

***In situ* Dynamik und Räuber-Beute-Interaktionen im
mikrobiellen Plankton der Nordsee**

***In situ* dynamics and predator-prey interactions in
the microbial plankton of the North Sea**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der

Universität Bremen

vorgelegt von

Christine Beardsley

Juli 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis Juli 2003 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Amann
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunter-Otto Kirst

Tag des Promotionskolloquiums: 29.08.2003

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Summary	2

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

1. Mikrobielle Lebensgemeinschaften des küstennahen, marinen Planktons	4
2. Das mikrobielle Nahrungsnetz	9
3. Variabilität innerhalb der Planktongemeinschaften in der Deutschen Bucht	12
4. Strukturierung der Bakteriengemeinschaft durch selektiven Fraßdruck	14
5. Molekulare Analyse des prokaryotischen Picoplanktons	15
6. Analyse der Lebensgemeinschaft des marinen Nanoplanktons	16
7. Zielsetzung der Arbeit	18

B Ergebnisse und Diskussion

1. Innersaisonale Variabilität mikrobieller Planktongemeinschaften in der Deutschen Bucht	20
2. Räuber-Beute-Interaktionen zwischen Bakterien und heterotrophen Nanoflagellaten der küstennahen Nordsee	24
3. Entwicklung eines Protokolls zur Anwendung der FISH-TSA-Methode für eukaryotisches Nanoplankton	28

C Literaturverzeichnis

34

Teil II: Publikationen

A Publikationsliste mit Erläuterungen

48

B Publikationen

1. Within-season variability of microbial plankton in the North Sea.	49
2. Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality?	71
3. Detection of marine nanoplankton by fluorescence <i>in situ</i> hybridization and tyramide signal amplification.	91

Danksagung

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zusammensetzung und die Populationsdynamik des mikrobiellen Planktons der Nordsee vor Helgoland untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Analyse taxonspezifischer Abundanzänderungen innerhalb der Bakteriengemeinschaft und dem Aufdecken möglicher Zusammenhänge zu biotischen und abiotischen Faktoren.

In drei Untersuchungszeiträumen (August 2000, Juni 2001, August 2002) wurden die kurzfristigen, innersaisonalen Abundanzänderungen verschiedener Populationen des Bakterioplanktons mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Tyramid-signalverstärkung (FISH-TSA) analysiert. Die Abundanzen der untersuchten Bakteriengruppen variierten deutlich sowohl innerhalb, als auch zwischen den verschiedenen Jahreszeiten und auch in aufeinander folgenden Jahren. So war bei insgesamt höheren Bakterienabundanzen der relative Anteil der Gruppen *Bacteroidetes*, γ -Proteobakterien und *Roseobacter* spp. im August 2002 signifikant niedriger als im August 2000. Weiterhin gab es innerhalb der γ -Proteobakterien, insbesondere in der SAR 86-Gruppe, ausgeprägte kurzfristige Abundanzänderungen, während die Populationen mariner *Roseobacter* spp. stets deutlich stabiler waren. Diese Variabilität ist möglicherweise ein wichtiges und bisher meist vernachlässigtes Phänomen im Oberflächenwasser der küstennahen Nordsee.

Interaktionen zwischen marinen Bakterien und heterotrophen Nanoflagellaten (HNF) wurden in einem Inkubationsexperiment untersucht. Durch die Simulation unterschiedlicher Räuber-Beute-Szenarien wurde die Hypothese überprüft, dass die schnell anreicherbaren, opportunistischen γ -Proteobakterien der Gattungen *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. durch selektiven Fraßdruck unterdrückt werden. In 0.8 μm -filtrierten Wasserproben dominierten *Alteromonas*-Arten innerhalb von 48 h. Bei einer 1:10 Verdünnung der Wasserproben mit 0.2 μm -filtriertem Standortwasser reicherten sich zusätzlich *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. an. Beide Behandlungen bewirkten eine deutliche Reduzierung der HNF, nicht jedoch ihren quantitativen Ausschluss. Beim nachfolgenden Wiederanstieg der HNF-Abundanzen sanken die relativen Abundanzen dieser opportunistischen γ -Proteobakterien überproportional. Im Gegensatz dazu wurden bei Bakterien der NOR 5-Gruppe, der *Cytophaga marinoflava* / *C. latercula*-Gruppe und der marinen *Roseobacter* spp. keine behandlungsspezifischen Effekte beobachtet. Es wurde außerdem gezeigt, dass Zellen von *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. signifikant größer waren als der Durchschnitt aller Bakterien und dass die Änderung ihrer relativen Abundanzen signifikant negativ mit der HNF-Dichte korreliert war. Diese experimentellen Ergebnisse legen nahe, dass opportunistische γ -Proteobakterien auch im küstennahen Oberflächenwasser durch HNF kontrolliert werden.

Die FISH-TSA-Technik mit 18S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden wurde in dieser Arbeit zur molekularbiologischen Detektion von Pico- und Nanoeukaryoten im marinen Pelagial optimiert. In Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa₃₅₀[®] wird so die quantitative Bestimmung von Protisten aus Umweltproben bei gleichzeitiger Klassifizierung ihres trophischen Status (phototroph / heterotroph) ermöglicht. Verglichen mit einer Standardtechnik zur Quantifizierung von heterotrophen und phototrophen Nanoflagellaten (DAPI / FITC-Färbung) wurden mit der FISH-TSA-Methode signifikant höhere Abundanzen gefunden, was hauptsächlich auf die bessere Visualisierung kleiner Zellen von ca. 2-3 μm Durchmesser zurückzuführen war. Sonden, spezifisch für Pedinellales / Rhizochromulinales (PEDI 1646) und für eine neue Gruppe heterokonter Flagellaten (NS 4), detektierten Populationen mit sehr niedrigen Abundanzen ($\leq 1\%$) in Wasserproben aus der Nordsee.

SUMMARY

In this thesis the taxonomic composition and the population dynamics of coastal North Sea microbial plankton were studied. The main focus was put on the analysis of the taxon-specific variability of bacterial abundance and on the discovery of possible relations to biotic and abiotic factors.

During three sampling periods (August 2000, June 2001, August 2002) the short-term, within-seasonal variability in abundance of several different bacterial populations were analysed using fluorescence *in situ* hybridisation with tyramide signal amplification (FISH-TSA). Bacterial abundances varied remarkably within and between different seasons, and between successive years. For instance, the relative abundances of *Bacteroidetes*, γ -proteobacteria, and *Roseobacter* spp. were significantly lower in August 2002 than in August 2000 even though total bacterial cell numbers were about 2-fold higher. Moreover, during all sampling periods pronounced short-term changes within the γ -proteobacteria, specifically of bacteria related to the SAR 86-clade, were observed. In contrast, members of the genus *Roseobacter* spp. formed more stable populations with only small daily variations. Short-term variability of bacterial assemblages may thus constitute an important feature of microbial plankton in coastal surface waters.

In an incubation experiment the interactions between marine bacteria and heterotrophic nanoflagellates (HNF) were studied. By simulating different predator-prey scenarios a hypothesis was tested stating that readily culturable, opportunistic γ -proteobacteria of the genera *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp., and *Vibrio* spp. are suppressed by selective grazing of HNF. In 0.8 μm -filtered seawater *Alteromonas* spp. dominated the community within 48 h. In samples that were 1:10 diluted with 0.2 μm -filtered seawater additional enrichments of *Pseudoalteromonas* spp. and *Vibrio* spp. were observed. Both treatments clearly reduced HNF abundance, but did not achieve their quantitative exclusion. During the subsequent regrowth of HNF the relative abundances of opportunistic γ -proteobacteria declined overproportionately. In contrast, bacteria of the NOR 5-clade, the *Cytophaga marinoflava* / *C. latercula* lineage, and the marine *Roseobacter* spp. were not affected by any of the treatments. Furthermore, it was shown that cells of *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp., and *Vibrio* spp. were significantly larger than the average of all bacterial cells. Changes in their abundances were negatively correlated with the densities of HNF. These experimental results suggest that opportunistic γ -proteobacteria in coastal surface waters may be controlled by HNF.

A molecular technique was developed to detect marine, pelagic pico- and nanoeukaryotes. FISH-TSA using 18S rRNA-targeted oligonucleotides was combined with a fluorochrome (Alexa₃₅₀[®]) to quantitatively identify protists in environmental samples and simultaneously detect their trophic mode (phototrophic / heterotrophic). Compared to a standard technique for the quantification of phototrophic and heterotrophic nanoflagellates (DAPI / FITC-staining), the new FISH-TSA-technique detected significantly higher abundances. This was mainly due to an improved visualisation of small cells of 2-3 μm in diameter. Specific probes for the group Pedinellales / Rhizochromulinales (PEDI 1646) and for a novel group of heterokont flagellates (NS 4) detected very low abundances in environmental samples of the German Bight of the North Sea.

Teil I

Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

1. Mikrobielle Lebensgemeinschaften des küstennahen, marinen Planktons

Der Begriff 'Plankton' wurde von Hensen (1887) vor mehr als einhundert Jahren eingeführt, um aquatische Organismen mit begrenzter Eigenbewegung zu beschreiben. Da sie entweder nicht zu aktiven Schwimmbewegungen fähig sind oder nicht effektiv gegen die vorherrschende Strömung schwimmen können, schweben sie in dem sie umgebenden Medium. Planktische Lebensgemeinschaften umfassen ein- und mehrzellige Organismen aller Ernährungstypen, die neben einer taxonomischen Einteilung auch anhand von Größenklassen (Sieburth *et al.*, 1978) und funktionellen Kategorien untergliedert werden können. Mikroorganismen werden in die Größenklassen Picoplankton ($< 2 \mu\text{m}$; Archaeen und Bakterien, inklusive Cyanobakterien), Nanoplankton (2-20 μm ; kleine Protisten, insbesondere Flagellaten) und Mikroplankton (20-200 μm ; größere Protisten und kleine Metazoen) eingeteilt. Im Rahmen dieser Terminologie werden Viren, die per Definition keine Organismen sind, dem Femtoplankton zugerechnet. Eine andere Kategorisierung bezieht sich auf die Ernährungsweise der Organismen. Der Begriff Phytoplankton beschreibt photosynthetisch aktive Protisten und Cyanobakterien, während Zooplankton heterotrophe Protisten und Metazoen umfasst. Allerdings sind diese Bezeichnungen vor der Entdeckung der vielfältigen Stoffwechselformen der Prokaryoten im Plankton entstanden. Der Begriff Bakterioplankton, dem phylogenetisch auch Cyanobakterien zugeordnet werden müssen, beschreibt daher keine trophische Einheit. Überdies werden marine Archaeen (Fuhrman *et al.*, 1992; DeLong *et al.*, 1993) offensichtlich nicht von dieser Kategorie erfasst, weshalb man u.U. sinnvoller vom prokaryotischen Picoplankton sprechen sollte. In der vorliegenden Arbeit wurden mikrobielle Planktongemeinschaften untersucht, daher wird auf Metazoen im weiteren nicht eingegangen.

Planktische, marine Prokaryoten, d.h. Archaeen und Bakterien, besitzen nur wenige morphologische Unterscheidungsmerkmale. Sie sind in der Regel kleiner als 1 μm und erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung als gerade oder gekrümmte Stäbchen, Kokken, Spirillen und Filamente. Dieser phänotypischen Schlichtheit steht die hohe phylogenetische Diversität der Prokaryoten gegenüber (Giovannoni *et al.*, 1990; Fuhrman *et al.*, 1992; DeLong *et al.*, 1993) (Abb. 1). Die Hauptgruppen mariner Prokaryoten sind

weltweit vertreten, wobei die häufigsten Vertreter der Domäne *Bacteria* im marinen Oberflächenwasser den Klassen *Bacteroidetes* und Proteobakterien zugeordnet werden (Fuhrman *et al.*, 1992; Mullins *et al.*, 1995; Glöckner *et al.*, 1999; Cottrell and Kirchman, 2000a; Eilers *et al.* 2000a; Eilers *et al.*, 2001).

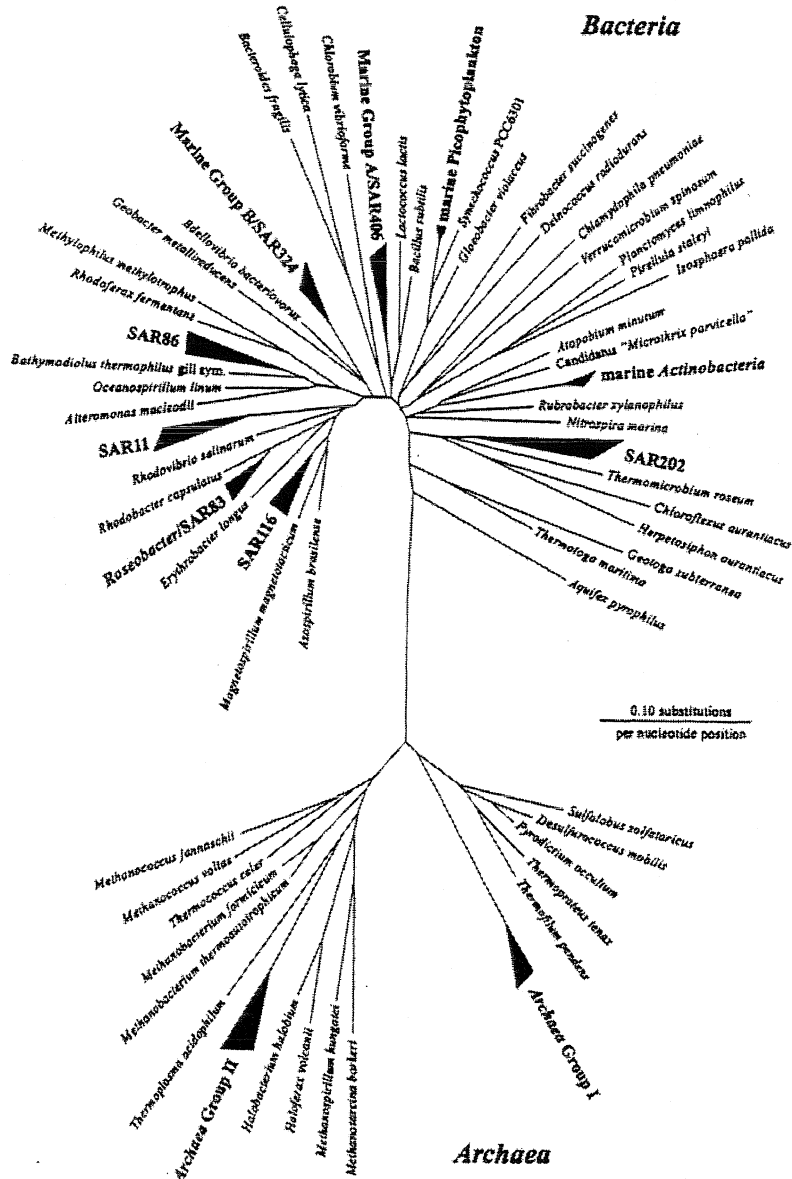


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum, der die am meisten verbreiteten prokaryotischen 16S rDNA Sequenzgruppen des marinen Planktons zeigt (Giovannoni and Rappé 2000).

