgroup-specific probes Acl-840a and Acl-840b in several of the investigated habitats (Fig. 1B). For example, SOS was dominated by the Acl-840b sequence type. In contrast, GKS and OPL harbored significant populations detected by probe Acl-840a, but only low numbers of sequence type Acl-840b. In some habitats (e.g. ROT and DRA) a substantial proportion of the *aci* lineage, as determined with *aci*-852, could not be detected with either of the two probes (e.g., ROT, DRA, Fig. 1B). This led to a re-investigation of sequence data within the *aci* lineage. Only one of the nearly complete sequences in this cluster was not detected by either probe Acl-840a and Acl-840b because of a single base mismatch with probe Acl-840b (Fig. 2). Additionally, 9 partial sequences in the dataset carried the same single nucleotide exchange. These sequences originate from three independent studies from the river Weser (33), the eutrophic lake Zwischenahner Meer (6), and from a Siberian reservoir (42). Thus a sequencing artefact appeared unlikely. Counts with the corresponding probe Acl-840c (Table 2) revealed a maximum contribution of this sequence type of 20% in ROT, 18% in DRA, and 5% in PIB.

**Abundances of  $\beta$ -proteobacteria.**  $\beta$ -proteobacteria also represented a substantial fraction of cells in some of the bacterial communities (Fig. 3). Counts with the general probe Bet42a varied between 7% to 38%, with the lowest contribution in eutrophic PIB and the highest counts in oligotrophic SEE. Only a relatively low fraction of  $\beta$ -proteobacteria could be assigned to two freshwater subgroups -as defined by Glöckner et al. (11)- with specific probes targeted to the beta I (34) and beta II lineages (7).

**Growth state of the bacterial populations.** DNA de novo synthesis via BrdU incorporation could be successfully detected in freshwater *Actinobacteria* (Fig. 4). The incubation experiments revealed total densities of approximately  $0.2-0.8 \times 10^6$  DNA-synthesizing bacteria  $\text{ml}^{-1}$  in lakes GEI, MPL and PIB (Fig. 5A). The smallest population of cells with visible DNA de novo synthesis was detected in DRA. Bulk incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ] leucine varied by about one order of magnitude across the studied lakes (Fig. 4A). Bacteria from the eutrophic PIB showed the highest uptake rate (ca.  $330 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) whereas the lowest values were again found in the oligotrophic DRA (ca.  $33 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

A graphical comparison of the fractions of *Actinobacteria* with visible DNA de novo synthesis versus all BrdU-positive bacteria revealed that there was no significant deviation from the 1:1 line in the majority of studied lakes (Fig. 5B). In SEE and ACH a significantly higher fraction of

dividing *Actinobacteria* was observed, as compared to the community average. On the other hand, there was a smaller than average amount of active *Actinobacteria* in the microbial assemblage from PIB surface waters.

**Actinobacterial abundances and ambient UV radiation.** In 3 of the 10 lakes (GKS, ACH and PIB) the diffuse attenuation coefficient of UVB at 320 nm ( $K_d320$ ) was measured *in situ*. The measured values were very similar to those estimated using the model of Laurion *et al.* (17) (GKS: modeled: 0.22 m<sup>-1</sup>, measured: 0.25 m<sup>-1</sup>; ACH: modeled: 1.71 m<sup>-1</sup>, measured: 1.72 m<sup>-1</sup>; PIB: modeled: 2.98 m<sup>-1</sup>, measured: 3.05 m<sup>-1</sup>). The relative contributions of *Actinobacteria* from the acl lineage to the bacterioplankton assemblages was significantly negatively correlated with the estimated  $K_d320$  in lakes above the timberline (Fig. 6A). Seventy three percent of the variation could be explained if the low-altitude lakes ACH and PIB were excluded from the regression. A similarly high significance and correlation coefficient was obtained when the relative abundances of acl-*Actinobacteria* from all 10 lakes were correlated with the absorption at 320 nm normalized to DOC concentration (Fig. 6B). This quotient can be regarded as a proxy for the water color relevant to UV penetration.

## DISCUSSION

**Bacterial populations in alpine lakes.** As illustrated in earlier investigations, oligotrophic alpine lakes are habitats that can be readily studied by FISH (11, 28) or CARD-FISH (32). In our investigation, the detection rates of hybridized bacteria (i.e., the fraction of cells hybridized by probe EUB I-III) were significantly correlated with lake altitude ( $r^2= 0.87$ ,  $P < 0.001$ ) and altitude-related parameters such as DOC or alkalinity (Table 1). At present we can only speculate about this result. It is, e.g., conceivable that high mountain lakes contain smaller fractions of dead bacterial cells (47), bacterial-sized DNA-containing detrital particles (24) or large viruses (35).

Members of the acl clade (44) were the most prominent phylogenetic group of *Actinobacteria* in all of the studied alpine lakes (Fig. 1A). This was confirmed by two newly designed probes (acl-1214, acl-852). At the selected hybridization conditions, acl-852 could readily discriminate a single mismatching base in *A. philippinensis*. Since a similarly powerful testing system was not available for acl-1214, we recommend to use probe acl-852 in future studies about the in situ occurrence of members of the acl clade in freshwaters.

Both newly designed probes cover the acl clade much more completely than the previously published probe HG1-840 (11). This is clearly illustrated in Fig. 1B: The original probe for this lineage designed by Glöckner et al (11) features a G-C wobble at probe position 6 (5'-3'). If the probe was split into its 2 components (acl-840a, acl-840b, Table 1), the sums of cells that hybridized with these two probe variants were significantly smaller than the total fraction of acl-related bacteria (as detected by probe acl-852) in 8 of the 10 studied lakes (Fig. 1B). We, therefore, constructed a third probe modification, acl-840c (G at position 8, Table 1). In several of the studied lakes, a prominent fraction of cells were hybridized by this probe acl-840c (Fig. 1B). For example, >20% of hybridized cells in ROT belonged to this group, which corresponded to >50% of all *Actinobacteria* in this lake. This is evidence that at least 3 distinct subpopulations of the cosmopolitan acl clade may coexist in the water column of neighbouring oligotrophic alpine lakes.

Interestingly, a varying fraction of members of the acl clade (as determined by FISH with 2 cluster-specific probes, acl-852, acl-1214, Fig. 1A) could not be detected by any of the acl-840 probe variants (Fig. 1B). Theoretically, the three acl-840 probes should cover all presently known acl sequence types >1000 nucleotides (Fig. 2). Our FISH results therefore likely point to a hitherto undiscovered phylogenetic diversity within the actinobacterial acl group, indicating a need for the analysis of additional actinobacterial rRNA gene sequences from alpine lakes, e.g. by directed screening of large clone libraries (44).

In contrast, cells from the actinobacterial lineages aclI to aclV were rare or absent in the studied lakes, as determined by other specific FISH probes (data not shown). Specifically, we

found no or only very few bacteria related to the "Luna" cluster (13) (the D subclade) of the acII *Actinobacteria*. Recently, several isolates from this clade have been described (13), and in situ studies have been called for "to reveal the contributions of these bacteria to the bacterioplankton of different freshwater ecosystems". In view of our results, it is likely that these bacterial isolates from the acII clade play a minor role in the plankton of oligo- to mesotrophic alpine lakes (Fig. 1A).

Since our study was focussed mainly on *Actinobacteria* we did not attempt an exhaustive community analysis by FISH. Nevertheless, we also determined the abundances of two groups of  $\beta$ -proteobacteria known to form prominent populations in an eutrophic reservoir (probe R-Bt065 for the freshwater beta I clade) (34) and in an acidified forest lake (probe BET2-870 for the freshwater beta II clade) (7). We found evidence for the occurrence of both groups in various lakes, and, e.g., 5% and >10% of all bacteria in GKS and OPL, respectively, were members of the freshwater beta I lineage (Fig. 2). In a previous study, bacterial populations from the beta I clade were observed to form prominent populations in the water column of GKS over periods of several months (28). However, in contrast to the apparent predominance of members of the acI lineage within the freshwater *Actinobacteria* (Fig. 1A), bacteria of the beta I and beta II subgroups typically only represented a minor fraction of all  $\beta$ -proteobacteria in the studied systems (Fig. 2). Presently it remains unknown which are the other numerically important phylogenetic groups of  $\beta$ -proteobacteria in alpine lakes.

**Bacterial growth.** One major goal of this study was to determine whether freshwater *Actinobacteria* represent an active component within the picoplankton assemblages of alpine lakes. Soils are considered to be a typical habitat of many actinobacterial groups (12), so theoretically, such bacteria might be introduced to high mountain lakes as dormant cells from the catchment. Moreover, gram positive freshwater *Actinobacteria* are highly resistant to mortality by protistan grazing (13). If such bacteria thus experience significantly lower elimination rates than representatives from other bacterial lineages, they might not require rapid growth in order to maintain high densities in the water column (30). We, therefore, hypothesized that the fraction of growing *Actinobacteria* would be significantly lower than the community average (i.e. the total fraction of growing bacteria).

However, this was not the case. Between 14 to 33% of bacterial cells (mean, 20%) exhibited visible DNA de novo synthesis (Fig. 5B), as detected by our strategy for the visualization of incorporated BrdU into specific microbial taxa (26) (Fig. 4). The percentage of BrdU-positive *Actinobacteria* was statistically indistinguishable from the total fraction of DNA-synthesizing bacteria across the set of studied lakes, and it was even significantly higher at 2 of the sampling

sites (ACH, SEE, Fig. 5B). Consequently, we have to reject our initial hypothesis that *Actinobacteria* represent a virtually non-growing, inactive component of alpine lake bacterioplankton.