Die Klasse *Bacteroidetes*, ehemals als *Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides*-Gruppe bezeichnet, bildet eine tiefverzweigende Hauptgruppe innerhalb der Domäne *Bacteria* (Kirchman 2002). Diese Gruppe bildet häufig 20-40% der Gesamtbakterienabundanz in verschiedenen küstennahen sowie antarktischen Regionen (Glöckner *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 1999; Cottrell and Kirchman, 2000a; Eilers *et al.*, 2000a; Eilers *et al.*, 2001). Die meisten marinen Isolate dieser Gruppe sind obligat aerob oder fakultativ anaerob chemoorganotroph und befähigt, hochmolekulare organische Substrate umzusetzen (Giovannoni and Rappé, 2000). Molekularbiologische Untersuchungen mittels Mikroautoradiographie weisen darauf hin, dass auch bisher nicht kultivierte Vertreter dieser Gruppe eine wichtige Rolle beim Abbau hochmolekularen organischen Materials in aquatischen Ökosystemen spielen (Cottrell and Kirchman, 2000b).

Proteobakterien stellen die mit Abstand vielfältigste und evolutiv erfolgreichste mikrobielle Gruppe der Ozeane (Giovannoni and Rappé, 2000). Im marinen Pelagial sind α -Proteobakterien und γ -Proteobakterien die quantitativ bedeutendsten Untergruppen dieser Klasse (Glöckner *et al.*, 1999; Eilers *et al.*, 2001; Rappé *et al.*, 2002). Obwohl Kultivierungserfolge in beiden Gruppen sehr groß sind, bilden Vertreter von kultivierten α - und γ -Proteobakterienstämmen *in situ* meist nur Populationen sehr geringer Dichte aus. Eine Ausnahme hiervon bildet der Stamm des zu den γ -Proteobakterien gehörenden NOR5-Clusters, KT71. Die Abundanz dieses Stammes kann in der Nordsee bis zu 1.4×10^5 Zellen ml^{-1} betragen (Eilers *et al.*, 2001). β -Proteobakterien spielen im marinen Plankton meist nur eine untergeordnete Rolle. Ihre Abundanz kann allerdings bei geringeren Salzgehalten, beispielsweise in Ästuaren oder Nebenmeeren, ebenfalls stark zunehmen (Pinhassi *et al.*, 1997; Glöckner *et al.*, 1999; Bouvier and del Giorgio, 2002). Eine weitere bedeutende Gruppe der Domäne *Bacteria* sind Cyanobakterien. Sie sind weltweit in allen Meeren vertreten durch die phylogenetisch eng verwandten Mitglieder der marinen *Synechococcus*-Gruppe und Prochlorophyten (Urbach *et al.*, 1998; Giovannoni and Rappé, 2000). Cyanobakterien betreiben oxygene Photosynthese und stellen einen bedeutenden Anteil der Primärproduktion und Gesamtphytoplanktonbiomasse in küstennahen und offenen Ozeanen (Li *et al.*, 1992; Campbell and Vaultot, 1993; Campbell *et al.*, 1994; Claustre and Marty, 1995).

Die Domäne *Archaea* ist untergliedert in die Klassen *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota*. Während Euryarchaeen (marine *Archaea*, Gruppe II) zumindest temporär signifikante Populationen im Oberflächenwasser des marinen Pelagials ausbilden, spielen

Crenarchaeen (marine *Archaea*, Gruppe I) insbesondere in tieferen Wasserschichten eine größere Rolle (Massana *et al.*, 1997; Massana *et al.*, 2000; Karner *et al.*, 2001; Pernthaler *et al.*, 2002a).

Die Mikroumwelt pelagischer Bakterien ist bezüglich der räumlichen Verteilung von organischem Material heterogen strukturiert (Grossart *et al.*, 2001). Makroskopische Detritusaggregate > 0.5 mm (*marine snow*) sind für einen Großteil des Flusses von biogenem Kohlenstoff von der Meeresoberfläche in tiefere Schichten der Ozeane verantwortlich (DeLong *et al.*, 1993). In diesen lokalen Mikrohabitaten sind Nährstoffe oft stark angereichert und die mikrobielle Aktivität ist sehr hoch (Alldredge and Silver, 1988). Der Vergleich von partikel-assoziierten und freilebenden Bakteriengemeinschaften zeigt, dass es große Unterschiede in der phylogenetischen Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften gibt (DeLong *et al.*, 1993). So geht beispielsweise aus Klonbankanalysen von küstennahem Plankton hervor, dass α -Proteobakteriensequenzen am häufigsten aus freilebenden Bakteriengemeinschaften amplifiziert wurden, während in partikel-assoziierten Gemeinschaften Klone von *Bacteroidetes* und in geringem Maß der Gruppe *Planctomycetales* dominierten. Innerhalb der γ -Proteobakterien wurden distinkte Sequenzgruppen aus freilebenden wie auch aus partikel-assoziierten Lebensgemeinschaften extrahiert. Archaeen dagegen scheinen nicht partikel-assoziiert vorzukommen. Diese unterschiedlichen Verteilungsmuster könnten einen Einfluss auf die zeitliche und räumliche Variabilität des marinen prokaryotischen Planktons haben und eine wichtige Rolle bei der Sukzession von Populationen spielen.

Das Reich der Protisten umfasst eine polyphyletische Gruppe eukaryotischer, meist einzelliger Organismen mit unterschiedlichsten Ernährungsweisen. Da strikt heterotrophe Protisten phylogenetisch sehr eng mit obligat phototrophen Vertretern verwandt sein können (Cavalier-Smith, 2000) und darüber hinaus viele Organismen sowohl autotrophe als auch phagotrophe Eigenschaften aufweisen (Mixotrophie) (Caron, 1994; Havskum and Skjoldborg Hansen, 1997; Jones, 1994; Raven, 1997; Sanders, 1991; Sanders and Porter, 1988), ist eine generelle Einteilung der Protisten in die Gruppen einzellige Algen und Protozoen nur bedingt sinnvoll. Die wichtigsten phylogenetischen Gruppen der Protisten sind in Abbildung 2 dargestellt.

Quantitativ wird das marine Pelagial von Nano- und Mikroeukaryoten der Gruppen Heterokonta, Prymnesiophyta (Haptophyta) und Cryptophyta dominiert (z.B. Brandt and Sleigh, 2000; Dennett *et al.*, 2001). Aber auch Dinoflagellaten, Choanoflagellaten, Ciliaten und einige Eugleniden sind zumindest temporär abundant (z.B. Sherr *et al.*, 1986; Brandt

and Sleigh, 2000). Heterokonta beinhalten die ökologisch wichtigen Gruppen der Diatomeen, Chrysophyta und Bicoecida. Diatomeen bilden einen bedeutenden Anteil der Phytoplanktonbiomasse. In oligotrophen Meeren tragen sie bis zu 35%, in küstennahen Regionen bis zu 75% zur marinen Primärproduktion bei (Tréguer *et al.*, 1995). In der Nordsee lässt sich entsprechend den Schwankungen von Lichtangebot, Temperatur und Nährstoffen eine jahreszeitliche Sukzession der photosynthetisch aktiven Planktonpopulationen verfolgen (Hagmeier and Bauerfeind, 1990). So kommt es hier im Frühjahr zu einem Abundanzmaximum der Diatomeen (van Bennekom *et al.*, 1974), dem gewöhnlich ein Maximum der Phytoflagellaten folgt (Lancelot *et al.*, 1987). Einzelne Arten verschiedener Phyla können in sogenannten Algenblüten massenhaft auftreten. In der küstennahen Nordsee verursachen beispielsweise die Blüten des Dinoflagellaten *Noctiluca scintillans* oder des Ciliaten *Mesodinium rubrum* regelmäßig während des Phytoplanktonmaximums im Sommer eine rötliche Färbung des Oberflächenwassers (*red tide*) (Elbrächter, 1990; Hagmeier and Bauerfeind, 1990). Gelegentlich sind auch toxische Phytoplankter, beispielsweise der Gattungen *Gonyaulax*, *Gymnodinium* und *Chrysochromulina*, Mitverursacher dieser *red tides* (Anderson *et al.*, 1985; Maestrini and Graneli, 1991). Diese Planktonorganismen können mit ihren toxischen Exudaten Fischsterben auslösen (Maestrini and Graneli, 1991), aber auch Muschelbestände für den Verzehr durch Seevögel und den Menschen unbrauchbar machen (Yndestad and Underdahl, 1985). Massenentfaltungen des koloniebildenden Flagellaten *Phaeocystis globosa* sind dagegen harmlos, führen aber besonders im Brandungsbereich der südlichen Nordsee zu starker Schaumbildung (Elbrächter, 1990; Hagmeier and Bauerfeind, 1990).

Heterotrophe Nano- und Mikroflagellaten nehmen im marinen Pelagial eine wichtige Position als Konsumenten von Pico- und Nanoplanktern ein (Fenchel, 1986). Auf ihre Rolle im mikrobiellen Nahrungsnetz des marinen Planktons wird im nächsten Kapitel gesondert eingegangen. Als Pilze bezeichnete osmotrophische oder saprotrophische Protisten kommen als Parasiten von z.B. Copepoden vor (Sieburth, 1979) oder sind in Küstengebieten am Abbau vaskulären Pflanzenmaterials beteiligt. Sie spielen im marinen Pelagial daher nur eine untergeordnete Rolle (Newell, 1994).

Die kleinsten planktischen Eukaryoten sind erst im letzten Jahrzehnt verstärkt ins Blickfeld der Forschung geraten (Courties *et al.*, 1994; Fogg, 1995). Diese Picoeukaryoten mit einer Zellgröße $< 2\text{-}3\ \mu\text{m}$ sind phylogenetisch sehr divers (Moon-van der Staay *et al.*, 2000; López-García *et al.*, 2001; Moon-van der Staay *et al.*, 2001) und wahrscheinlich die numerisch bedeutendsten Eukaryoten weltweit (Díez *et al.*, 2001). Phototrophe

Picoeukaryoten leisten einen signifikanten Beitrag zur Gesamtphytoplanktonbiomasse und -produktion (Li *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1994). Heterotrophe Picoeukaryoten wurden sowohl im marinen Oberflächenwasser als auch in größeren Meerestiefen in hohen Abundanzen detektiert (López-García *et al.*, 2001; Massana *et al.*, 2002). Es ist daher wahrscheinlich, dass Picoeukaryoten eine wichtige Rolle in globalen Stoffkreisläufen spielen (Li *et al.*, 1992; Fogg, 1995).

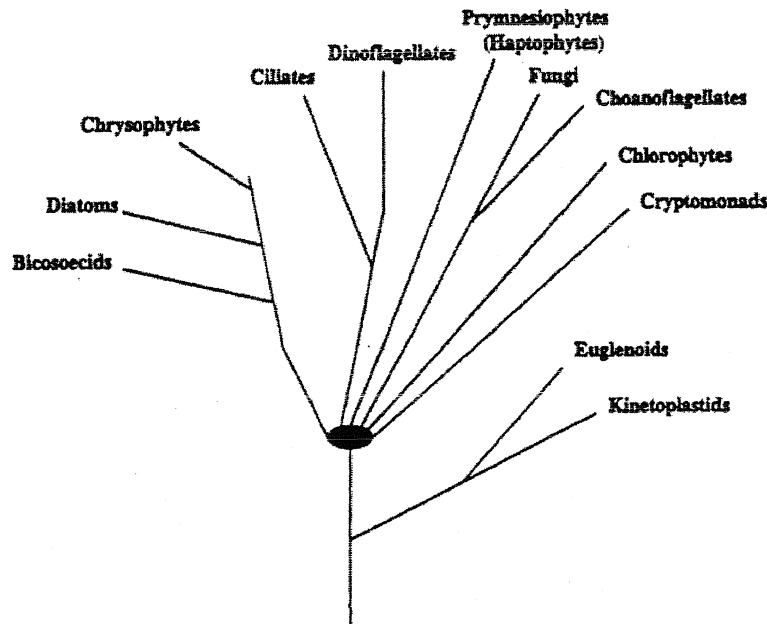


Abbildung 2: Auf 18S rDNA Sequenzvergleichen basierendes Diagramm der allgemeinen phylogenetischen Verwandtschaft von eukaryotischen Mikroorganismen, die in marinen Ökosystemen verbreitet sind. Die genetischen Distanzen sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Mit Erweiterung des Datensatzes können sich die Verwandtschaftsbeziehungen im Detail ändern. Phagotrophie wurde für heterotrophe und/oder photosynthetische Arten aller Gruppen mit Ausnahme der Diatomeen und Pilze nachgewiesen (modifiziert nach Sherr and Sherr 2000).