There was no significant correlation between the incorporation of radiolabeled leucine and the total abundances of BrdU-active bacteria ( $r^2 = 0.35$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 5A). It should be noted that the two parameters address conceptionally very different aspects of microbial activity. Leucine uptake is a proxy for the rate of total biomass production, whereas the number of BrdU-positive cells reflects the fraction of cells that are in a progressive state of cell division. Interestingly, the correlation between the two parameters drastically improved ( $r^2 = 0.9$ ,  $P < 0.001$ ) if data from two lakes above the tree line were excluded that exhibited exceptionally high chlorophyll a concentrations (GEI, MPL; Table 1). Substantially higher rates of leucine incorporation normalized to the single BrdU-positive (i.e., growing) cell were observed in these two lakes, as compared to all other study sites (GEI:  $1.3 \text{ fmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , MPL:  $3.8 \text{ fmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; average of other 8 lakes:  $0.6 \text{ fmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). One might speculate that the observed imbalance between the abundances of growing microbial cells and total bacterial biomass production in GEI and MPL might be related to the phytoplankton bloom event, e.g., as a consequence of elevated per-cell activities within specific populations. However, it goes beyond the scope of this study to explore such a hypothesis in detail.

**Are *Actinobacteria* favoured at high solar UV radiation?** One aim of this study was to investigate whether any relationship could be established between the fraction of *Actinobacteria* in the surface bacterioplankton assemblages of alpine lakes and the ambient levels of solar UV irradiation. Thus the sites under investigation were selected to cover a wide range of UV exposure (17). We found a highly significant negative correlation between the modelled UV attenuation coefficient  $K_d320$  and the fraction of *Actinobacteria* in the bacterioplankton of lakes situated above the timberline ( $r^2 = 0.73$ ,  $P < 0.01$ , Fig. 6A). When UV absorption was normalized to the respective water column DOC concentrations, the correlation was also significant if the two lakes below 1000m of altitude were included in the analysis ( $r^2 = 0.69$ ,  $P < 0.01$ , Fig. 6B).

Although many of the genetic mechanisms involved in DNA repair, e.g., *recA*, are virtually ubiquitous in bacteria and there is extensive regulatory overlap of DNA repair and other stress-induced responses (23), there is a wide variation in the phenotypic expression of UV radiation survival among different bacterial species and strains (2). Pigmented bacteria are known to tolerate significantly higher levels of UV radiation (2), as well as species with unusually efficient DNA repair mechanisms such as *Deinococcus radiodurans* (4). The majority of UV-resistant bacterial isolates obtained from surface and subsurface soil habitats were gram positives (2), and the higher resistance of such bacteria has been assigned to components in gram positive cell



walls that may help deflect UV-near photons (15). In addition, a high genomic G+C content of particular bacterial groups bacteria may also play a role in enhanced UV resistance. The anoxygenic phototroph *Rhodobacter sphaeroides* has a 65% G+C base composition (21). Its genome features a significantly higher frequency of CC (rather than TT dimers), as compared to *E.coli*, which has been interpreted as potential cause of higher UV resistance (21).

In summary, our data provide first evidence that *Actinobacteria* from different lineages of the *acl* clade (44) are active members of the microbial assemblages in alpine lakes. Moreover, there appeared to be a relationship between their community contribution in lakes above the timberline and the *in situ* attenuation of solar UV radiation (Fig. 6A). Nevertheless, it should be stressed that a higher UV resistance of *Actinobacteria* would likely be only one amongst several reasons that explain the apparent success of this group in freshwater bacterioplankton: High abundances of such bacteria have also been found in a humic forest lake (7). It furthermore remains unresolved if *acl* is indeed the only dominant freshwater actinobacterial lineage, or if groups such as the *acl*-D ("Luna") cluster (13) might be abundant in other types of lakes. We hope that future investigations about the occurrence and dynamics of specific actinobacterial populations will profit from the FISH probes that have been designed during the course of this study.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Josef Franzoi and Eike Stübner for help during sample evaluation. Rudolf Amann is gratefully acknowledged for continuous support and discussion. This study was supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF 01 LC0021/ TP4) and by the Max-Planck Society.

## REFERENCES

1. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
2. **Arrage, A. A., T. J. Phelps, R. E. Benoit, and D. C. White.** 1993. Survival of Subsurface Microorganisms Exposed to Uv-Radiation and Hydrogen-Peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3545-3550.
3. **Ashelford, K. E., A. J. Weightman, and J. C. Fry.** 2002. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acid Res.* **30**:3481-3489.

4. **Battista, J. R.** 1997. Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:203-224.
5. **Behrens, S., C. Ruhland, J. Inacio, H. Huber, A. Fonseca, I. Spencer-Martins, B. M. Fuchs, and R. Amann.** 2003. In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1748-1758.
6. **Bruns, A., U. Nübel, H. Cypionka, and J. Overmann.** 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1980-1989.
7. **Burkert, U., F. Warnecke, B. H.-D., E. Zwirnmann, and J. Pernthaler.** 2003. Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in the surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550-6559.
8. **Calkins, J., and T. Thordardottir.** 1980. Ecological Significance of Solar Uv-Radiation On Aquatic Organisms. *Nature.* **283**:563-566.
9. **Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434-444.
10. **Fuchs, B. M., F. O. Glockner, J. Wulf, and R. Amann.** 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3603-3607.
11. **Glöckner, F.-O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann.** 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053-5065.
12. **Goodfellow, M., and S. T. Williams.** 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:189-216.
13. **Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler.** 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442-1451.
14. **Hiorns, W. D., B. A. Methe, S. A. Nierzwicki-Bauer, and J. P. Zehr.** 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957-2960.
15. **Jagger, J.** 1983. Physiological effects of near-ultraviolet radiation on bacteria. *Photochem. Photobiol. Rev.* **7**:1-75.

16. **Jeffrey, W. H., R. J. Pledger, P. Aas, S. Hager, R. B. Coffin, R. VonHaven, and D. L. Mitchell.** 1996. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **137**:283-291.
17. **Krsek, M., N. Morris, S. Egan, und E. M. H. Wellington.** 2000. *Actinomycetes*, p. 28-41. In J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego.
17. **Laurion, I., M. Ventura, J. Catalan, R. Psenner, and R. Sommaruga.** 2000. Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnol. Oceanogr.* **45**:1274-1288.
18. **Lindström, E. S., and A. K. Bergstrom.** 2004. Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnol. Oceanogr.* **49**:125-136.
19. **Lindström, E. S., and E. Leskinen.** 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microb. Ecol.* **44**:1-9.
20. **Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acid Res.* **32**:1363-1371.
21. **Mackenzie, C., M. Chidambaram, E. J. Sodergren, S. Kaplan, and G. M. Weinstock.** 1995. DNA repair mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **177**:3027-3035.
22. **Methe, B. A., and J. P. Zehr.** 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia.* **401**:77-96.
23. **Miller, R. V., and T. A. Kokjohn.** 1990. General Microbiology of Recca - Environmental and Evolutionary Significance. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**:365-394.
24. **Nagata, T., and D. L. Kirchman.** 1997. Roles of submicron particles and colloids in microbial food webs and biogeochemical cycles within marine environments, p. 81-103, *Advances in Microbial Ecology*, Vol 15, vol. 15.
25. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann.** 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3094-3101.
26. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, M. Schattenhofer, and R. Amann.** 2002. Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5728-5736.

27. **Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schönhuber, and R. Amann.** 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes, p. 207-226. In J. H. Paul (ed.), *Methods In Microbiology*, vol. 30. Academic Press, San Diego.
28. **Pernthaler, J., F. O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann.** 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archaea* in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4299-4306.
29. **Pernthaler, J., A. Pernthaler, and R. Amann.** 2003. Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2631-2637.
30. **Pernthaler, J., T. Posch, K. Simek, J. Vrba, A. Pernthaler, F. O. Glöckner, U. Nübel, R. Psenner, and R. Amann.** 2001. Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2145-2155.
31. **Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1994. In situ probing of gram positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides [published erratum appears in *Microbiology* 1995 May;141(5):1267]. *Microbiol.* **140**:2849-58.
32. **Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. Amann.** 2003. An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2928-2935.
33. **Selje, N., and M. Simon.** 2003. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:221-237.
34. **Simek, K., J. Pernthaler, M. Weinbauer, K. Hornak, J. Dolan, J. Nedoma, M. Masin, and R. Amann.** 2001. Changes in bacterial community composition, dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2723-2733.
35. **Sommaruga, R., M. Krossbacher, W. Salvenmoser, J. Catalan, and R. Psenner.** 1995. Presence of large virus-like particles in a eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.* **9**:305-308.
36. **Sommaruga, R., A. Oberleiter, and R. Psenner.** 1996. Effect of UV radiation on the bacterivory of a heterotrophic nanoflagellate. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4395-4400.
37. **Sommaruga, R., I. Obernosterer, G. J. Herndl, and R. Psenner.** 1997. Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4178-4184.

38. **Sommaruga, R., and R. Psenner.** 1997. Ultraviolet radiation in a high mountain lake of the Austrian Alps: Air and underwater measurements. *Photochemistry and Photobiology.* **65**:957-963.
39. **Sommaruga, R., R. Psenner, E. Schaffner, K. A. Koinig, and S. Sommaruga-Wograth.** 1999. Dissolved organic carbon concentration and phytoplankton biomass in high-mountain lakes of the Austrian Alps: Potential effect of climatic warming and UV underwater attenuation. *Arctic Antarctic and Alpine Research.* **31**:247-253.
40. **Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Wardrainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov [Review]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
41. **Suttle, C. A., and C. Feng.** 1992. Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3721-3729.
42. **Trusova, M. Y., and M. I. Gladyshev.** 2002. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Microb. Ecol.* **44**:252-259.
43. **Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni.** 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra- oligotrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557-572.
44. **Warnecke, F., J. Pernthaler, and R. Amann.** 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.*:242-253.
45. **Zwart, G., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen, and S. K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141-155.
46. **Zwart, G., E. J. van Hannen, M. P. Kamst-van Agterveld, K. Van der Gucht, E. S. Lindstrom, J. Van Wichelen, T. Lauridsen, B. C. Crump, S. K. Han, and S. Declerck.** 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5875-5883.
47. **Zweifel, U. L., and A. Hagström.** 1995. Total counts of marine *Bacteria* include a large fraction of non-nucleoid-containing *Bacteria* (Ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2180-2185.
48. **Zwisler, W., N. Selje, and M. Simon.** 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:211-225.

**TABLE 1.** Characteristics of sampled lakes

Lake <sup>a</sup>	Longitude		Altitude (m a.s.l.) <sup>b</sup>	Max. depth (m)	Lake area		Catchment area		Temperature (°C)	pH	Alkalinity (µeq l <sup>-1</sup> )	DOC (mg l <sup>-1</sup> )	Chl a (µg l <sup>-1</sup> )	Cell numbers <sup>c</sup> (10 <sup>5</sup> ml <sup>-1</sup> )	EUBI-III <sup>d</sup> (% DAPI)
	N	E			(ha)	(ha)	(ha)	Vegetation							
SOS	46° 57'	10° 56'	2799	18	3,5	18	Exposed rocks	11,7	6,25	8	0,542	1,076	4,6 ± 0,8	91	
ROT	47° 14'	11° 00'	2485	5,5	0,9	33	Exposed rocks	13,2	7,54	126	0,446	0,81	12,2 ± 0,4	91	
GKS	47° 13'	11° 00'	2417	9,9	1,7	30	Exposed rocks	15,6	7,34	93	0,289	0,324	3,1 ± 0,6	81	
GEI	47° 13'	11° 00'	2410	1	0,4	n.a.	Exposed rocks	15,6	7,42	135	0,344	2,36	14,1 ± 1,4	89	
OPL	47° 12'	11° 02'	2344	7,5	2,1	97	Exposed rocks	12,6	7,26	95	0,309	1,458	5,4 ± 0,1	86	
MPL	47° 12'	11° 03'	2317	5,7	1,6	8	Exposed rocks	16,1	6,91	39	0,253	2,525	6,6 ± 0,2	95	
DRA	47° 02'	10° 56'	1874	24	4,5	188	Exposed rocks	14,9	8,33	1390	0,513	0,624	2,7 ± 0,3	82	
SEE	47° 21'	10° 56'	1650	14	6,4	n.a.	Trees	14,5	8,41	1550	0,769	0,856	4,0 ± <0,1	76	
ACH	47° 27'	11° 42'	929	133	680	10500	Trees	20,3	8,41	2640	1,098	0,496	13,0 ± <0,1	64	
PIB	47° 11'	10° 53'	913	24,6	13,4	265	Trees	23,4	8,15	485	2,488	1,735	38,6 ± 0,3	63	

<sup>a</sup> SOS, Schwarzsee ob Söden; ROT, Rottfelsee; GKS, Gossenköllesee; GEI, Geirmeggsee; OPL, Oberer Plenderlesee; MPL, Mittlerer Plenderlesee; DRA, Drachensee; SEE, Seebensee; ACH, Achensee; PIB, Piburgersee; <sup>b</sup> meter above sea level; <sup>c</sup> total cell numbers as determined by DAPI staining; <sup>d</sup> percent of DAPI-stained cells which were hybridized with the eubacterial probe EUBI-III.

**TABLE 2.** Oligonucleotide probes used in this study

Probe	Specificity	Sequence (5' to 3')	Target site (rRNA, 5' position)	FA <sup>a</sup>	Reference
EUB111	Bacteria	GCW GCC WCC CGT AGG WGT	16S, 338	55	Daims <i>et al.</i> , 1999
HGC69a	Actinobacteria	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	23S, 1907	30	Roller <i>et al.</i> , 1994
Ac852	acl lineage of limnic Actinobacteria <sup>b</sup>	AAT GCG TTA GCT GCG TCG CA	16S, 852	55	this study
Ac852-H1	Helper for Ac852	AAA CCG TGG AAG GTY CSC ACA ACT AG	16S, 826	55	this study
Ac852-H2	Helper for Ac852	TCC CCA GGC GGG GCR CTT	16S, 872	55	this study
Ac1214	acl lineage of limnic Actinobacteria <sup>b</sup>	CAT GCG TGC AGC CCA AGA CA	16S, 1214	55	this study
Ac840a	sub-group of acl lineage	TCG CAC AAA CCG TGG AAG	16S, 840	30	this study
Ac840b	sub-group of acl lineage	TCG CAG AAA CCG TGG AAG	16S, 840	30	this study
Ac840c	sub-group of acl lineage	TCG CAG AGA CCG TGG AAG	16S, 840	30	this study
Ac840-H1	Helper for Ac840 probes	CTA GYG CCC AYC GTT TAC GG	16S, 810	30	Glöckner <i>et al.</i> , 2000
Ac840-H2	Helper for Ac840 probes	GTT CSC ACA ACT AGY GCC CA	16S, 820	30	Glöckner <i>et al.</i> , 2000
Ac840-H3	Helper for Ac840 probes	GGG GCR CTT AAT GCG TTA GCT G	16S, 859	30	Glöckner <i>et al.</i> , 2000
Bet42a	Betaproteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S, 1033	55	Manz <i>et al.</i> , 1992
R-BT065	beta I lineage of limnic Betaproteobacteria <sup>c</sup>	GTT GCC CCC TCT ACC GTT	16S, 65	55	Simek <i>et al.</i> , 2001
Bet2-870	beta II lineage of limnic Betaproteobacteria <sup>c</sup>	CCC AGG CCG CTG ACT TCA	16S, 870	55	Burkert <i>et al.</i> , 2003

<sup>a</sup> Percent formamide (FA) in hybridization buffer; <sup>b</sup> as proposed in Warnecke *et al.*, 2004; <sup>c</sup> as proposed in Glöckner *et al.*, 2000

## LEGEND TO FIGURES:

Figure 1: (A) Relative abundances of members of the class *Actinobacteria* and of the *acl* lineage in the surface waters of 10 alpine lakes. (B) Relative abundances of different subgroups of *Actinobacteria* from the *acl* lineage. Asterisks: samples that were analyzed for the presence of subgroup *acl*-840c. A detailed description of the different probes is given in Table 1.

Figure 2: Phylogenetic tree of full (solid lines) and partial (broken lines) actinobacterial 16S rRNA sequences from the *acl* lineage. The colors represent the respective target sequences of the three probes *acl*-840a (blue), *acl*-840b (green), and *acl*-840c (red). Bar: 10% of estimated sequence divergence.

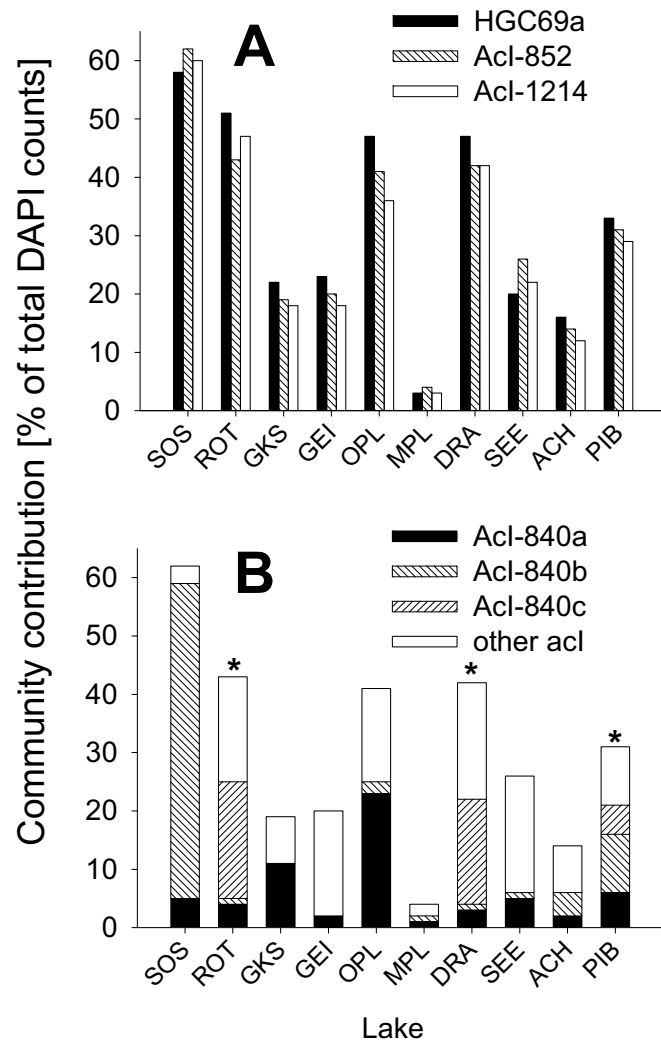
Figure 3: Relative abundances of members of the  $\beta$ -proteobacteria and of the freshwater beta I (probe R-Bt065) and beta II (probe Bet2-870) lineages in the surface waters of 10 alpine lakes.