2. Das mikrobielle Nahrungsnetz

Die Beziehungen der diversen Gruppen von Mikroorganismen untereinander und ihre Wechselwirkungen mit der abiotischen Umwelt hinsichtlich des Nährstoff- und Energieflusses in aquatischen Lebensräumen werden im mikrobiellen Nahrungsnetz beschrieben (Abb. 3). Pomeroy (1974) wies erstmals auf die enorme Bedeutung der Mikroorganismen im Nahrungsgefüge hin. Er zeigte, dass (i) die größte Gruppe der marinen Primärproduzenten aus Organismen kleiner als 60 μm besteht, (ii) ein Großteil der marinen Gesamtrespiration auf Organismen mit einer Zellgröße von weniger als 366 μm

(Planktonnetzgröße Nr. 2) zurückzuführen ist und (iii) gelöster und partikulärer organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon, DOC bzw. particulate organic carbon, POC) wichtige Nahrungsquellen für heterotrophe Mikroorganismen darstellen.

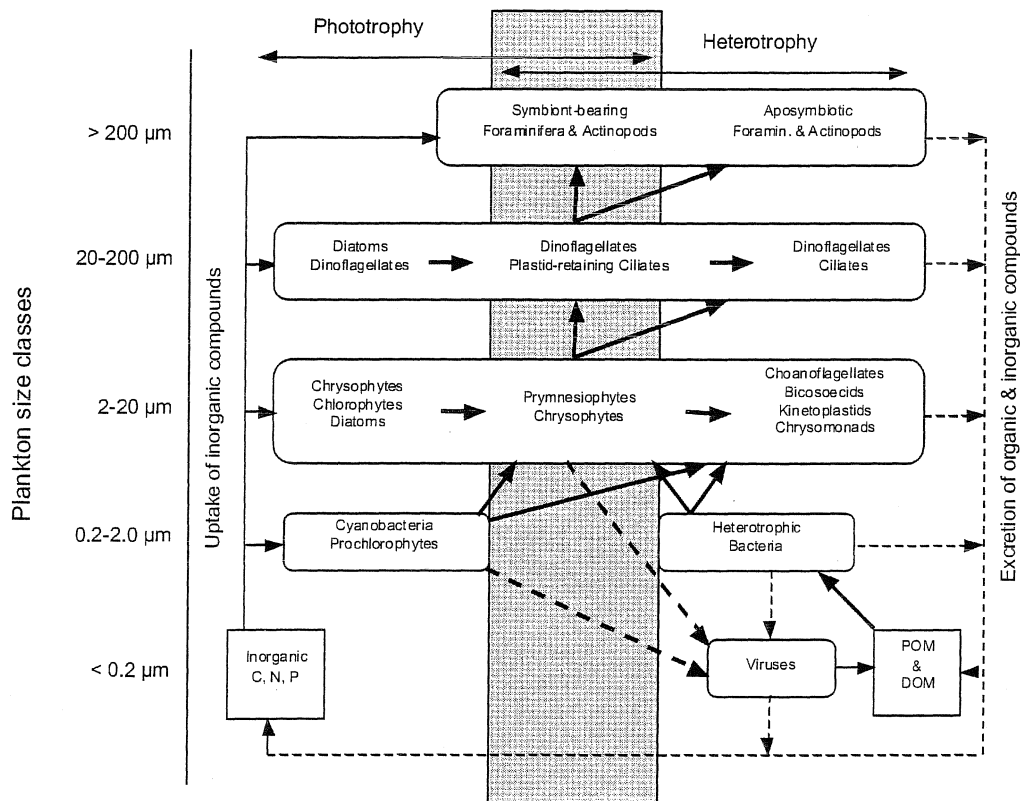


Abbildung 3: Diagramm des mikrobiellen Nahrungsnetzes, das die Größenklassen und verallgemeinerten trophischen Beziehungen zwischen photosynthetischen und heterotrophen Protisten und Prokaryoten im marinen Plankton zeigt. Dargestellt sind repräsentative Taxa für alle Größenklassen und trophischen Modi. Dicke Pfeile geben die Richtung des Energieflusses infolge von Konsumption wieder. Dünne Pfeile stellen die Aufnahme inorganischer Komponenten dar. Dünne, unterbrochene Pfeile zeigen die Freisetzung organischen und inorganischen Materials durch Egestion und Sekretion. Der "Verlust" mikrobieller Biomasse aufgrund viraler Lysis ist mit dicken unterbrochenen Pfeilen dargestellt. Die graue Fläche weist auf Organismen hin, die sowohl Photosynthese als auch Phagotrophie (Mixotrophie) betreiben. POM und DOM repräsentieren die Gesamtheit des partikulären bzw. gelösten organischen Kohlenstoffs (Caron, 1994).

Die Verknüpfung dieser Prozesse wurde von Azam *et al.* (1983) im Konzept der „mikrobiellen Schleife“ (*microbial loop*) als integraler Bestandteil pelagischer Nahrungsnetze beschrieben. Die heterotrophen Bakterien des Pelagials agieren demnach nicht nur als Destruenten von abgestorbenem organischen Material, sondern setzen auch ca. 10-50% des vom Phytoplankton fixierten und als DOC freigesetzten Kohlenstoffs um

(Azam *et al.*, 1983). Damit bilden die Bakterien einen wichtigen Faktor im Transfer von gelöstem in partikuläres organisches Material. Aufgrund ihrer hohen Abundanz stellen sie selbst eine der bedeutendsten partikulären Kohlenstoffquellen dar (Caron *et al.*, 1985).

Die Anzahl freilebender Bakterien wird durch den Fraßdruck von bakterivoren Protisten, hauptsächlich heterotrophen Nanoflagellaten, kontrolliert (Azam *et al.*, 1983; Sherr and Sherr, 1984; Caron *et al.*, 1988). Mikroflagellaten und Ciliaten als Hauptkomponenten des Mikrozooplanktons üben einen Fraßdruck sowohl auf das Phytoplankton als auch auf heterotrophe Flagellaten aus (Bernard and Rassoulzadegan, 1990). Heterotrophe Protisten konsumieren insgesamt zwischen 25 und 100% der täglichen Phytoplanktonproduktion (Sherr and Sherr, 1994). Zusammen mit größeren Phytoplanktern dienen sie der nächst höheren trophischen Ebene als Nahrungsquelle (Dolan and Gallegos, 1991). Heterotrophe Protisten bewirken auf diesem indirekten Weg eine Rückführung der als DOC freigesetzten Energie in das klassische planktische Nahrungsnetz und sind demnach ein wichtiges Bindeglied zwischen Bakterien und höheren trophischen Ebenen (z.B. Sheldon *et al.*, 1986; Carrick *et al.*, 1991).

Ein weiterer Faktor, der die Interaktionen im mikrobiellen Nahrungsnetz entscheidend beeinflussen kann, ist die Mortalität durch Viren. So kann die Lyse von Bakterienzellen nach Virenbefall zur zusätzlichen Freisetzung von DOC und Nährstoffen führen (Fuhrman, 1999; Fuhrman and Noble, 1995; Proctor and Fuhrman, 1990). Anorganische Nährstoffe können außerdem durch die Mineralisierungsaktivität der Bakterien und durch Nährstoffregeneration von heterotrophen Flagellaten freigesetzt und somit den Primärproduzenten wieder zur Verfügung gestellt werden (Caron and Goldman, 1990; Caron, 1991; Sherr and Sherr, 2002).

Die Zahl der möglichen Quervernetzungen und Verkürzungen von Kettenlängen innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes erscheint schier endlos. Beispielsweise haben viele Ciliaten ein Nahrungsspektrum, dass von Bakterivorie bis hin zum Kannibalismus reicht (Finlay *et al.*, 1988), einige parasitoide Nanoflagellaten befallen wirtsspezifisch große planktische Diatomeen (Kühn *et al.*, 1996) und wiederum andere Ciliaten und Dinoflagellaten, z.B. der Gattungen *Mesodinium*, *Laboea* und *Strombidium* sind obligat oder fakultativ mixotroph, d.h. sowohl zur Phagozytose als auch zur Photosynthese fähig (Stoecker *et al.*, 1987; Gustafson *et al.*, 2000). Diese Komplexität verdeutlicht, dass mit der eingangs genannten Einteilung nach Trophie und Größenklassen längst nicht alle biotischen und abiotischen Zusammenhänge erklärbar sind. Trotz vieler gemeinsamer Merkmale bezüglich des Verhaltens und der Funktion innerhalb einer Gruppe wird die

Rolle jeder einzelnen Art im Nahrungsnetz durch spezifische, morphologische, physiologische und das Verhalten betreffende Anpassungen bestimmt. Die Artenzusammensetzung kann deshalb entscheidend für die konkreten trophischen Verknüpfungen in einem Lebensraum sein (Pace *et al.*, 1990). Eine gezielte Analyse der Gemeinschaft jenseits funktioneller Gruppen und Größenklassen ist daher für das Verständnis der Ökologie des marinen, mikrobiellen Planktons von großer Bedeutung.

3. Variabilität innerhalb der Planktongemeinschaften in der Deutschen Bucht

Während Planktongemeinschaften der offenen Ozeane sich annäherungsweise in einem Gleichgewichtszustand (*steady state*) befinden, ist dies in küstennahen Regionen nicht der Fall. Jahreszeitlich abhängige Ereignisse wie beispielsweise periodische Schwankungen von Temperatur und Nährstoffkonzentrationen lösen in Küstengebieten gemäßiger Breiten Oszillationen der Populationsdichten von Planktonorganismen aus (Fenchel, 1988). Die daraus resultierende Sukzession reflektiert die Struktur der Nahrungsketten. Die Populationsoszillationen können zum Beispiel dem Lotka-Volterra Modell für Räuber-Beute-Beziehungen entsprechen und oft ist die Amplitude der Oszillationen in produktiven Ökosystemen höher als in unproduktiveren Ökosystemen (Fenchel, 1986). Die Dauer der Räuber-Beute-Zyklen spiegelt die Größenstrukturen innerhalb einer planktischen Gemeinschaft wieder, da sie annäherungsweise umgekehrt proportional zu den Wachstumsraten der involvierten Arten ist. Während die Populationsoszillationen von Diatomeen und Copepoden in einer Größenordnung von etwa einem Monat stattfinden, können die Oszillationen von Bakterien- und Protistenpopulationen in Tagen gemessen werden. Fenchel wies daher schon vor mehr als 20 Jahren auf die mögliche Bedeutung der feinskaligen zeitlichen Heterogenität in küstennahen, planktischen Ökosystemen hin (Fenchel, 1988).

Die Deutsche Bucht der Nordsee ist ein Beispiel für ein küstennahes Gewässer gemäßiger Breiten. Die Nordsee als Schelf- oder Randmeer mit einer mittleren Tiefe von 70 m ist ein extrem dynamisches System, das infolge der vielen verschiedenen Einflüsse starke regionale und zeitliche Variationen aufweist (Becker, 1990). Ihr südöstliches Gebiet, die Deutsche Bucht, ist geprägt durch einen großen Tidenhub und schnell wechselnde Windverhältnisse. In Verbindung mit der geringen Wassertiefe wird so eine Durchmischung des Wasserkörpers begünstigt. Den vermutlich stärksten abiotischen Einfluss auf die pelagische Planktongemeinschaft in der Deutschen Bucht haben die

Temperatur- und die Salzgehaltsverhältnisse. Die jahreszeitlichen Schwankungen der Temperatur in der Deutschen Bucht betragen im Mittel 16°C (Becker, 1990). Der Salzgehalt in diesem Gebiet wird in erster Linie durch den Einstrom atlantischer Wassermassen durch den Englischen Kanal, durch die Süßwasserzuflüsse insbesondere von Weser und Elbe, durch Verdunstung und Niederschlag sowie gelegentlich auch durch einströmendes Wasser aus der Ostsee bestimmt. Die jahreszeitlichen Schwankungen der Niederschlagsmengen und der Abflussmengen vom Festland gehen einher mit Änderungen in der Schweb-, Nähr- und Schadstofffracht (Radach *et al.*, 1990).

Diese hohe Variabilität der physiko-chemischen Parameter in der Deutschen Bucht beeinflusst die Zusammensetzung, Abundanz und Verteilung der Planktongemeinschaften und initiiert die bereits erwähnten Oszillationen. In Studien von Poremba *et al.* (1999a & 1999b) und Eilers *et al.* (2000a & 2001) wurde die räumliche und jahreszeitliche Heterogenität des mikrobiellen Planktons in der Deutschen Bucht nachgewiesen. Eilers *et al.* (2001) zeigten in einer Jahresgangstudie mit wöchentlicher Probennahme, dass Variationen in der Zusammensetzung und Abundanz des Bakterioplanktons einhergehen mit Veränderungen in der Wassertemperatur und dem Auftreten von Phytoplanktonblüten.

Aus praktischen und logistischen Gründen wird in den meisten saisonalen Studien die Beprobung wöchentlich, vierzehntägig oder monatlich durchgeführt (z.B. Poremba *et al.*, 1999b; Pinhassi and Hagström, 2000; Eilers *et al.*, 2001; Heidelberg *et al.*, 2002). Es ist jedoch nicht bekannt, in welchem Maße ein solches Beprobungsintervall für den gegebenen Zeitraum repräsentativ ist. Die Bedeutung von Populationsveränderungen in aufeinanderfolgenden Probennahmen könnte besser beurteilt werden, wenn die feinskaligen zeitlichen Veränderungen innerhalb einer Jahreszeit an einem Ort bekannt wären. Weiterhin ist bislang noch unklar, ob diese kurzfristige zeitliche Variabilität in verschiedenen Planktongruppen ähnlich hoch ist, oder ob es stabilere und instabilere prokaryotischen Populationen gibt, zum Beispiel aufgrund unterschiedlicher Wachstumsstrategien (Pernthaler *et al.*, 2001a). Das Wissen über die täglichen Veränderungen verschiedenster Gruppen von Mikroorganismen innerhalb einer Saison in Verbindung mit Änderungen der abiotischen und biotischen Umwelt könnte daher unser Verständnis der möglichen Lebensformtypen innerhalb der planktischen marinen Mikroorganismen erweitern.