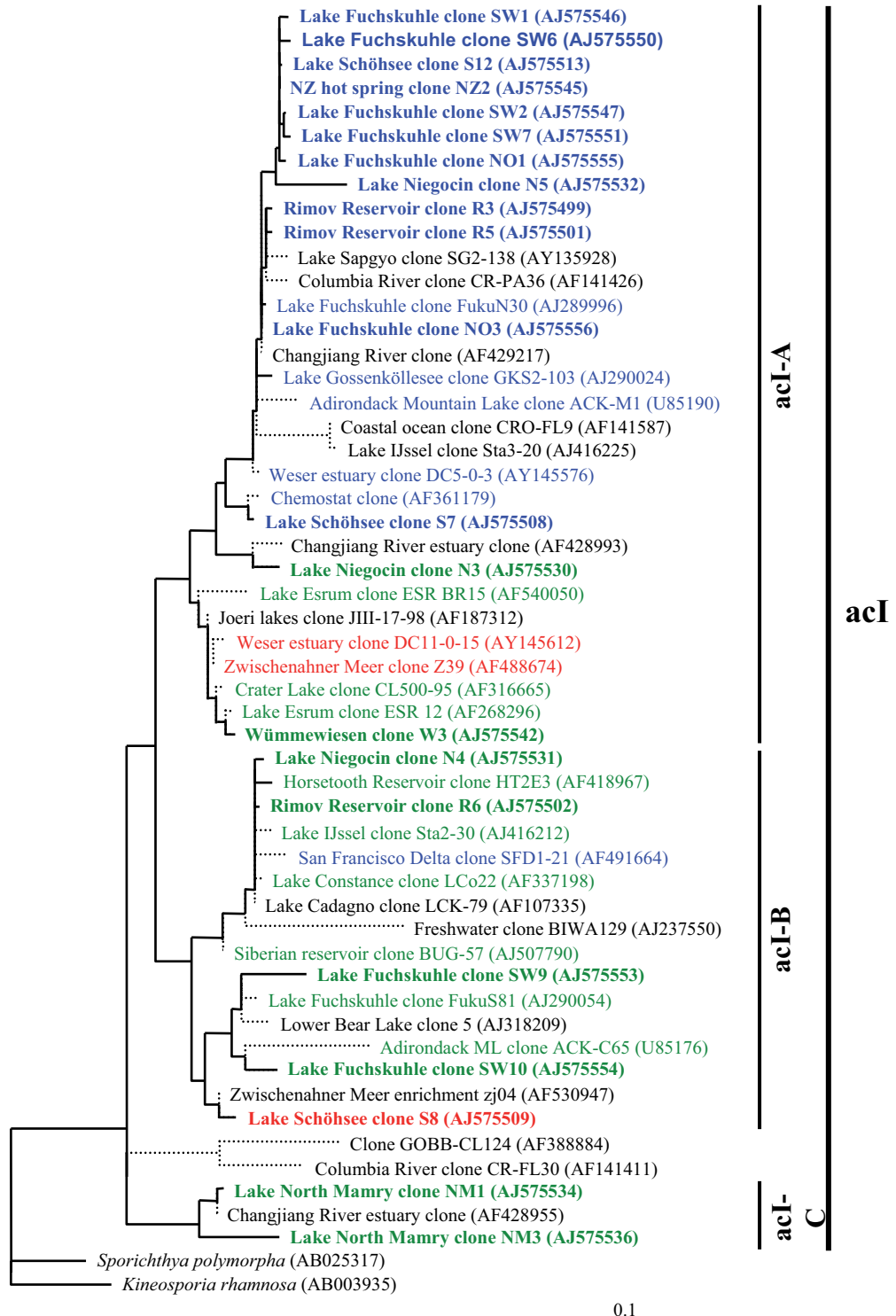
Figure 4: Photomicrographs of (A) hybridized *Actinobacteria* and (B) of all cells with incorporated BrdU (same microscopic field) in the surface waters of GEI. Arrows highlight examples of double-stained cells. Bar, 10  $\mu$ m.



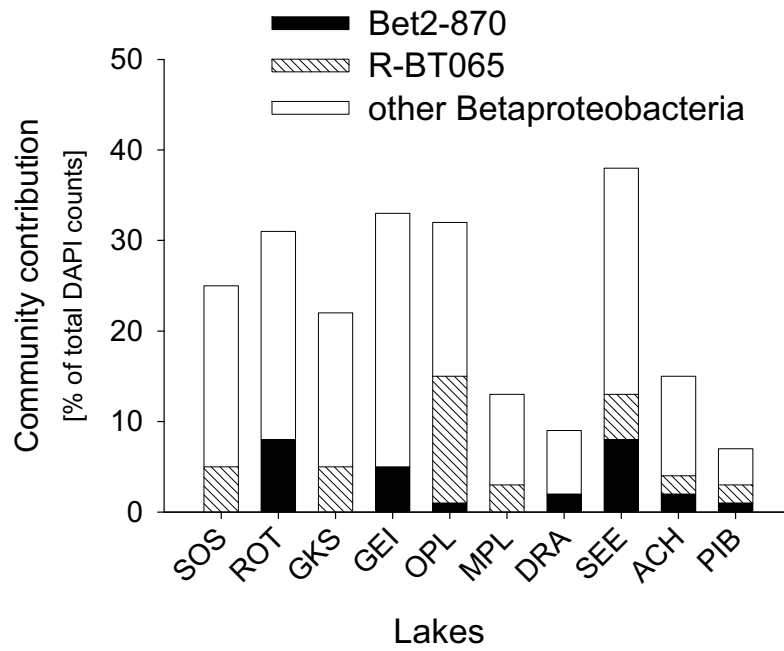
Figure 5: (A) Incorporation rate of [ $^{14}\text{C}$ ] leucine into bacterial biomass and fractions of cells with detectable DNA synthesis (BrdU-positive cells). (B) Comparison of the relative abundances of BrdU-positive *Actinobacteria* with the total fraction of BrdU-positive bacteria in the different lakes. Lakes with significant deviation from a 1:1 relationship (broken line) are labeled.

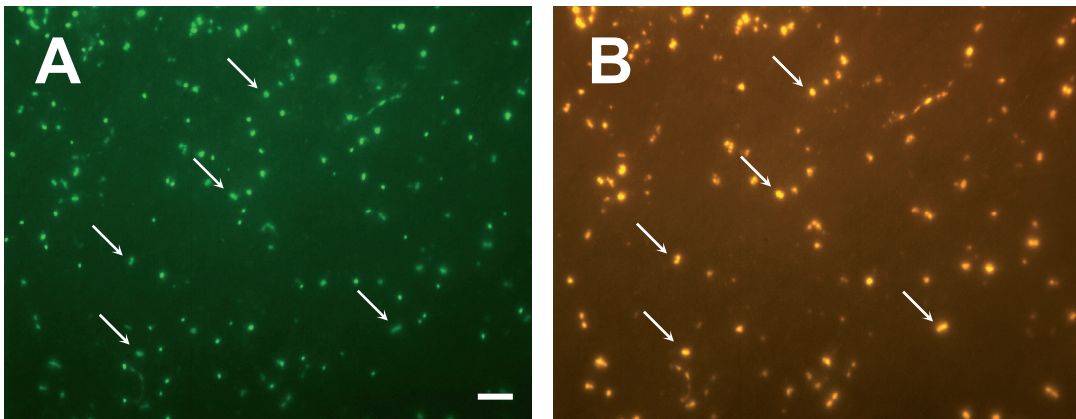
Figure 6: Relationships between the fraction of *Actinobacteria* from the *acl* lineage (as determined by probe *acl*-852) and (A) the modeled diffuse UV-B attenuation coefficient at 320 nm, (B) the UV absorption at 320 nm normalized to the respective concentrations of dissolved organic carbon (DOC). In (A) the two lakes situated below the timberline (open symbols) were excluded from the regression.