4. Strukturierung der Bakteriengemeinschaft durch selektiven Fraßdruck

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die bakterielle Mortalität im marinen Plankton zu in etwa gleichen Anteilen von Protisten und Viren verursacht wird (del Giorgio *et al.*, 1996), (Fuhrman and Noble, 1995; Sherr and Sherr, 1994; Thingstad, 2000; Thingstad and Lignell, 1997; Weinbauer and Hofle, 1998). Heterotrophe Nanoflagellaten (HNF) sind die wichtigsten planktischen Bakterivoren (Fenchel, 1986) und in zahlreichen Studien in limnischen und marinen Systemen wurde der selektive Fraßdruck von HNF auf die Bakteriengemeinschaft nachgewiesen. Die bevorzugten Beuteorganismen heterotropher Nanoflagellaten besitzen eine Zelllänge von ca. 1-4 μm . Bakterien mit einer Zellgröße von $< 1 \mu\text{m}$ oder $> 4 \mu\text{m}$ sind daher zumindest teilweise fraßgeschützt (González *et al.*, 1990; Simek and Chrzanowski, 1992; Jürgens and Güde, 1994). Da viele Bakterien ihre mittlere Zellgröße in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate ändern (Ingraham *et al.*, 1983), werden vermutlich schnellwachsende Bakterien und bakterielle Teilungsstadien besonders stark durch Fraßdruck reduziert (Sherr *et al.*, 1992; González *et al.*, 1993).

Aus Süßwasserstudien ist bekannt, dass HNF ihre Beute nicht nur nach phänotypischen Kriterien selektieren, sondern auch die genotypische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft beeinflussen (Simek *et al.*, 1997; Hahn and Höfle, 1999; Jürgens *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 2001b; Simek *et al.*, 2001; Jürgens and Matz, 2002). Qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften weisen auch im marinen Plankton auf einen strukturierenden Einfluss heterotropher Nanoflagellaten hin (Suzuki, 1999; Schäfer *et al.*, 2000; Massana *et al.*, 2001). In diesen Studien konnte allerdings keine quantitative Beziehung zwischen den Dynamiken individueller Bakterienpopulationen, den phänotypischen Eigenschaften einzelner Zellen und der Räuberichte aufgezeigt werden. Eine Quantifizierung der selektiven Mortalität definierter taxonomischer Bakteriengruppen könnte klären, wie Fraßdruck die bakterielle Zusammensetzung strukturiert und so zum Verständnis der bakteriellen Variabilität in marinen Plankton beitragen.

Ein Vergleich zwischen Kultivierungserfolgen und *in situ* Abundanzbestimmungen (Eilers *et al.*, 2000a; Eilers *et al.*, 2001) von Bakterien der Deutschen Bucht zeigt, dass einige Bakteriengruppen in nahezu jedem Kultivierungsansatz auftreten, jedoch im freilebenden, prokaryotischen Picoplankton des küstennahen Oberflächenwassers zu keiner Jahreszeit nennenswerte Populationsdichten ausbilden. Es handelt sich hierbei um Vertreter der γ -Proteobakterien, insbesondere der Gattungen *Alteromonas*, *Colwellia*,

Pseudoalteromonas und *Vibrio*. Eilers *et al.* (2000b) fanden heraus, dass *Alteromonas* / *Colwellia*-Populationen in filtriertem Standortwasser innerhalb von 48 h zu hohen Abundanzen anwachsen. Bei zusätzlicher Substratzugabe in Form von niedrig konzentrierten Aminosäuren, Mono- und Disacchariden dominieren *Vibrio*-Arten und *Pseudoalteromonas* / *Colwellia*-Populationen. Die schnelle Anreicherung dieser Bakterien impliziert, dass sie sofort und kompetitiv auf Änderungen der Wachstumsbedingungen reagieren können. Solch eine opportunistische Wachstumsstrategie sollte in einer Umwelt wie der Deutschen Bucht, in der biotische und abiotische Parameter einer hohen Variabilität unterliegen, einen Selektionsvorteil darstellen und so zumindest kurzfristig hohe Abundanzen dieser Bakteriengruppen ermöglichen (Radach *et al.*, 1990). Warum diese Bakterien dennoch in der Umwelt so selten sind, könnte im Zusammenhang mit ihrer Zellgröße stehen, denn sie bilden üblicherweise größere Zellen als sogenannte „oligotrophe“ marine Isolate (Eilers *et al.*, 2000a). Es wäre daher möglich, dass diese schnell anreicherbaren γ -Proteobakterien aufgrund ihrer Zellgröße einer selektiven Mortalität durch Fraßdruck unterliegen.

5. Molekulare Analyse des prokaryotischen Picoplanktons

Autökologische Untersuchungen am mikrobiellen Plankton- sind nur möglich, wenn die verschiedenen Populationen mit ausreichender taxonomischer Auflösung unter *in situ* Bedingungen identifiziert und quantifiziert werden können. Eine derartige detaillierte Analyse der prokaryotischen Lebensgemeinschaften und der Nachweis dominanter Bakteriengruppen im mikrobiellen Plankton war aus methodischen Gründen lange Zeit nur eingeschränkt durchführbar. Erst mit Einführung des kultivierungsunabhängigen rRNA-Ansatzes (Olsen *et al.*, 1986; Giovannoni *et al.*, 1988) bei dem aus der Umwelt extrahierte 16S rDNA amplifiziert und sequenziert wird, wurde die hohe phylogenetische Diversität des marinen prokaryotischen Picoplanktons erkannt (Fuhrman *et al.*, 1989; Giovannoni *et al.*, 1990; Britschgi and Giovannoni, 1991; DeLong, 1992; DeLong *et al.*, 1993). Die Identifizierung von Einzelzellen verschiedener Taxa und deren Quantifizierung in der Umwelt wurde mit der Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht (Amann *et al.*, 1990a; DeLong *et al.*, 1989; Giovannoni *et al.*, 1988; Stahl *et al.*, 1988). Dabei wird die Umweltprobe mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden hybridisiert, welche spezifisch an die 16S- oder 23S rRNA in Bakterienzellen binden und damit einer mikroskopischen Unterscheidung verschiedener Bakterientaxa erlauben. Dank

der inzwischen umfangreichen und stets wachsenden rRNA-Sequenzdatenbanken können Sonden mit unterschiedlicher taxonomischer Auflösung auf verschiedenen Verwandtschaftsebenen eingesetzt werden.

Limitierungen in der Detektion von kleinen, nur schwach oder gar nicht mit einfach-fluoreszenzmarkierten Sonden färbbaren Umweltbakterien führten zur Entwicklung sensitiverer Methoden. Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Tyramidsignalverstärkung (Bobrow *et al.*, 1989; Schönhuber *et al.*, 1997) werden die Zellen mit Meerrettichperoxidase- (HRP-) markierten Oligonukleotidsonden hybridisiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Tyramiden inkubiert. Durch die Umsetzung und kovalente Bindung großer Tyramidmengen in den Zielzellen wird eine bis zu 1000-fache Sensitivitätssteigerung erreicht (Berghorn *et al.*, 1994; Sanno *et al.*, 1996). Die Weiterentwicklung dieser Methode führte zu deutlich höheren *in situ* Detektionsraten hybridisierter Zellen im marinen Picoplankton (Pernthaler *et al.*, 2002b).

6. Analyse der Lebensgemeinschaft des marinen Nanoplanktons

Die Detektion und Quantifizierung kleiner hetero- und mixotropher Protisten, insbesondere Flagellaten, aus Umweltproben erfolgt häufig mittels Epifluoreszenzmikroskopie (z.B. Brandt and Sleight, 2000; Caron, 1983). Diese Methode erlaubt im Gegensatz zur Lebendzählung die Erhebung umfangreicher Datensätze, z.B. zur räumlichen oder zeitlichen Verteilung von Lebensgemeinschaften bei gleichzeitiger Berücksichtigung mehrerer Replikate, denn die Planktonproben werden fixiert, auf Polykarbonatmembranen konzentriert und sind bei -20°C für längere Zeit lagerfähig. Aufgrund der Fixierung und Konzentration des Probenmaterials bleiben meist nur sehr wenige distinkte morphologische Eigenschaften der oft sehr fragilen Einzeller erhalten (Jerome *et al.*, 1993). So können lediglich Summenparameter, wie z.B. die Abundanz aller heterotrophen (HNAN) oder phototrophen (mixo- und autotrophen; PNAN) Nanoplankter bestimmt werden (Berninger *et al.*, 1991a; Calbet *et al.*, 2001; Caron, 1983). Die Unterscheidung der Ernährungsweise erfolgt hierbei anhand der roten Autofluoreszenz chlorophyllhaltiger Zellen unter Grünlichtanregung im Epifluoreszenzmikroskop. Die Identifizierung einzelner Organismen mit Schlüsselfunktionen innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes ist auf diese Weise allerdings nicht möglich.

Die molekularbiologische Analyse von Organismen aus verschiedenen Habitaten mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit spezifischen rRNA-gerichteten

Oligonukleotidsonden erwies sich als bahnbrechend bei der Identifizierung und Quantifizierung von Prokaryoten (Kapitel 4). Das Potenzial dieser Methode ist allerdings abhängig von der Anzahl der verfügbaren rRNA Sequenzen in öffentlichen Datenbanken, denn die Spezifität der FISH-Sonden auf definierte phylogenetische Gruppen kann nur anhand bislang bekannter Sequenzen angegeben werden. Mit der stets wachsenden Anzahl von eukaryotischen 18S rRNA Sequenzen aus aquatischen Habitaten (Díez *et al.*, 2001; López-García *et al.*, 2001; Moon-van der Staay *et al.*, 2001; Stoeck and Epstein, 2003) wird diese Methode für die Protistenökologie zunehmend attraktiver. Sie besitzt das Potenzial, die *black box* der heterotrophen und phototrophen Nanoflagellaten innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes zu öffnen und die ökologische Bedeutung definierter phylogenetischer Gruppen zu klären.

Für eine routinemäßige Anwendung von FISH auf Protistenzellen aus Umweltproben sind allerdings grundlegende Abänderungen der bisherigen Protokolle erforderlich. Die oft sehr geringen Intensitäten der Hybridisierungssignale mit einfach-fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden können auch bei marinen Protisten signifikant verstärkt werden durch den Einsatz von HRP-markierten Sonden und fluoreszenzmarkierten Tyramiden (Not *et al.*, 2002). In der genannten Studie wurden allerdings ausschließlich phototrophe Protisten analysiert. In anderen Arbeiten wiederum wurden lediglich heterotrophe Protisten untersucht (Caron *et al.*, 1999; Fried *et al.*, 2002; Lim, 1996; Lim *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 1997).

Insbesondere innerhalb der ökologisch bedeutenden, aber phylogenetisch sehr diversen Gruppe der Nanoflagellaten treten unterschiedliche Ernährungsweisen bei zum Teil phylogenetisch eng verwandten Arten auf (Cavalier-Smith, 2000). Gegenwärtig geht dieser ökologisch äußerst relevante Unterschied durch die molekularen Färbemethoden allerdings verloren. Bei der Untersuchung komplexer planktischer Protistengemeinschaften mit FISH verhindert die Überfärbung der Chlorophyllautofluoreszenz phototropher Organismen durch die üblichen Fluoreszenzfarbstoffe eine Unterscheidung zwischen hybridisierten und autofluoreszenten Zellen, sowie zwischen hybridisierten heterotrophen und phototrophen Zellen.

7. Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die taxonomische Zusammensetzung und die Populationsdynamik des mikrobiellen marinen Planktons der Nordsee vor Helgoland untersucht (Station ‚Helgoland Reede‘, 54.09 N, 7.52 O). Der Schwerpunkt lag hierbei auf den taxonspezifischen Abundanzänderungen innerhalb der Bakteriengemeinschaft sowie dem Aufdecken möglicher Zusammenhänge dieser Variabilität zu abiotischen und biotischen Faktoren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die innersaisonalen, zeitlich feinskaligen Abundanzänderungen verschiedener Populationen des Bakterioplanktons *in situ* analysiert. Dazu wurden in drei aufeinanderfolgenden Jahren im Frühjahr bzw. Sommer über einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen werktägliche Proben untersucht. Parallel zur Analyse der bakteriellen Populationsdynamik mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Tyramidsignalverstärkung (FISH-TSA) wurden physiko-chemische Parameter und die Abundanzen von heterotrophen und phototrophen Protisten bestimmt. Damit sollte nach möglichen Zusammenhängen zwischen der Variabilität verschiedener Bakterienpopulationen und abiotischen und biotischen Faktoren gesucht werden. Dies sollte letztendlich Aufschluss über die Stabilität individueller Bakterienpopulationen bei wechselnden Umweltbedingungen geben.

Im zweiten Teil dieser Studie stand die Frage nach möglichen direkten Interaktionen zwischen Bakterien und heterotrophen Nanoflagellaten (HNF) im Vordergrund. Konkret sollte die Hypothese geprüft werden, dass die schnell anreicherbaren Mitglieder der planktischen γ -Proteobakterien (Kapitel 4) trotz ihrer potenziell hohen Wachstumsraten in Anwesenheit von HNF keine signifikanten Populationen ausbilden können. Zu diesem Zweck wurden drei unterschiedliche Räuber-Beute-Szenarien simuliert (unmanipuliertes, 0.8 μm -filtriertes und 1:10-verdünntes Standortwasser). Anhand der sich entwickelnden Populationsdynamiken sollte in den drei Behandlungsansätzen die unterschiedliche Mortalität individueller Bakterienpopulationen durch den selektiven Fraßdruck der HNF nachgewiesen werden.

Der dritte Teil der Arbeit widmete sich der Verbesserung der FISH-Methodik, um neben den Bakterien auch die Flagellaten, insbesondere die kleinen Arten des marinen Planktons, routinemäßig taxonomisch besser aufzutrennen. Flagellaten in der Wassersäule der Deutschen Bucht sollten mittels FISH-TSA mit 18S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden identifiziert und quantifiziert werden. Darüber hinaus wurde ein

Fluoreszenzfarbstoff gesucht, der nicht mit dem Emissionsspektrum von Chlorophyll *a* überlappt, um trotz der FISH-Färbung zwischen auto- und heterotrophen Ernährungstypen unterscheiden zu können. Schließlich wurde das Protokoll mit neuentwickelten Sonden für ökologisch interessante Gruppen von Nano- (und Pico-) flagellaten an Reinkulturen und Umweltproben validiert.

B Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Publikationen zusammengefasst und im Zusammenhang diskutiert. Dieser Abschnitt soll allerdings nicht die detaillierten Diskussionen der Einzelpublikationen ersetzen, auf die deshalb an dieser Stelle verwiesen wird. Ausführlicher werden hier Aspekte erläutert, die in den Publikationen nicht oder nur kurz behandelt werden.

1. Innersaisonale Variabilität mikrobieller Planktongemeinschaften in der Deutschen Bucht

Im Rahmen einer Umweltstudie wurde die innersaisonale Variabilität des Pico- und Nanoplanktons in der Deutschen Bucht der Nordsee (Station Helgoland Reede: 54.09 N, 7.52 O) untersucht. Die Beprobungen erfolgten in drei Untersuchungszeiträumen von jeweils vier bis fünf Wochen im August/September 2000, Mai/Juni 2001 und August/September 2002. Werktäglich durchgeführte Probennahmen ermöglichten eine feinskalige temporäre Auflösung der Dynamik der Pico- und Nanoplanktonpopulationen. Innersaisonale Änderungen der Abundanzen und der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft wurden im Kontext von abiotischen (allgemeine Wetterlage, Temperatur, Salzgehalt, Nährstoffkonzentrationen) und biotischen (Abundanzänderungen der photo- und heterotrophen Protisten) Faktoren interpretiert.

Die Deutsche Bucht ist ein sehr dynamisches System mit einer mittleren Wasseraustauschzeit von nur 2-3 Monaten. August ist in der Regel der Monat mit der höchsten Niederschlagsmenge, was auch die größeren Schwankungen des Salzgehalts während der zwei Untersuchungsperioden im August im Vergleich zur Probennahme im Juni 2001 erklärt. Ein drastischer Salinitätseinbruch Ende August 2002 auf < 29 psu fiel zeitlich mit den höchsten gemessenen Nährstoffkonzentrationen und ungewöhnlich starken Niederschlägen zusammen, die in Österreich, Tschechien und Deutschland extreme Hochwassersituationen verursachten. Auch andere physiko-chemische und biologische Parameter unterschieden sich stark im August/September 2000 und 2002. So waren beispielsweise 2002 die mittlere Temperatur und die Abundanzen der Bakterien (Abb. 4) und des Phytoplanktons signifikant höher als 2000. Die Abundanz der heterotrophen Nanoflagellaten (HNF) hingegen war im August 2002 deutlich niedriger als im August

2000 (Abb. 4), was vermutlich auf den stärkeren Fraßdruck durch höhere Zooplanktonabundanzen im August 2000 zurückzuführen war (Mursys-Archiv, http://www.bsh.de/Meeresumwelt/Mursys/Mursys_001/archiv.html). Die taxonomische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft variierte ebenfalls deutlich zwischen diesen

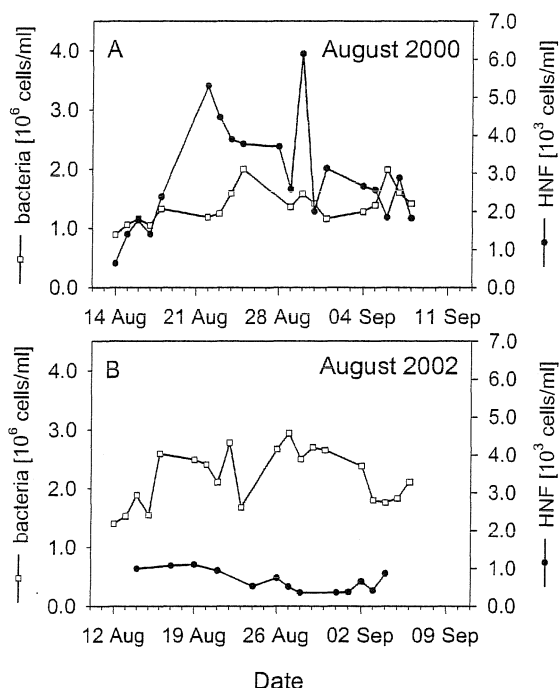


Abbildung 4: Abundanzverlauf der Bakterien und heterotrophen Nanoflagellaten an der Meeresstation 'Helgoland Reede' im Untersuchungszeitraum August 2000 (A) und August 2002 (B).

beiden Untersuchungszeiträumen. Der relative Anteil der *Bacteroidetes*, γ -Proteobakterien und *Roseobacter* spp. an der prokaryotischen Gesamtgemeinschaft war im August 2000 signifikant höher als im August 2002 (Mann-Whitney-U-Tests, $p_{(\text{Bact.})} = 0.003$, $p_{(\gamma\text{-Proto.})} = 0.001$, $p_{(\text{Ros.})} < 0.001$). Interessanterweise unterschieden sich die absoluten Abundanzen (Zellzahl ml^{-1}) dieser Gruppen jedoch nicht zwischen den beiden Jahren. Dies weist darauf hin, dass die insgesamt höhere Abundanz der heterotrophen Prokaryoten im August 2002 auf andere, derzeit noch unbekannte Bakterienpopulationen zurückzuführen war.

Im Untersuchungszeitraum Juni 2001 stieg die Wassertemperatur kontinuierlich an. Während der ersten Hälfte dieses Zeitraumes folgten die Abundanzen von HNF und Bakterien dem typischen Muster von Räuber-Beute-Beziehungen. Ungewöhnlich war allerdings, dass sich die Abundanzen beider Gruppen schon deutlich vor dem Zusammenbruch der Phytoplanktongemeinschaft verringerten. Der auffälligen Abnahme der prokaryotischen Gesamtabundanz ging ein signifikanter Rückgang des Anteils derjenigen Zellen voraus, die mit der allgemeinen Bakteriensonde EUB 338 detektierbar waren (Abb. 5). Da die phylogenetische Analyse der bakteriellen Zusammensetzung mit der gegenüber schwankenden rRNA-Gehalten robusten FISH-TSA-Technik erfolgte (Pernthaler *et al.*, 2002b) und auch der Anteil mariner Euryarchaeen nicht zunahm, war ein Großteil der Bakterien offensichtlich schon vor der Abundanzabnahme nicht mehr lebensfähig. Aus der Literatur ist bekannt, dass im Plankton periodisch ein hoher Prozentsatz toter Zellen auftreten kann (Heissenberger *et al.*, 1996; Zweifel and Hagstrom, 1995). Die Ursache für den plötzlichen Rückgang des Anteils lebensfähiger

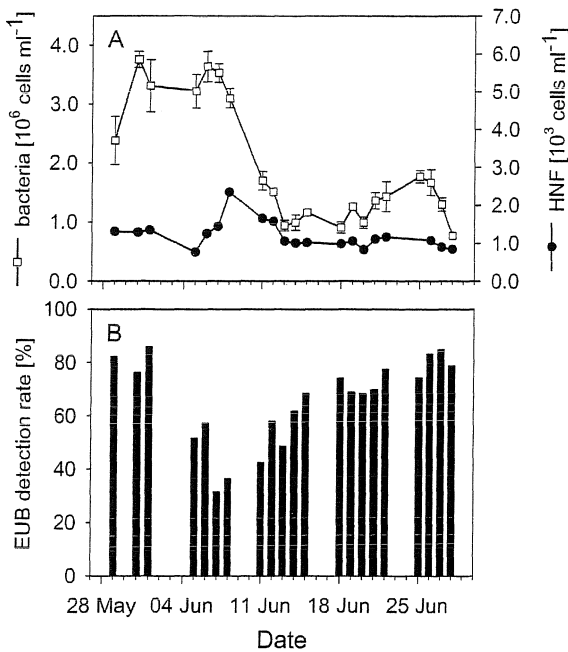


Abbildung 5: Abundanzverlauf der Bakterien und heterotrophen Nanoflagellaten an der Meeresstation 'Helgoland Reede' im Untersuchungszeitraum Juni 2001 (A) und Detektionsrate der *Bacteria* nach FISH-TSA mit der Sonde EUB 338 im gleichen Zeitraum (B).

durch die untersuchten Bakterienpopulationen erklärt werden konnte. Dem anschließend beobachteten Wiederanstieg der FISH-Detektionsrate folgten allerdings lediglich Vertreter der marinen *Roseobacter* mit einer Zunahme der relativen Abundanz. Mit der Gruppensonde ROS 537 war allerdings nicht zu klären, ob es sich hierbei womöglich nur um Verschiebungen innerhalb dieser Gruppe handelte. Alle anderen untersuchten Bakteriengruppen konnten innerhalb des Untersuchungszeitraums ihre ursprünglichen relativen Abundanzen nicht wieder etablieren.

Die allgemeinen FISH-Sonden für die Gruppen *Bacteroidetes* (CF 319a) und γ -Proteobakterien (GAM 42a) hybridisieren wahrscheinlich mit einer Vielzahl ökologisch distinkter Populationen. *Bacteroidetes* repräsentierten in allen Untersuchungsperioden ca. 20-40% der Gesamtzellzahl. Diese Abundanz wurde auch in anderen Untersuchungen der Deutschen Bucht und anderen küstennahen Habitaten gefunden (Cottrell and Kirchman, 2000a; Eilers *et al.*, 2001). Gegenwärtig kann nur ein Anteil von ca. 10% dieser wichtigen Gruppe des heterotrophen Picoplanktons taxonomisch weiter aufgeschlüsselt und der Gruppe *Cytophaga marinoflava* / *C. latercula* (Eilers *et al.*, 2001) zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu konnten bis zu 75% der ebenfalls bedeutenden γ -Proteobakterien durch die beiden Untergruppen SAR 86 und NOR 5 erklärt werden. Im Mittel betrug die Abundanz

Zellen in dieser Studie bleibt jedoch ungeklärt. Über einen möglichen Zusammenhang mit dem Sturm vom 3. Juni kann lediglich spekuliert werden. Eher unwahrscheinlich erscheint virale Lysis als Ursache dieses massenhaften Auftretens nichthybridisierbarer Zellen. Da planktische marine Viren typischerweise sehr wirtsspezifisch sind (Wichels *et al.* 2002), müsste es zu mehreren Virenausbrüchen gleichzeitig gekommen sein, um die beobachtete Wirkung auf die doch sehr diverse Bakteriengemeinschaft hervorzurufen. Parallel zum allgemeinen Rückgang der mittels FISH detektierbaren Zellen sank auch der Anteil der Gemeinschaft, der

der γ -Proteobakterien ca. 10-18% der Gesamtbakterienabundanz. Jedoch waren rasche Änderungen mit Spitzenwerten bis zu 34% für diese Gruppe charakteristisch und spiegeln sich auch in den hohen wöchentlichen Varianzkoeffizienten wieder (Abb. 6). Diese hohe Variabilität kann nur bedingt durch die ebenfalls sehr variable Gruppe SAR 86

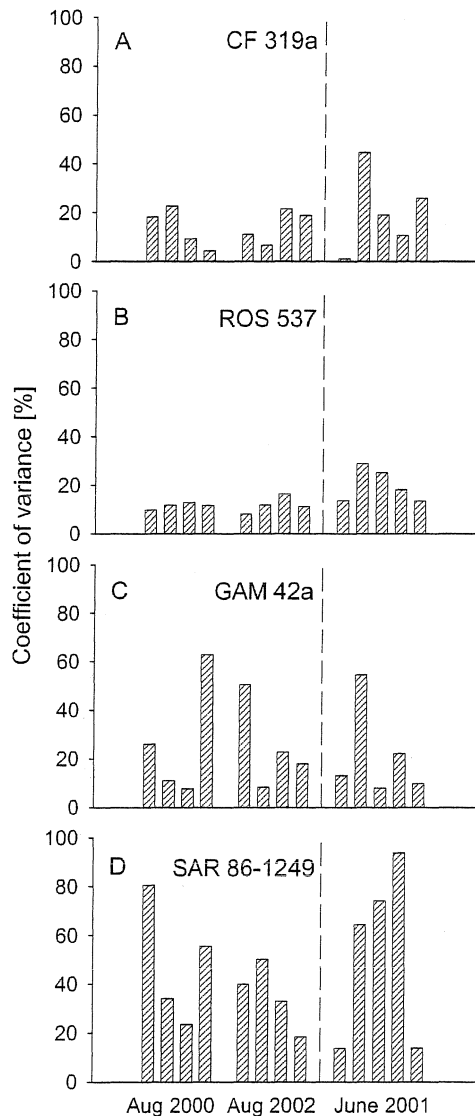


Abbildung 6: Wochenweise berechnete Variationskoeffizienten der relativen Abundanzen von Bakteriengruppen, die mit den Sonden CF 319a (*Bacteroidetes*, A), ROS 537 (*Roseobacter* spp., B), GAM 42a (γ -Proteobakterien, C) und SAR 86-1249 (SAR 86-Gruppe, D) detektiert wurden. Die vertikale Linie grenzt den Untersuchungszeitraum Juni 2001 gegen die Untersuchungszeiträume August 2000 und 2002 ab.