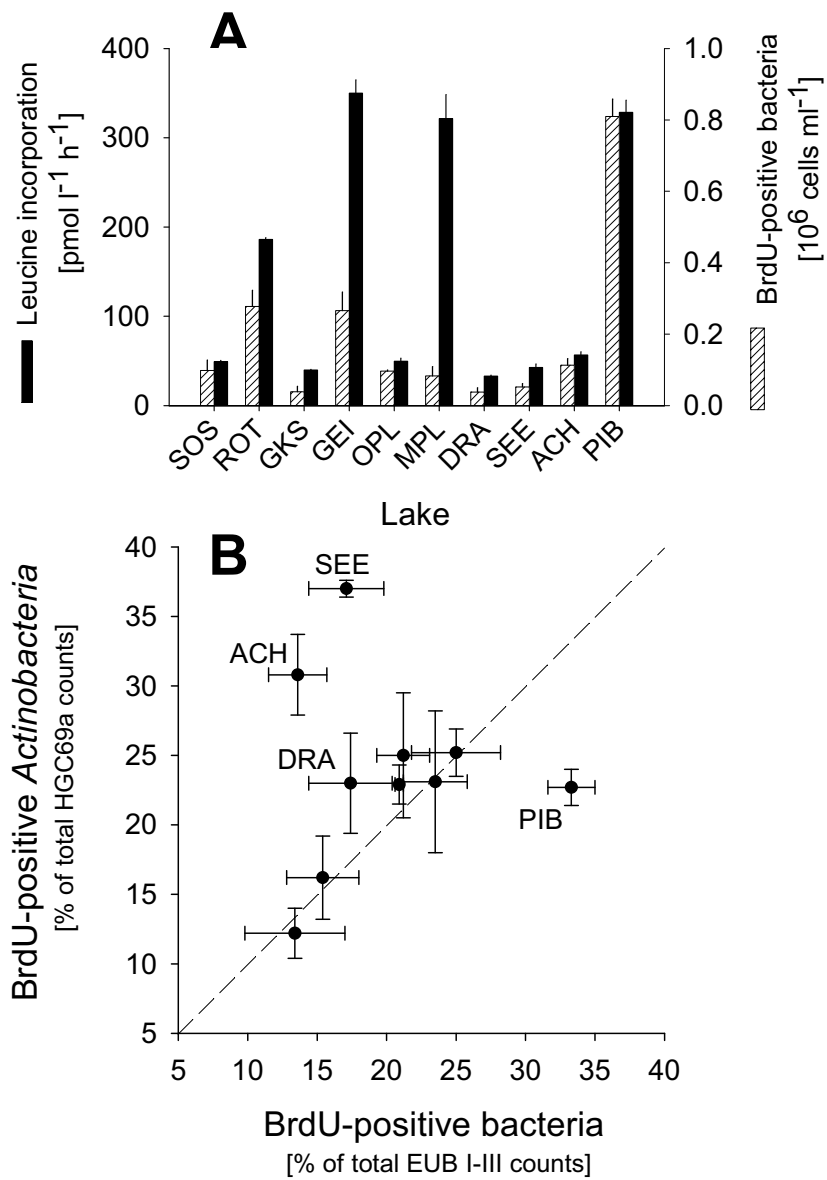


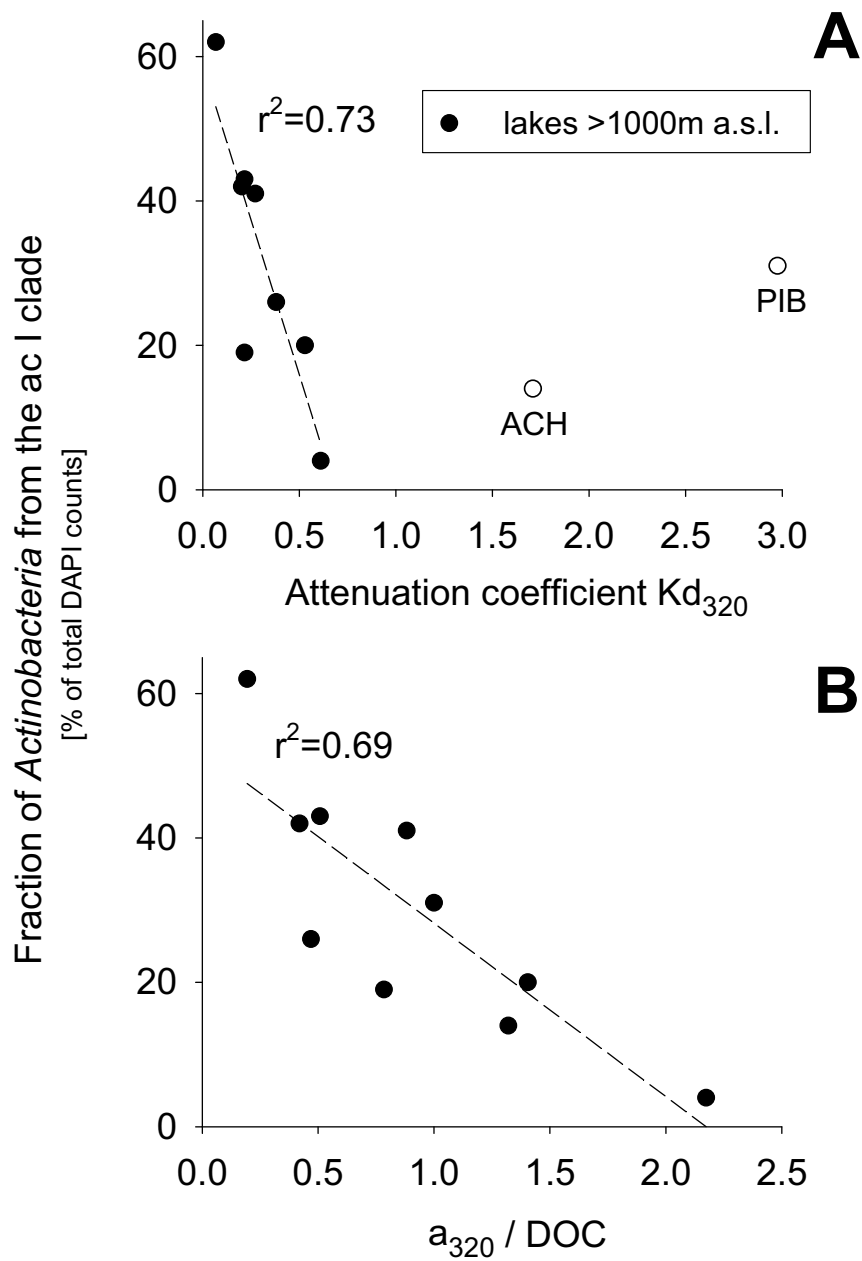


Warnecke *et al.*, FIG. 2









## 4 Literatur

1. **Achenbach, L. A., und J. D. Coates.** 2000. Disparity between Bacterial Phylogeny and Physiology - Comparing 16S rRNA sequences to assess relationships can be a powerful tool, but its limitations need to be considered. *ASM News* **66**:714-715.
2. **Acinas, S. G., V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, C. Pharino, I. Ceraj, D. L. Distel, und M. F. Polz.** 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**:551-554.
3. **Acinas, S. G., L. A. Marcelino, V. Klepac-Ceraj, und M. F. Polz.** 2004. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J. Bacteriol.* **186**:2629-2635.
4. **Admiraal, W., und G. M. J. Tubbing.** 1991. Extracellular Enzyme-Activity Associated with Suspended Matter in the River Rhine. *Freshwater Biology* **26**:507-517.
5. **Alonso, C., und J. Pernthaler.** Uptake of glucose under anoxic conditions by bacterioplankton from coastal North Sea surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.*: Submitted.
6. **Amann, R. I., W. Ludwig, und K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**:143-169.
7. **Andreasen, K., und P. Nielsen.** 1997. Application of Microautoradiography to the Study of Substrate Uptake by Filamentous Microorganisms in Activated Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3662-3668.
8. **Ashelford, K. E., A. J. Weightman, und J. C. Fry.** 2002. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3481-3489.
9. **Atlas, R. M., und R. Bartha.** 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 4th ed. Benjamin/Cummings Science Publ., Menlo Park, California, USA.
10. **Attwell, R. W., und R. R. Colwell.** 1981. *Actinomycetes* in New-York Harbor Sediments and Dredging Spoil. *Marine Pollution Bulletin* **12**:351-353.
11. **Attwell, R. W., R. R. Colwell, und J. Coolbaugh.** 1981. *Actinomycetes*, a Possible Hazard Encountered in Diving Operations. *Marine Technology Society Journal* **15**:36-40.
12. **Babenzien, D., und C. Babenzien.** 1990. Microbial activities in a naturally acidotrophic lake. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **34**:175-181.
13. **Babich, H., und G. Stotzky.** 1977. Sensitivity of Various Bacteria, Including *Actinomycetes*, and Fungi to Cadmium and Influence of Ph on Sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:681-695.



14. **Bach, H.-J., I. Jessen, M. Schloter, und J. C. Munch.** 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Journal of Microbiological Methods* **52**:85-91.
15. **Bahr, M., J. E. Hobbie, und M. L. Sogin.** 1996. Bacterial diversity in an arctic lake: A freshwater SAR11 cluster. *Aquat. Microb. Ecol.* **11**:271-277.
16. **Baker, G. C., J. J. Smith, und D. A. Cowan.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**:541-555.
17. **Bartscht, K., H. Cypionka, und J. Overmann.** 1999. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:249-259.
18. **Becker, S., M. Fahrbach, P. Boger, und A. Ernst.** 2002. Quantitative Tracing, by *Taq* Nuclease Assays, of a *Synechococcus* Ecotype in a Highly Diversified Natural Population. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4486-4494.
19. **Behrens, S., B. M. Fuchs, F. Mueller, und R. Amann.** 2003. Is the *In Situ* Accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4935-4941.
20. **Behrens, S., C. Rühland, J. Inacio, H. Huber, A. Fonseca, I. Spencer-Martins, B. M. Fuchs, und R. Amann.** 2003. *In Situ* Accessibility of Small-Subunit rRNA of Members of the Domains *Bacteria*, *Archaea*, and *Eucarya* to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1748-1758.
21. **Beja, O.** 2002. Light driven environmental genomics. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **66**:A63-A63.
22. **Beja, O., M. T. Suzuki, E. V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L. P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Garrigues, S. B. Jovanovich, R. A. Feldman, und E. F. DeLong.** 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* **2**:516-529.
23. **Bergamo, R. F., M. T. M. Novo, R. V. Verissimo, L. C. Paulino, N. C. Stoppe, M. I. Z. Sato, G. P. Manfio, P. I. Prado, J. Garcia, Oswaldo, und L. M. M. Ottoboni.** 2004. Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S-23S rDNA spacer polymorphism analysis. *Research in Microbiology* **155**:559-567.
24. **Bittl, T., und H.-D. Babenzien.** 1996. Microbial activities in an artificially divided acidic lake. *Arch. Hydrobiol. Advanc. Limnol.* **48**:113-121.
25. **Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, und Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453.