erklärt werden. Es ist bekannt, dass andere planktische Vertreter der γ -Proteobakterien, beispielsweise *Alteromonas* spp., *Colwellia* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. in der Lage sind, sehr schnell auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren (Eilers *et al.*, 2001). Unsere Inkubationsexperimente weisen jedoch darauf hin, dass diese Arten sehr effizient durch den Fraßdruck von HNF unterdrückt werden (Beardsley *et al.*, 2003; siehe Kapitel 2). Da diese Arten im marinen Pelagial der Deutschen Bucht bisher nur in sehr geringen Abundanzen detektiert worden sind (Eilers *et al.*, 2001), wurden sie in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Es lässt sich daher nur spekulieren, ob die hohe wöchentliche Variabilität der γ -Proteobakterien durch kurzlebige Blüten solch opportunistischer Bakterien ausgelöst worden sein könnte. Im Gegensatz zu den *Bacteroidetes* und γ -Proteobakterien bildeten die marinen *Roseobacter* spp. sehr stabile Populationen (Abb. 7) mit nur niedrigen wöchentlichen Varianzkoeffizienten (Abb. 6). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verschiedenen phylogenetischen Gruppen grundsätzlich unterschiedlich auf sich verändernde Umweltbedingungen reagieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kurzfristige Variabilität im Pelagial der Deutschen Bucht offensichtlich ein wichtiges Phänomen ist, das bei den üblichen wöchentlichen bis monatlichen Beprobungsintervallen nicht entsprechend berücksichtigt wird. Die Stabilität der untersuchten Bakterienpopulationen variierte deutlich innerhalb und zwischen den Jahreszeiten sowie zwischen aufeinanderfolgenden Jahren. Weiterhin wurden auf taxonomischer Ebene Unterschiede bezüglich der Populationsstabilität

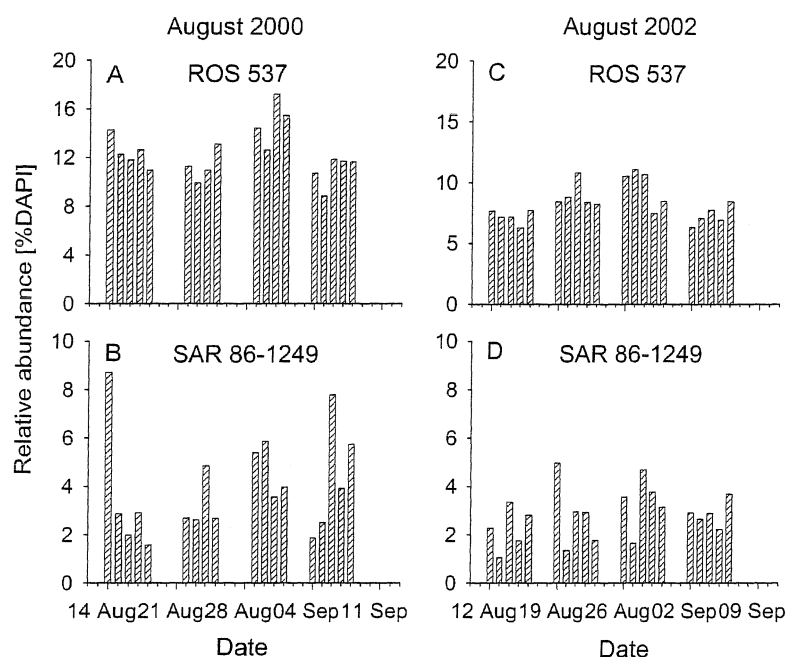


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der relativen Abundanzen von Bakteriengruppen, die mit den Sonden ROS 537 (*Roseobacter* spp., A+C) und SAR 86-1249 (SAR 86-Gruppe, B+D) detektiert wurden. Linke Seite: August 2000, rechte Seite: August 2002.

wiesen (Abb. 7). Gegenwärtig kann noch nicht beurteilt werden, in welchem Ausmaß die gruppenspezifischen Muster der Variabilität auf horizontale Verfrachtung mit dem Wasserkörper oder auf zeitliche Sukzession und mikrobielles Wachstum zurückzuführen sind.

2. Räuber-Beute-Interaktionen zwischen Bakterien und heterotrophen

Nanoflagellaten der küstennahen Nordsee

In einem Inkubationsexperiment wurde an Wasserproben der Station Helgoland Reede die Hypothese überprüft, dass schnell anreicherbare, in diesem Sinn opportunistische, marine γ -Proteobakterien von überdurchschnittlicher Zellgröße im Plankton durch Räuber

festgestellt. So war beispielsweise die relative Häufigkeit von *Roseobacter* spp. trotz kurzfristiger Änderungen der physiko-chemischen und anderer biotischer Parameter in beiden

Untersuchungszeiträumen im August auffällig konstant, wohingegen Vertreter der SAR 86-Gruppe sehr hohe Abundanzfluktuationen auf-

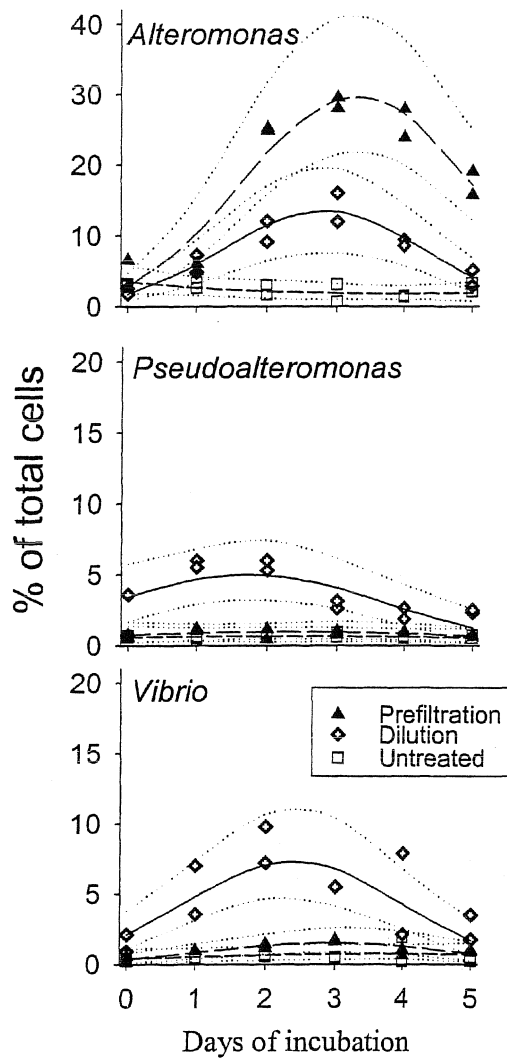


Abbildung 8: Relative Anteile der Gattungen *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* und *Vibrio* an der mikrobiellen Gesamtgemeinschaft in den verschiedenen Behandlungen. Durchgezogene Linien repräsentieren die mittels logistischer Regression modellierten Abundanzverläufe, gestrichelte Linien stellen obere und untere Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls dar.

unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurden drei unterschiedliche Räuber-Beute-Szenarien simuliert, in denen die Dynamik von Bakterienpopulationen über einen Zeitraum von sechs Tagen verfolgt wurde.

Im ersten Behandlungsansatz wurden Bakterienräuber (heterotrophe Nanoflagellaten) durch zweimalige Vorfiltration einer Wasserprobe über Filtermembranen mit einer Porenweite von $0.8 \mu\text{m}$ entfernt. Erwartungsgemäß (Eilers *et al.*, 2000b) wuchsen innerhalb von 48 h Bakterien aus der Verwandtschaft von *Alteromonas* spp. zu hohen Dichten an (Abb. 8). Vermutlich aufgrund von Fehlern im Filtermaterial (Torrella and Morita, 1981) ist es jedoch faktisch unmöglich, kleine Protisten auf diese Weise vollständig auszuschließen, so dass sich in unserem Experiment bereits nach wenigen Tagen wieder eine schnell wachsende Population heterotropher Nanoflagellaten (HNF) ausbildete. Unsere Hypothese sagte für diesen Fall eine überproportionale Abnahme von *Alteromonas* spp. voraus.

In einem zweiten Ansatz wurde eine

Wasserprobe 1:10 mit $0.2 \mu\text{m}$ vorfiltriertem Standortwasser verdünnt. Einerseits reduziert die Verdünnung den Fraßdruck auf die Bakterien aufgrund einer geringeren Begegnungshäufigkeit (*encountering rate*) von Räuber und Beute. Andererseits bewirkt die Verdünnung vermutlich eine Substratzufuhr durch das $0.2 \mu\text{m}$ filtrierte Wasser (Goldman and Dennett, 1985) sowie eine höhere Substratverfügbarkeit pro Bakterienzelle. Dadurch verringert sich in diesem Ansatz die Konkurrenz um Ressourcen zwischen den Bakterienpopulationen. Auch bei dieser Behandlung nahm erwartungsgemäß die Abundanz von *Alteromonas* spp. zu. Zusätzlich bildeten Bakterien der Genera

Pseudoalteromonas spp. und *Vibrio* spp. ebenfalls dichtere Populationen aus (Abb. 8). Die Anreicherung dieser beiden Gruppen kann auf die veränderten Nährstoffverhältnisse infolge der Verdünnung zurückgeführt werden. Laut unserer Hypothese sollten auch in diesem Ansatz die relativen Häufigkeiten dieser drei Gattungen mit dem Wiederanstieg der Protistenabundanzen abnehmen. In beiden Behandlungsarten (Filtration und Verdünnung) wurde eine überproportionale Abnahme der opportunistischen γ -Proteobakterien bei steigendem Fraßdruck durch HNF festgestellt und somit die Ausgangshypothese bestätigt. Im dritten Ansatz mit unmanipuliertem Standortwasser, d.h. bei Anwesenheit der natürlichen Räuberpopulation, konnten diese Gattungen der γ -Proteobakterien wie erwartet

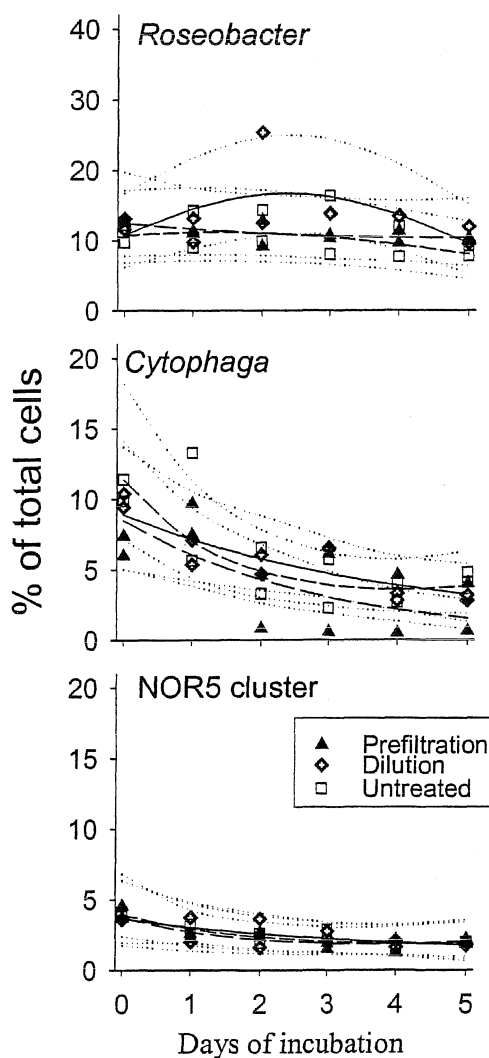


Abbildung 9: Relative Anteile der Bakterien aus der Verwandtschaft *Roseobacter* spp. und *Cytophaga marinoflava* / *C. latercula* und der NOR5-Gruppe an der mikrobiellen Gesamtgemeinschaft in den verschiedenen Behandlungen.

keine hohen Abundanzen ausbilden. In allen drei Behandlungsarten wurden außerdem die Populationsdynamiken von Bakterien mit durchschnittlicher Zellgröße verfolgt. In diesen Kontrollgruppen (*Roseobacter* spp., Vertreter des NOR5-clusters und der *Cytophaga marinoflava* / *C. latercula* - Gruppe) wurden keine behandlungsspezifischen Effekte beobachtet (Abb. 9). Das statistische Verfahren der gemischten logistischen Regression mit festen Effekten für Zeit und Behandlung und zufälligen Effekten für Replikate erwies sich als geeignet für die Analyse von Populationsverläufen aus binären Datensätzen (Prozentwerte). Durch die Bestimmung der mittleren Kurvenverläufe und ihrer Konfidenzintervalle konnte mittels Likelihood-Quotienten-Tests eine statistische Aussage darüber getroffen werden, welche Organismen in ihren individuellen Populationsverläufen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen zeigten.

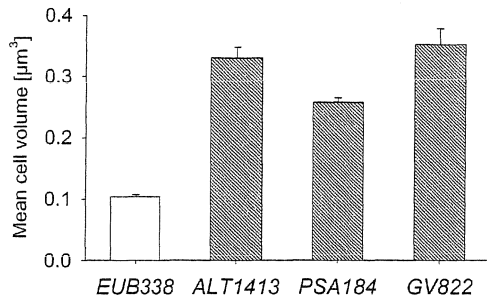


Abbildung 10: Mittleres Zellvolumen (\pm Standardfehler) aller FISH-gefärbter Bakterien und einzelner Bakterienpopulationen in der 1:10-Verdünnung am Tag 2. Verwendete FISH-Sonden: EUB 338 I-III, alle Bakterien; ALT 1413, *Alteromonas* spp.; PSA 143, *Pseudoalteromonas* spp.; GV 822, *Vibrio* spp..

Gesamtpopulation (Abb. 10), was Befunde von Pernthaler *et al.* (2001a) bestätigt, die zeigten, dass *Pseudoalteromonas* offensichtlich in keiner Wachstumsphase eine fraßgeschützte Zellgröße annimmt. Somit fielen diese Bakterienpopulationen ins bevorzugte Beutegrößenspektrum heterotropher Nanoflagellaten (Jürgens and Matz, 2002).