26. **Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedroither, und M. W. Hahn.** 2004. Strain-Specific Differences in the Grazing Sensitivities of Closely Related Ultramicrobacteria Affiliated with the *Polynucleobacter* Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5787-5793.
27. **Bosshard, P. P., Y. Santini, D. Gruter, R. Stettler, und R. Bachofen.** 2000. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:173-182.
28. **Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko, und J. Parker.** 1994. *Biology of Microorganisms*, 7th ed. Prentice-Hall International, Inc., London.
29. **Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, und H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**:107-27.
30. **Bruns, A., H. Cypionka, und J. Overmann.** 2002. Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3978-3987.
31. **Bruns, A., H. Hoffelner, und J. Overmann.** 2003. A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 161-171.
32. **Bruns, A., U. Nübel, H. Cypionka, und J. Overmann.** 2003. Effect of Signal Compounds and Incubation Conditions on the Culturability of Freshwater Bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1980-1989.
33. **Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann, und J. Pernthaler.** 2003. Members of a readily enriched  $\beta$ -proteobacterial clade are common in the surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550-6559.
34. **Bussmann, I., B. Philipp, und B. Schink.** 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **47**:41-50.
35. **Button, D. K., F. Schut, P. Quang, R. Martin, und B. Robertson.** 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:881-891.
36. **Calcott, P. H., und J. R. Postgate.** 1972. Substrate-Accelerated Death in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of General Microbiology* **70**:115.
37. **Casamayor, E. O., R. Massana, S. Benlloch, L. Øvreås, B. Diez, V. J. Goddard, J. M. Gasol, I. Joint, F. Rodriguez-Valera, und C. Pedros-Alio.** 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**:338-348.
38. **Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria, p. 421-436. *In* H. Iizuka and T. Hasegawa (ed.), *Proceedings of the International Conference on Culture Collection*. Univ. Tokyo Press, Tokyo.

39. **Connon, S. A., und S. J. Giovannoni.** 2002. High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3878-3885.
40. **Cottrell, M. T., und D. L. Kirchman.** 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1692-1697.
41. **Cross, T., und M. Goodfellow.** 1973. Taxonomy and classification of actinomycetes, p. 11-112. *In* G. Sykes and F. A. Skinner (ed.), *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Academic Press, London.
42. **Crump, B. C., E. V. Armbrust, und J. A. Baross.** 1999. Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, Its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3192-3204.
43. **Crump, B. C., C. S. Hopkinson, M. L. Sogin, und J. E. Hobbie.** 2004. Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1494-1505.
44. **Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, und J. E. Hobbie.** 2003. Bacterioplankton Community Shifts in an Arctic Lake Correlate with Seasonal Changes in Organic Matter Source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253-2268.
45. **Cummins, C. S., und H. Harris.** 1956. The Chemical Composition of the Cell Wall in Some Gram-Positive Bacteria and Its Possible Value as a Taxonomic Character. *Journal of General Microbiology* **14**:583-600.
46. **Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, und M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**:434-444.
47. **Daims, H., J. L. Nielsen, P. H. Nielsen, K.-H. Schleifer, und M. Wagner.** 2001. *In Situ* Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5273-5284.
48. **Dieffenbach, C. W., T. M. J. Lowe, und G. S. Dveksler.** 1995. General Concepts for PCR Primer Design, p. 133-142. *In* C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler (ed.), *PCR Primer - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
49. **Doolittle, W. F.** 1999. Phylogenetic Classification and the Universal Tree. *Science* **284**: 2124-2128.
50. **Drews, G.** 1983. *Mikrobiologisches Praktikum*. 4.Auflage, Springer Verlag, Berlin.
51. **Eilers, H., J. Pernthaler, und R. Amann.** 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4634-4640.

52. **Embley, T. M., und E. Stackebrandt.** 1994. The Molecular Phylogeny and Systematics of the *Actinomycetes*. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:257-289.
53. **Ensign, J. C.** 1998. Introduction to the *Actinomycetes*. In M. e. a. Dworkin (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3, release ed. Springer-Verlag, New York.
54. **Erhart, R.** 1997. Doktorarbeit. Technische Universität München, München.
55. **Farrelly, V., F. A. Rainey, und E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2798-2801.
56. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
57. **Fenchel, T. M.** 1998. *Bacterial Biogeochemistry*, 2nd ed. Academic Press, London.
58. **Ferguson, R. L., E. N. Buckley, und A. V. Palumbo.** 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:49-55.
59. **Ferris, M. J., A. L. RuffRoberts, E. D. Kocczynski, M. M. Bateson, und D. M. Ward.** 1996. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1045-1050.
60. **Fitch, W. M., und E. Margulias.** 1967. Construction of phylogenetic trees: A method based on mutational distances as estimated from cytochrome c sequences of general applicability. *Science* **155**:279-284.
61. **Fox, G., und E. Stackebrandt.** 1987. The application of 16S rRNA cataloguing and 5S sequencing in bacterial systematics. *Methods Microbiol.* **19**:406-458.
62. **Fox, G. E., K. R. Pechman, und C. R. Woese.** 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal of Bacteriology* **27**:44-57.
63. **Fuchs, B. M., F. O. Glöckner, J. Wulf, und R. Amann.** 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3603-3607.
64. **Fuhrman, J., K. McCallum, und A. Davis.** 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans [published erratum appears in *Appl Environ Microbiol.* **61**:4517]. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1294-1302.
65. **Fuhrman, J. A., und F. Azam.** 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:1085-1095.
66. **Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, und K. G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**:60-63.

67. **Glaeser, J., und J. Overmann.** 2004. Biogeography, Evolution, and Diversity of Epibionts in Phototrophic Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4821-4830.
68. **Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, und R. Amann.** 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3721-3726.
69. **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, und R. Reinhardt.** 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp strain 1. *Proc. of the Natl. Acad. Sci.* **100**:8298-8303.
70. **Glöckner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, und R. Amann.** 2000. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053-5065.
71. **Gochnauer, M. B., G. G. Leppard, P. Komaratat, M. Kates, T. Novitsky, und D. J. Kushner.** 1975. Isolation and Characterization of *Actinopolyspora halophila*, Gen Et Sp Nov, an Extremely Halophilic Actinomycete. *Canadian Journal of Microbiology* **21**: 1500-1511.
72. **Goodfellow, M., und J. A. Haynes.** 1983. *In* F. Bojalil and L. Ortiz-Ortiz (ed.), *The Biology of the Actinomycetes*. Academic, New York.
73. **Goodfellow, M., und S. T. Williams.** 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:189-216.
74. **Guan, L. L., H. Onuki, und K. Kamino.** 2000. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2797-2803.
75. **Hahn, M. W.** 2003. Isolation of Strains Belonging to the Cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* Cluster from Freshwater Habitats Located in Three Climatic Zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5248-5254.
76. **Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, und P. Stadler.** 2003. Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as *Actinobacteria* from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442-1451.
77. **Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, und M. Pockl.** 2004. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **57**:379-390.
78. **Heckmann, K., und H. J. Schmidt.** 1987. *Polynucleobacter necessarius* Gen-Nov, Sp-Nov, an Obligately Endosymbiotic Bacterium Living in the Cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:456-457.

79. **Hiorns, W. D., B. A. Methe, S. A. Nierzwickbauer, und J. P. Zehr.** 1997. Bacterial Diversity in Adirondack Mountain Lakes As Revealed By 16S rRNA Gene Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957-2960.
80. **Hollibaugh, J. T., P. S. Wong, und M. C. Murrell.** 2000. Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**:103-114.
81. **Hugenholtz, P., B. M. Goebel, und N. R. Pace.** 1998. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.
82. **Hugenholtz, P., und T. Huber.** 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:289-293.
83. **Humayoun, S. B., N. Bano, und J. T. Hollibaugh.** 2003. Depth Distribution of Microbial Diversity in Mono Lake, a Meromictic Soda Lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.
84. **Ittekkot, V., U. Brockmann, W. Michaelis, und E. T. Degens.** 1981. Dissolved Free and Combined Carbohydrates During a Phytoplankton Bloom in the Northern North-Sea. *Marine Ecology-Progress Series* **4**:299-305.
85. **Janssen, P. H., P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, und M. Sait.** 2002. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2391-2396.
86. **Jaspers, E., K. Nauhaus, H. Cypionka, und J. Overmann.** 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:153-164.
87. **Jaspers, E., und J. Overmann.** 2004. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4831-4839.
88. **Jones, J. G.** 1977. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology* **7**:67-91.
89. **Jordan, M. J., und M. P. Lechevalier.** 1975. Effects of Zinc-Smelter Emissions on Forest Soil Microflora. *Canadian Journal of Microbiology* **21**:1855-1865.
90. **Jürgens, K., H. Arndt, und K. O. Rothhaupt.** 1994. Zooplankton-Mediated Changes of Bacterial Community Structure. *Microbial Ecology* **27**:27-42.
91. **Kaeberlein, T., K. Lewis, und S. S. Epstein.** 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**:1127-1129.