Der Zusammenhang zwischen den Bakterienpopulationen dieser drei Gattungen und den Räuberpopulationen wird schließlich durch die signifikant negative Korrelation zwischen den relativen Abundanzänderungen von *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. und den HNF-Abundanz im Verdünnungsansatz unterstützt (Abb. 11). Da viele bakterivore Flagellaten größenselektiv fressen (González *et al.*, 1990; Simek and Chrzanowski, 1992), ist die überproportionale Abnahme der relativen Abundanz dieser γ -Proteobakterien zwischen den Tagen 3 und 5 daher sehr wahrscheinlich auf selektive

Fraßmortalität zurückzuführen. Ein derartiger Einfluss des größenselektiven Fraßdrucks auf die taxonomische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft wurde bisher ausschließlich in limnischen Systemen nachgewiesen (Hahn and Höfle, 1999; Hahn and Hofle, 2001; Jürgens and Matz, 2002; Jürgens *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 2001b; Simek *et al.*, 2001; Simek *et al.*, 1997). Die vorliegende Studie

Flascheninkubationen mit filtriertem oder verdünntem Nordseewasser führen im allgemeinen zu einem Anstieg des Anteils großer γ -Proteobakterien an der bakteriellen Gemeinschaft und zu einer Erhöhung der mittleren bakteriellen Zellgröße (Eilers *et al.*, 2000b; Fuchs *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie stellten *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. ca. dreiviertel aller γ -Proteobakterien. Diese Bakterien waren signifikant größer als die bakterielle

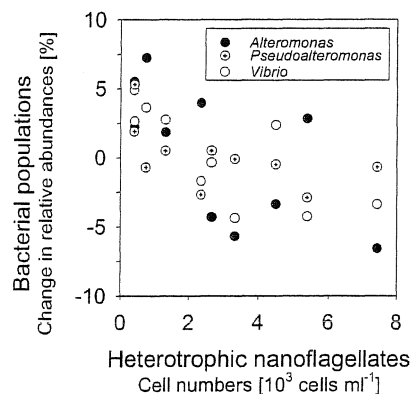


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen der Zellzahl der heterotrophen Nanoflagellaten und der Änderungen der relativen Abundanz von *Alteromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. und *Vibrio* spp. in der 1:10-Verdünnung. Negative y-Werte zeigen einen sinkenden Anteil an der Gesamtgemeinschaft an.

liefert wahrscheinlich die ersten experimentellen Hinweise für die Gültigkeit dieses konzeptionellen Modells in marinen Habitaten.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass der klassische Zusammenhang zwischen der Diversität einer Gemeinschaft und der selektiven Mortalität durch Fraßdruck (Tansley and Adamson, 1925) auch auf pelagische mikrobielle Gemeinschaften übertragbar ist. Dies mag insofern von allgemeinerem Interesse sein, als dass die Gattung *Vibrio* auch pathogene Arten beinhaltet, welche in Küstengewässern verbreitet sind und unter Umständen durch Protisten kontrolliert werden könnten (Chakraborty *et al.*, 2000; Colwell and Huq, 1999; Colwell *et al.*, 1981).

3. Entwicklung eines Protokolls zur Anwendung der FISH-TSA-Methode für eukaryotisches Nanoplankton

In den ersten beiden Teilen der Arbeit wurden die Protisten wie in vielen ökologischen Studien üblich (z.B. Berninger *et al.*, 1991a; Carrick *et al.*, 1991; Havskum and Skjoldborg Hansen, 1997) grob nach Größe und Ernährungsweise klassifiziert. Wie die Umweltstudie (Teil 1) zeigte, besteht das marine mikrobielle Plankton aus taxonomisch komplexen Lebensgemeinschaften mit vielfältigen Wechselwirkungen untereinander sowie mit Abhängigkeiten von abiotischen Umweltfaktoren. Das Inkubationsexperiment (Teil 2) ermöglichte gezielte und quantifizierbare Aussagen über Wechselwirkungen zwischen Teilpopulationen des Bakterioplanktons bekannter Identität auf der einen Seite und den heterotrophen Nanoflagellaten als nicht weiter aufgeschlüsselte Organismengruppe auf der anderen Seite. Zweifelsohne ist es für ökologische Studien ebenso wünschenswert, auch die Protisten auf effiziente Weise quantitativ zu identifizieren. Aussagen über die taxonomische Identität können durch den Vergleich mit kultivierten Vertretern Hinweise auf die Lebensweise verschiedener Arten von heterotrophen Nanoflagellaten geben. Darüber hinaus wurden mit diesem Forschungsansatz auch bisher unbekannte, d.h. nicht kultivierte Gruppen im marinen Plankton entdeckt (Massana *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase- (HRP-) markierten Oligonukleotidsonden in Kombination mit einer Tyramidsignalamplifizierung (TSA) an Protisten entwickelt. Durch den Einsatz eines neuen Fluorochroms (Alexa₃₅₀[®]) erlaubt dieses Protokoll die Detektion und Quantifizierung von phylogenetischen Protistengruppen bei gleichzeitiger

Klassifizierung ihres trophischen Status (autotroph / heterotroph). Ähnlich dem DNA-Farbstoff 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) emittiert der Fluoreszenzfarbstoff

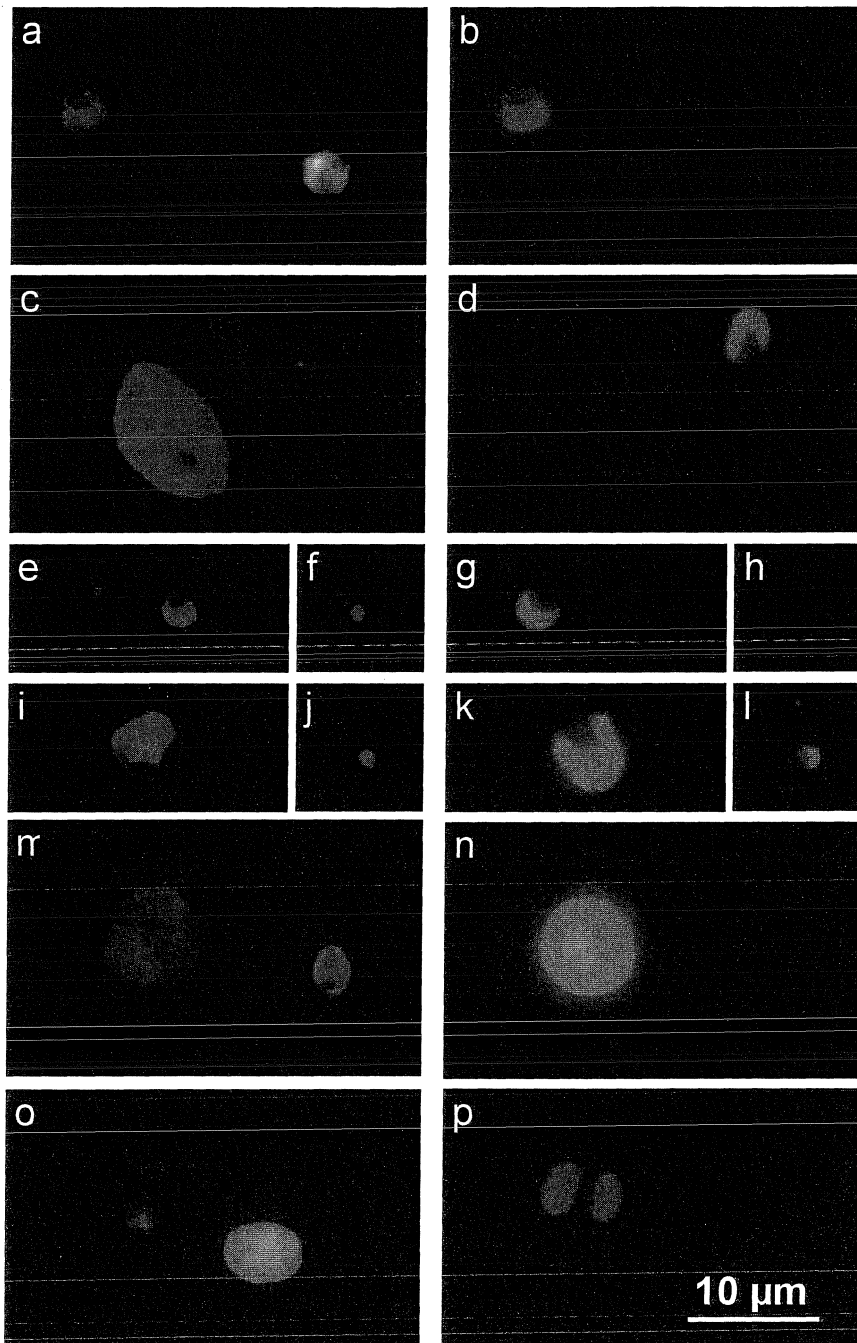


Abbildung 12: Epifluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Nanoplankton aus Kulturen und Umweltproben. Der Maßstab (10 µm) ist für alle Bilder gültig. a+b: Mischkultur von *Ochromonas* sp. (mixotroph) und *Paraphysomonas imperforata* (heterotroph). c-p: Nanoplankton aus Nordseeproben. Linke Seite: Blaue Hybridisierungssignale mit der Sonde EUK 516 bei UV-Lichtanregung; in einigen Fällen ist die rote Autofluoreszenz von Chlorophyll *a* zu erkennen. Rechte Seite: Orange-farbene Autofluoreszenz von Chlorophyll *a* von photoautotrophen Organismen bei Grünanregung; rein heterotrophe Organismen zeigen keine oder nur schwache Hintergrundsignale.

Alexa₃₅₀[®] bei UV-Anregung blaues Licht. So ist es nun möglich, die orange-rote Chlorophyllautofluoreszenz vom blauen Hybridisierungssignal zu unterscheiden (Abb. 12).

Eingangs wurde die Methode an Hand von Kulturen von heterotrophen und phototrophen (auto- und mixotroph) Protisten der Gruppe Heterokonta (Stramenopile) mit der allgemeinen Eukaryotensonde EUK516 (Amann *et al.*, 1990b) getestet (Abb. 12a+b). Anschließend wurde die Anwendbarkeit des Protokolls auf Umweltproben aus der Nordsee (Meeresstation Helgoland Reede) überprüft (Abb. 12c-p). FISH-TSA mit der allgemeinen Eukaryotensonde resultierte stets in leuchtend blauen Signalen bei UV-Anregung. Heterotrophe Zellen zeigten ausschließlich ein blaues Hybridisierungssignal, aber kein bzw. nur ein schwaches Hintergrundsignal bei Grünlichtanregung. Phototrophe Zellen emittierten bei Grünanregung zusätzlich leuchtend orangefarbenes Licht und oft war diese Chlorophyllfluoreszenz auch als dunkelrotes Signal neben dem blauen Hybridisierungssignal bei UV-Anregung zu sehen (Abb. 12a+m). Hinzuweisen ist hier auf die Verschiebung des Emissionsspektrums von Chlorophyll *a* hin zu längeren Wellenlängen. Statt der üblichen orange-roten Fluoreszenz bei Blaulichtanregung ist die Chlorophyllautofluoreszenz nach der Hybridisierung bei Grünlichtanregung am stärksten (orange), ein Intensitätsverlust der Fluoreszenz war jedoch nicht zu beobachten. Die Sonde NON338 (Wallner *et al.*, 1993), die zu keiner veröffentlichten Protistensequenz revers komplementär ist, wurde als Negativkontrolle benutzt. Sie zeigte niemals ein positives Hybridisierungssignal.

Zur Validierung unseres neuen Protokolls zur Quantifizierung von Protisten aus Umweltproben wurde es mit einer Standardmethode zur Zählung von Protisten mittels DAPI / FITC-Färbung und Epifluoreszenzmikroskopie (Sherr *et al.*, 1993b) verglichen (Abb. 13). Es konnte gezeigt werden, dass das neue Protokoll zur quantitativen Bestimmung mariner Nano-eukaryoten geeignet ist und im Vergleich zur Standardmethode kein Zellverlust beobachtet wurde. Im Gegenteil, mit Hilfe der FISH-TSA-Protokolls wurden signifikant höhere Abundanzen von heterotrophen (HNAN) und phototrophen (PNAN) Nanoplankton detektiert ($p_{\text{(HNAN)}} = 0.02$ und $p_{\text{(PNAN)}} = 0.01$, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben), was hauptsächlich auf die bessere Visualisierung kleiner Zellen (2-3 μm Zelllänge bzw. -durchmesser) zurückzuführen war. Lim *et al.* (1996) berichteten ebenfalls von höheren Gesamtabundanzen des Nanoplanktons mit biotinylierten Eukaryotensonden aufgrund einer besseren Detektierbarkeit kleiner und Partikel-assoziiertes Zellen. Organismen mit einer Zellgröße kleiner als 2-3 μm (Picoplankton) dominieren die Phytoplanktongemeinschaften offener Ozeane (Moon-van der Staay *et al.*,