92. **Keller, M., und K. Zengler.** 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* **2**:141-150.
93. **Kemp, P. F., S. Lee, und J. LaRoche.** 1993. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2594-2601.
94. **Kharel, M. K., B. Subba, H. C. Lee, K. Liou, J. S. Woo, D. H. Kim, Y. H. Moon, und J. K. Sohng.** 2003. Identification of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase in aminoglycoside producer *Streptomyces*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**:828-831.
95. **Kirchman, D., E. Knees, und R. Hodson.** 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:599-607.
96. **Kirchman, D. L., L. Y. Yu, B. M. Fuchs, und R. Amann.** 2001. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**:13-22.
97. **Kisand, V., und J. Wikner.** 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods* **54**:183-191.
98. **Klappenbach, J. A., J. M. Dunbar, und T. M. Schmidt.** 2000. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1328-1333.
99. **Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole, und T. M. Schmidt.** 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* **29**:181-184.
100. **Kreader, C. A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1102-1106.
101. **Krsek, M., N. Morris, S. Egan, und E. M. H. Wellington.** 2000. *Actinomycetes*, p. 28-41. *In* J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego.
102. **Kufel, I., und L. Kufel.** 1999. Spatial variability and long-term changes of the trophic parameters in the Great Masurian Lakes (Poland ). *Polish Journal of Ecology* **47**:323-333.
103. **Küster, E.** 1979. Importance of Actinomycetes for the Decomposition of Cellulose, Lignin, and Humic Substances in Soil. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **142**:365-374.
104. **Kvasnikov, E. L., L. P. Panchenko, und O. A. Nesterenko.** 1978. Nucleotide Composition of DNA of Rapid-Growing Mycobacteria and Related Microorganisms. *Microbiology* **47**:200-203.
105. **LaMontagne, M. G., J. Michel, F. C., P. A. Holden, und C. A. Reddy.** 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* **49**:255-264.

106. **Laurion, I., M. Ventura, J. Catalan, R. Psenner, und R. Sommaruga.** 2000. Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnology and Oceanography* **45**:1274-1288.
107. **Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo, und F. Marinelli.** 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **78**:399-405.
108. **Lechevalier, H. A., und M. P. Lechevalier.** 1967. Biology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**:71-100.
109. **Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K. H. Schleifer, und M. Wagner.** 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1289-1297.
110. **Liesack, W., P. H. Janssen, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey, und E. Stackebrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques, p. 375-439. *In* J. D. van Elsas, J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York.
111. **Lindström, E. S.** 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:163-174.
112. **Lindström, E. S.** 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbial Ecology* **40**:104-113.
113. **Lindström, E. S.** 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: Results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microbial Ecology* **42**: 598-605.
114. **Lindström, E. S., und E. Leskinen.** 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology* **44**:1-9.
115. **Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K. H. Schleifer, und M. Wagner.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5064-5081.
116. **Ludwig, W., und H.-P. Klenk.** 2001. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics, p. 49-65. *In* G. M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition ed, vol. 1*. Williams & Wilkins, New York.
117. **Ludwig, W., und K. H. Schleifer.** 2000. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Systematic and Applied Microbiology* **23**:556-562.



118. **Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, und K. H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363-1371.
119. **Lyons, M. M., P. Aas, J. D. Pakulski, L. Van Waasbergen, R. V. Miller, D. L. Mitchell, und W. H. Jeffrey.** 1998. DNA damage induced by ultraviolet radiation in coral-reef microbial communities. *Marine Biology* **130**:537-543.
120. **MacGregor, B. J., V. Bruchert, S. Fleischer, und R. Amann.** 2002. Isolation of small-subunit rRNA for stable isotopic characterization. *Environ. Microbiol.* **4**:451-464.
121. **Malmstrom, R. R., R. P. Kiene, M. T. Cottrell, und D. L. Kirchman.** 2004. Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4129-4135.
122. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, und K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes For the Major Subclasses of *Proteobacteria* - Problems and Solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**:593-600.
123. **Martin, A. P.** 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3673-3682.
124. **Mercer, D., M. Iqbal, P. Miller, und A. McCarthy.** 1996. Screening Actinomycetes for Extracellular Peroxidase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2186-2190.
125. **Methe, B. A., W. D. Hiorns, und J. P. Zehr.** 1998. Contrasts Between Marine and Freshwater Bacterial Community Composition - Analyses of Communities in Lake George and Six Other Adirondack Lakes. *Limnology and Oceanography* **43**:368-374.
126. **Mitchel, R. E. J., B. P. Smith, N. Wheatly, A. Chan, S. Child, und M. C. Paterson.** 1985. Sensitivity of Hyperthermia-Treated Human-Cells to Killing by Ultraviolet or Gamma-Radiation. *Radiation Research* **104**:234-241.
127. **Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, und G. J. Herndl.** 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8):3518-3525.
128. **Moeseneder, M. M., C. Winter, J. M. Arrieta, und G. J. Herndl.** 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *Journal of Microbiological Methods* **44**:159-172.
129. **Moore, L. R., G. Rocop, und S. W. Chisholm.** 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**:464-467.

130. **More, M., J. Herrick, M. Silva, W. Ghiorse, und E. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1572-1580.
131. **Mukamolova, G. V., A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young, und D. B. Kell.** 1998. A bacterial cytokine. *Proceedings in National Academic Science* **95**:8916-8921.
132. **Mußmann, M., H. N. Schulz, B. Strotmann, T. Kjaer, L. P. Nielsen, R. A. Rosselló-Mora, R. I. Amann, und B. B. Jorgensen.** 2003. Phylogeny and distribution of nitrate-storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments. *Environ. Microbiol.* **5**:523-533.
133. **Newton, R. J., A. D. Kent, A. C. Yannarell, E. W. Triplett, und K. D. McMahon.** 2004. Inside Crystal Bog: A Glimpse at the Temporally Dynamic Composition of Freshwater Bacterial Communities. Poster presentation at the ISME conference 2004, Cancun, Mexico:contribution 686.
134. **Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, und H. Backhaus.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**:5636-5643.
135. **Okami, Y., und T. Okazaki.** 1978. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* **6**:145-151.
136. **Okami, Y., und T. Okazaki.** 1972. Studies on Marine Microorganisms .1. Isolation from Japan Sea. *Journal of Antibiotics* **25**:456.
137. **Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, und D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337-65.
138. **Ouverney, C. C., und J. A. Fuhrman.** 1999. Combined Microautoradiography-16S rRNA Probe Technique for Determination of Radioisotope Uptake by Specific Microbial Cell Types *In Situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1746-1752.
139. **Øvreås, L., F. L. Daae, V. Torsvik, und F. Rodriguez-Valera.** 2003. Characterization of microbial diversity in hypersaline environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microbial Ecology* **46**:291-301.
140. **Papke, R. T., N. B. Ramsing, M. M. Bateson, und D. M. Ward.** 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ Microbiol* **5**:650-659.
141. **Parenti, F., und C. Coronelli.** 1979. Members of the Genus *Actinoplanes* and Their Antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**:389-411.
142. **Pearce, D. A.** 2003. Bacterioplankton community structure in a maritime Antarctic oligotrophic lake during a period of holomixis, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Microbial Ecology* **46**: 92-105.

143. **Pearce, D. A., C. J. van der Gast, B. Lawley, und J. C. Ellis-Evans.** 2003. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**:59-70.
144. **Peplies, J., F. O. Glöckner, und R. Amann.** 2003. Optimization Strategies for DNA Microarray-Based Detection of Bacteria with 16S rRNA-Targeting Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1397-1407.
145. **Perkins, E. J.** 1974. *The Biology of Estuaries and Coastal Waters.* Academic Press, New York.
146. **Perna, N. T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Postal, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamosis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Y. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, und F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 (vol 409, pg 529, 2001). *Nature* **410**:240-240.
147. **Pernthaler, A., und R. Amann.** 2004. Simultaneous Fluorescence *In Situ* Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5426-5433.
148. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, und R. Amann.** 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3094-3101.
149. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, H. Eilers, und R. Amann.** 2001. Growth patterns of two marine isolates: Adaptations to substrate patchiness? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4077-4083.
150. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, M. Schattenhofer, und R. Amann.** 2002. Identification of DNA-Synthesizing Bacterial Cells in Coastal North Sea Plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5728-5736.
151. **Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schonhuber, und R. Amann.** 2001. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes [Review]. *Methods In Microbiology* **30**:207-226.
152. **Pernthaler, J., F. O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, und R. Amann.** 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4299-4306.
153. **Pernthaler, J., A. Pernthaler, und R. Amann.** 2003. Automated Enumeration of Groups of Marine Picoplankton after Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2631-2637.
154. **Pernthaler, J., T. Posch, K. Simek, J. Vrba, A. Pernthaler, F. O. Glöckner, U. Nübel, R. Psenner, und R. Amann.** 2001. Predator-Specific Enrichment of *Actinobacteria* from a Cosmopolitan Freshwater Clade in Mixed Continuous Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2145-2155.

155. **Poly, F., D. Threadgill, and A. Stintzi.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *J. Bacteriol.* **186**: 4781-4795.
156. **Porter, K. G., and Y. S. Feig.** 1980. The Use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora. *Limnology and Oceanography* **25**:943-948.
157. **Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646-649.
158. **Ramachandra, M., D. Crawford, and G. Hertel.** 1988. Characterization of an extra-cellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3057-3063.
159. **Rappe, M. S., P. F. Kemp, and S. J. Giovannoni.** 1997. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnology and Oceanography* **42**:811-826.
160. **Rappe, M. S., K. Vergin, and S. J. Giovannoni.** 2000. Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**:219-232.
161. **Ravenschlag, K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jørgensen, and R. Amann.** 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3592-3602.
162. **Ravenschlag, K., K. Sahm, J. Pernthaler, and R. Amann.** 1999. High Bacterial Diversity in Permanently Cold Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3982-3989.
163. **Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich.** 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1-7.
164. **Reysenbach, A. L., L. J. Giver, G. S. Wickham, and N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3417-3418.
165. **Rheinheimer, G.** 1991. *Aquatic Microbiology.* Wiley, New York.
166. **Riemann, L., and F. Azam.** 2002. Widespread N-Acetyl-D-Glucosamine Uptake among Pelagic Marine Bacteria and Its Ecological Implications. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5554-5562.
167. **Rocap, G., D. L. Distel, J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm.** 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Ecotypes by Using 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1180-1191.
168. **Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides [published erratum appears in *Microbiology* **141**:1267]. *Microbiology* **140**:2849-58.

169. **Rosselló-Mora, R., und R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes [Review]. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:39-67.
170. **Rosselló-Mora, R., N. Lee, J. Anton, und M. Wagner.** 2003. Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Extremophiles* **7**:409-413.
171. **Sachse, A., D. Babenzien, G. Ginzel, J. Gelbrecht, und C. E. W. Steinberg.** 2001. Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. *Biogeochemistry* **54**:279-296.
172. **Sahm, K., C. Knoblauch, und R. Amann.** 1999. Phylogenetic Affiliation and Quantification of Psychrophilic Sulfate-Reducing Isolates in Marine Arctic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3976-3981.
173. **Sass, H., E. Wieringa, H. Cypionka, H. D. Babenzien, und J. Overmann.** 1998. High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* **170**:243-251.
174. **Schatz, A., E. Bugie, und S. A. Waksman.** 1944. Streptomycin. A Substance Exhibiting Antibiotic Activity against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**:65-69.
175. **Scheele, B. und N. Boss.** 1999. Roche Lexikon Medizin. 4.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München.
176. **Schlegel, H. G.** 1992. Allgemeine Mikrobiologie, 7.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
177. **Schleifer, K. H., und E. Stackebrandt.** 1983. Molecular Systematics of Prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:143-187.
178. **Schramm, A., B. M. Fuchs, J. L. Nielsen, M. Tonolla, und D. A. Stahl.** 2002. Fluorescence *in situ* hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ. Microbiol.* **4**:713-720.
179. **Schut, F., E. J. De Vries, J. C. Gottschal, B. R. Robertson, W. Harder, R. A. Prins, und D. K. Button.** 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2150-2160.
180. **Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, und R. Amann.** 2003. An Improved Protocol for Quantification of Freshwater *Actinobacteria* by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2928-2935.
181. **Selje, N., und M. Simon.** 2003. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:221-237.

182. **Simek, K., D. Babenzien, T. Bittl, R. Koschel, M. Macek, J. Nedoma, and J. Vrba.** 1998. Microbial food webs in an artificially divided acidic bog lake. *International Review of Hydrobiology* **83**:3-18.
183. **Simek, K., J. Bobkova, M. Macek, J. Nedoma, and R. Psenner.** 1995. Ciliate Grazing On Picoplankton in a Eutrophic Reservoir During the Summer Phytoplankton Maximum - a Study At the Species and Community Level. *Limnology and Oceanography* **40**:1077-1090.
184. **Simek, K., J. Pernthaler, M. G. Weinbauer, K. Hornak, J. R. Dolan, J. Nedoma, M. Masin, and R. Amann.** 2001. Changes in Bacterial Community Composition and Dynamics and Viral Mortality Rates Associated with Enhanced Flagellate Grazing in a Mesoeutrophic Reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2723-2733.
185. **Simek, K., J. Vrba, J. Pernthaler, T. Posch, P. Hartman, J. Nedoma, and R. Psenner.** 1997. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:587-595.
186. **Singleton, P., and D. Sainsbury.** 2001. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
187. **Skerman, V. B. D., V. McGowan, and P. H. A. Sneath.** 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**:225-420.
188. **Sommaruga, R.** 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **62**:35-42.
189. **Sommaruga, R., I. Obernosterer, G. J. Herndl, and R. Psenner.** 1997. Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4178-4184.
190. **Stach, J. E. M., L. A. Maldonado, D. G. Masson, A. C. Ward, M. Goodfellow, and A. T. Bull.** 2003. Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6189-6200.
191. **Stach, J. E. M., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, and A. T. Bull.** 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* **5**:828-841.
192. **Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov [Review]. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**:479-491.
193. **Stackebrandt, E., and C. R. Woese.** 1981. Towards a phylogeny of actinomycetes and related organisms. *Curr. Microbiol.* **5**:131-136.
194. **Stahl, D. A., and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.

195. **Steinbrenner, K., und I. Mundstock.** 1975. Arch. Acker Pflanzenbau Bodenk. **19**:243-250.
196. **Stepanauskas, R., M. A. Moran, B. A. Bergamaschi, und J. T. Hollibaugh.** 2003. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:85-98.
197. **Suzuki, M., und S. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.
198. **Swofford, D. L., G. J. Olsen, P. J. Waddell, und D. M. Hillis.** 1996. Phylogenetic Inference, p. 407-514. *In* D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable (ed.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
199. **Tanner, M. A., B. M. Goebel, M. A. Dojka, und N. R. Pace.** 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3110-3113.
200. **Tartarotti, B., I. Laurion, und R. Sommaruga.** 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnology and Oceanography* **46**:1546-1552.
201. **Teeling, H., A. Meyerdierks, M. Bauer, R. Amann, und F. O. Glockner.** 2004. Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environ Microbiol* **6**:938-947.
202. **Teira, E., T. Reinthaler, A. Pernthaler, J. Pernthaler, und G. J. Herndl.** 2004. Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by *Bacteria* and *Archaea* in the Deep Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4411-4414.
203. **Thompson, J. R., L. A. Marcelino, und M. F. Polz.** 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucl. Acids. Res.* **30**:2083-2088.
204. **Torsvik, V., J. Goksøyr, und F. L. Daae.** 1990. High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:782-787.
205. **Trusova, M. Y., und M. I. Gladyshev.** 2002. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Microbial Ecology* **44**:252-259.
206. **Tuomi, P., T. Torsvik, M. Heldal, und G. Bratbak.** 1997. Bacterial Population Dynamics in a Meromictic Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2181-2188.
207. **Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar, und J. F. Banfield.** 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**:37-43.

208. **Urakawa, H., S. El Fantroussi, H. Smidt, J. C. Smoot, E. H. Tribou, J. J. Kelly, P. A. Noble, und D. A. Stahl.** 2003. Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2848-2856.
209. **Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, und S. J. Giovannoni.** 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnology and Oceanography* **46**:557-572.
210. **v. Wintzingerode, F., U. B. Gobel, und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**:213-229.
211. **van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindstrom, und B. D. Eardly.** 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* **185**: 2988-2998.
212. **Van Mooy, B. A. S., A. H. Devol, und R. G. Keil.** 2004. Quantifying <sup>3</sup>H-thymidine incorporation rates by a phylogenetically defined group of marine planktonic bacteria (*Bacteroidetes* phylum). *Environ Microbiol* **6**:1061-1069.
213. **Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Y. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, und H. O. Smith.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:66-74.
214. **Vidaver, A. K., und M. P. Starr.** 1981. p. 1879-1887. *In* M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The Prokaryotes*, vol. 2. Springer, Berlin.
215. **Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, und K.-H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520-1525.
216. **Ward, D. M., R. Weller, und M. M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**:63-65.
217. **Warnecke, F., R. Amann, und J. Pernthaler.** 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol* **6**:242-253.
218. **Warnecke, F., R. Sommaruga, R. Sekar, J. Hofer, und J. Pernthaler.** 2004. Abundances, identity and growth state of *Actinobacteria* in high mountain lakes of the Austrian Alps. *In Bearbeitung*.
219. **Watanabe, K., Y. Kodama, und S. Harayama.** 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods* **44**:253-262.



220. **Wetzel, R. G., P. G. Hatcher, und T. S. Bianchi.** 1995. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnology and Oceanography* **40**:1369-1380.
221. **Weyland, H.** 1981. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene **11**:309-314.
222. **Whitaker, R. J., D. W. Grogan, und J. W. Taylor.** 2003. Geographic Barriers Isolate Endemic Populations of Hyperthermophilic Archaea. *Science* **301**:976-978.
223. **Whitman, W. B., D. C. Coleman, und W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6578-6583.
224. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**:221-271.
225. **Woese, C. R., und E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5088-5090.
226. **Xenopoulos, M. A., und D. F. Bird.** 1997. Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. *Photochemistry and Photobiology* **66**:471-478.
227. **Yannarell, A. C., A. D. Kent, G. H. Lauster, T. K. Kratz, und E. W. Triplett.** 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology* **46**:391-405.
228. **Yannarell, A. C., und E. W. Triplett.** 2004. Within- and between-Lake Variability in the Composition of Bacterioplankton Communities: Investigations Using Multiple Spatial Scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214-223.
229. **Zdanowski, B., und A. Hutorowicz.** 1994. Salinity and Trophic of Great Masurian Lakes (Masurian Lakeland, Poland). *Ekologia Polska* **42**:317-331.
230. **Zengler, K., G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, und M. Keller.** 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. of the Natl. Acad. Sci.* **99**:15681-15686.
231. **Zuckerlandl, E., und L. Pauling.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal for Theoretical Biology* **8**:357-366.
232. **Zwart, G., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen, und S. K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141-155.
233. **Zwart, G., W. D. Hiorns, B. A. Methe, M. P. Van Agterveld, R. Huismans, S. C. Nold, J. P. Zehr, und H. J. Laanbroek.** 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **21**:546-556.
234. **Zwart, G., E. J. van Hannen, M. P. Kamst-van Agterveld, K. Van der Gucht, E. S. Lindström, J. Van Wichelen, T. Lauridsen, B. C. Crump, S.-K. Han, und S. Declerck.** 2003. Rapid Screening for Freshwater Bacterial Groups by Using Reverse Line Blot Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5875-5883.

235. **Zwisler, W., N. Selje, und M. Simon.** 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:211-225.