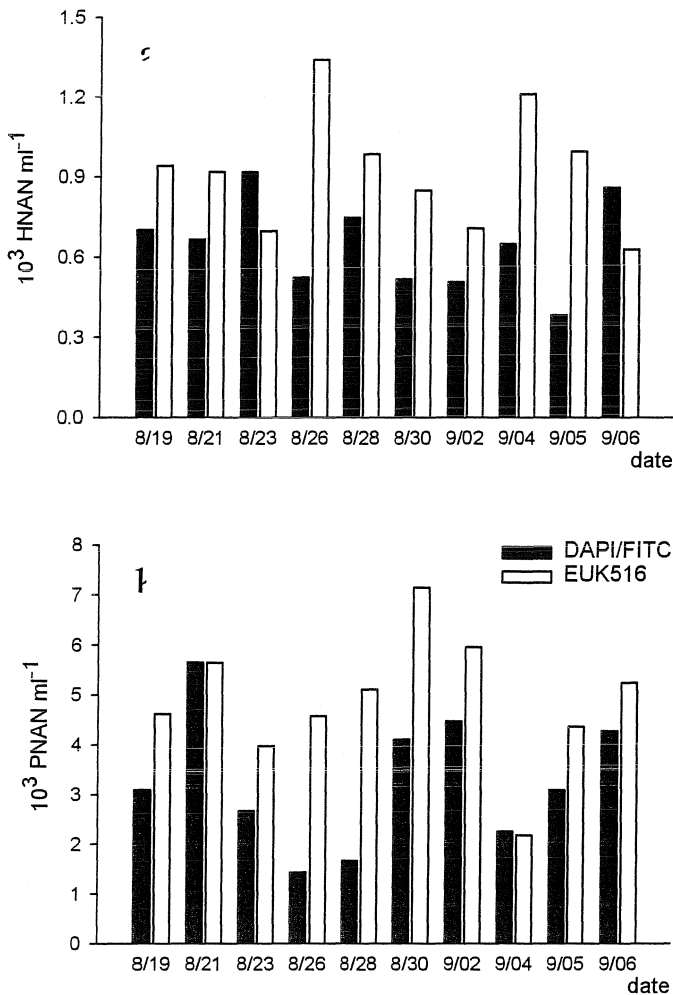


Abbildung 13: Epifluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Nanoplankton aus Kulturen und Umweltproben. Der Maßstab (10 μm) ist für alle Bilder gültig. a+b: Mischkultur von *Ochromonas* sp. (mixotroph) und *Paraphysomonas imperforata* (heterotroph). c-p: Nanoplankton aus Nordseeeproben. Linke Seite: Blaue Hybridisierungssignale mit der Sonde EUK 516 bei UV-Lichtanregung; in einigen Fällen ist die rote Autofluoreszenz von Chlorophyll *a* zu erkennen. Rechte Seite: Orange-farbene Autofluoreszenz von Chlorophyll *a* von photoautotrophen Organismen bei Grünanregung; rein heterotrophe Organismen zeigen keine oder nur schwache Hintergrundsignale.

beiden Methoden allerdings nur Organismen mit einer Zelllänge zwischen 2 und 20 μm quantifiziert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung spezifischer Sonden für einzelne Protistengruppen. Bisher war dies für phylogenetische Gruppen, in denen verschiedene Ernährungsmodi auftreten, problematisch, da mittels FISH der trophische Status der Zellen nicht direkt bestimmt und ihre Rolle im Nahrungsnetz daher ungewiss

2000). Auch wenn ihr Anteil an der marinen Gesamtbiomasse vielleicht eher gering ist, spielen sie eine wichtige Rolle für den Kreislauf von organischem Kohlenstoff im Plankton (Arndt and Mathes, 1991). Diese kleinen Eukaryoten können bei Färbungen mit allgemeinen DNA- oder Proteinfarbstoffen wie DAPI, respektive FITC leicht übersehen oder mit Prokaryoten verwechselt werden. FISH eliminiert dieses Problem, da die eingesetzten Oligonukleotidsonden und damit die resultierenden Fluoreszenzsignale spezifisch für die untersuchten phylogenetischen Gruppen sind. Mit dem neuen Protokoll wurden auch eindeutig Picoeukaryoten mit einem Zelldurchmesser kleiner als 2 μm nachgewiesen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden mit

blieb. Eine Lösung bietet hier die Entwicklung von Art- bzw. Gattungsspezifischen Sonden (Rice *et al.*, 1997; Caron *et al.*, 1999; Fried *et al.*, 2002). Grundsätzlich gilt bei der Sondenentwicklung für FISH-TSA und den damit verbundenen Spezifitätstests, dass neben

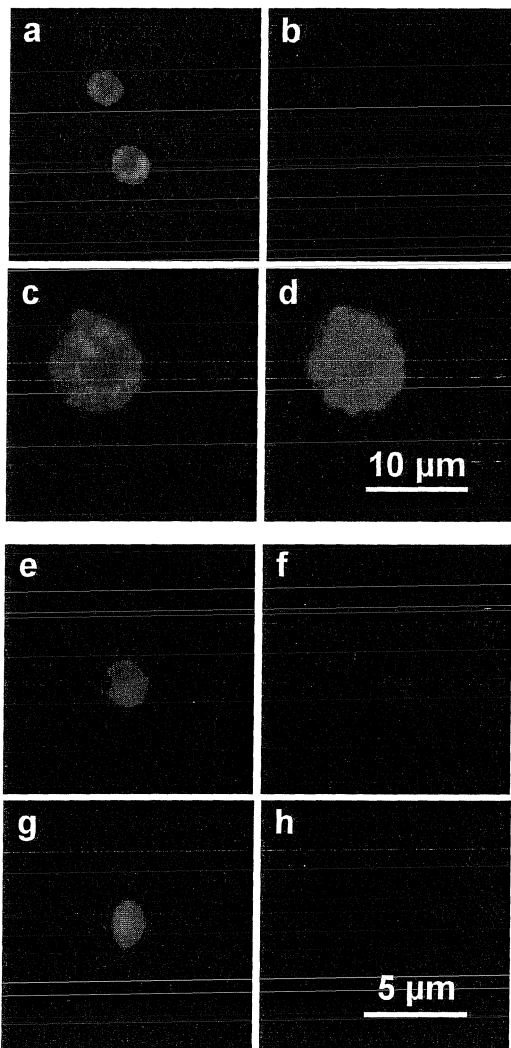


Abbildung 14: Epifluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Protisten nach FISH-TSA mit spezifischen Sonden. a-d: Mischkultur von *Pteridomonas danica* (heterotroph, Zielorganismus) und *Dictyocha speculum* (autotroph, kein Zielorganismus) nach Hybridisierung mit der für Pedinellales / Rhizochromulinales spezifischen Sonde. Maßstab: 10 µm. e-h: Eukaryotisches Picoplankton aus Nordseeproben nach Hybridisierung mit der Sonde NS4, die spezifisch für eine neue Gruppe der Heterokonten ('novel stramenopile') ist. Maßstab: 5 µm. Linke Seite: blaue Hybridisierungssignale bei UV-Lichtanregung. Rechte Seite: orange-farbene Autofluoreszenz von Chlorophyll *a*.

der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer auch die Sonden- und TSA-Konzentrationen einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifität einer eigentlich perfekten Sondensequenz haben. Daher ist es sehr wichtig, auch die Spezifität von Oligonukleotidsonden zu überprüfen, die bisher als einfach fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt wurden.

Ähnlich wie in Studien an planktischen marinen Prokaryoten (Eilers *et al.*, 2000a) zeigte sich auch für Protisten, dass kultivierte Formen wie beispielsweise der Flagellat *Paraphysomonas imperforata* oft sehr niedrige *in situ* Abundanzen in marinen Umweltproben aufweisen (Lim *et al.*, 1999). Umgekehrt konnten Massana *et al.* (2002) mit Hilfe von FISH-Sonden für bisher unkultivierte Gruppen der Heterokonta (Stramenopile) quantitativ bedeutende Populationen einer als „neue Stramenopile“ bezeichneten Gruppe von heterotrophen Nanoflagellaten im Mittelmeer nachweisen. Durch die Verwendung Cy3-markierten Sonden konnten die phagotrophen Eigenschaften dieser Zellen jedoch nur in Anreicherungskulturen nach Fraßexperimenten mit fluoreszenzmarkierten Bakterien (FLB) festgestellt werden.

Das hier präsentierte Protokoll ermöglicht simultan die Identifizierung der Protisten und den Nachweis von deren trophischen Status und ist daher technisch weniger aufwendig als die von Massana *et al.* verwendete Methode. Allerdings ist anzumerken, dass unser Protokoll zwischen heterotrophen und phototrophen (auto- und mixotrophen) Zellen unterscheidet, während in der von Massana *et al.* (2002) beschriebenen Methode zwischen autotrophen und phagotrophen (hetero- und mixotrophen) Organismen unterschieden wird. Die Quantifizierung des Anteils mixotropher Zellen an der Gesamtkonsumption von Bakterien wäre durch die Kombination beider Techniken möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Umweltproben von küstennahem Oberflächenwasser der Nordsee sowohl bereits veröffentlichte als auch neu entwickelte Sonden eingesetzt. Die hier entwickelte Oligonukleotidsonde (PEDI 1646: 5'-TTA CCT TCG ATC GGT AGG-3') ist spezifisch für die Gruppen Pedinellales und Rhizochromulinales, die innerhalb der Heterokonta zu den Dictyophyceae gehören. Die Gruppe Pedinellales umfasst bakterivore Protisten beispielsweise der Gattungen *Pteridomonas* und *Apedinella*, die häufig in Anreicherungskulturen auftreten über deren *in situ* Abundanz im marinen Pelagial bisher jedoch nur wenig bekannt ist. Die Spezifität der Sonde PEDI 1646 wurden mit Hilfe von Kulturorganismen erfolgreich überprüft (Abb. 14a-d). Allerdings zeigte sich, dass Vertreter dieser Gruppe in den untersuchten Proben aus der Deutschen Bucht im August 2002 keine nennenswerten Populationsdichten ausbildeten. Mit der Sonde NS4, die für eine Untergruppe der bisher unkultivierten „neuen Stramenopilen“ spezifisch ist (Massana *et al.*, 2002), wurden nur vereinzelt Zellen detektiert (Abb. 14e-h), deren Abundanz in obengenannten Umweltproben jedoch maximal 1% des heterotrophen Nanoplanktons (2-20 µm) betrug.

Diese geringen Detektionsraten sollten aber nicht entmutigen, da die Sondenentwicklung für Protisten und ihre Anwendung mittels FISH eine noch sehr junge Disziplin ist. Zusammenfassend sei festgehalten, dass die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Kombination mit einer Tyramidsignalverstärkung eine hochsensitive Methode zur quantitativen Detektion von Protisten aus aquatischen Umweltproben darstellt. Die Fluoreszenz des UV-anregbaren Farbstoffs Alexa₃₅₀[®] überlappt nicht mit der Chlorophyllautofluoreszenz. Die dadurch mögliche simultane Identifizierung des Ernährungsstatus erlaubt eine funktionale Kategorisierung der detektierten Organismen als potenzielle Konsumenten oder Produzenten auf der Ebene der sondenspezifischen, phylogenetischen Gruppe. Damit besitzt das hier vorgestellte Protokoll das Potenzial zur Detektion von Schlüsselorganismen im mikrobiellen Nahrungsnetz.

C Literaturverzeichnis

- Allredge, A.L. and Silver, M.W.** (1988) Characteristics, Dynamics and Significance of Marine Snow. *Progress in Oceanography*, **20**, 41-82.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A.** (1990b) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.
- Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A.** (1990a) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, **172**, 762-770.
- Anderson, D.M., White, A.W. and Baden, D.G.H.** (1985) *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam.
- Arndt, H. and Mathes, J.** (1991) Large heterotrophic flagellates form a significant part of protozooplankton biomass in lakes and rivers. *Ophelia*, **33**, 225-234.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F.** (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257-263.
- Beardsley, C., Pernthaler, J., Wosniok, W. and Amann, R.** (2003) Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2624-2630.
- Becker, G.A.** (1990) Die Nordsee als physikalisches System. In Lozan, J.L., Lenz, W., Rachor, E., Waterman, B. and von Westernhagen, H. (eds.), *Warnsignale aus der Nordsee*. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 11-27.
- Berghorn, K.A., Bonnett, J.H. and Hoffman, G.E.** (1994) Cfos Immunoreactivity Is Enhanced With Biotin Amplification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **42**, 1635-1642.
- Bernard, C. and Rassoulzadegan, F.** (1990) Bacteria or Microflagellates as a Major Food Source for Marine Ciliates - Possible Implications for the Microzooplankton. *Marine Ecology-Progress Series*, **64**, 147-155.
- Berninger, U.-G., Caron, D.A., Sanders, R.W. and Finlay, B.J.** (1991a) Heterotrophic flagellates of planktonic communities, their characteristics and methods of study. In Patterson, D.J. and Larsen, J. (eds.), *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. Clarendon Press, Oxford, Vol. 45, pp. 39-56.

- Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J. and Litt, G.J.** (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: application to immunoassays. *J. Immunol. Methods*, **125**, 279-285.
- Bouvier, T.C. and del Giorgio, P.A.** (2002) Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, **47**, 453-470.
- Brandt, S.M. and Sleight, M.A.** (2000) The quantitative occurrence of different taxa of heterotrophic flagellates in Southampton Water, U.K. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **51**, 91-102.
- Britschgi, T.B. and Giovannoni, S.J.** (1991) Phylogenetic Analysis of a Natural Marine Bacterioplankton Population By Ribosomal-RNA Gene Cloning and Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1707-1713.
- Calbet, A., Landry, M.R. and Nunnery, S.** (2001) Bacteria flagellate interactions in the microbial food web of the oligotrophic subtropical North Pacific. *Aquat Microb Ecol*, **23**, 283-292.
- Campbell, L., Nolla, H.A. and Vaultot, D.** (1994) The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, **39**, 954-961.
- Campbell, L. and Vaultot, D.** (1993) Photosynthetic Picoplankton Community Structure in the Subtropical North Pacific-Ocean Near Hawaii (Station Aloha). *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, **40**, 2043-2060.
- Caron, D.A.** (1983) Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 491-498.
- Caron, D.A.** (1991) Evolving role of protozoa. In Reid, P.C. and Turley, C.M. (eds.), *Protozoa and their role in marine processes*, Vol. 25, pp. 387-415.
- Caron, D.A.** (1994) Inorganic Nutrients, Bacteria, and the Microbial Loop. *Microbial Ecology*, **28**, 295-298.
- Caron, D.A. and Goldman, J.C.** (1990) Protozoan nutrient regeneration. In Capriulo, G.M. (ed.) *Ecology of Marine Protozoa*. Oxford University Press, New York, pp. 283-306.
- Caron, D.A., Goldman, J.C., Andersen, O.K. and Dennett, M.R.** (1985) Nutrient Cycling in a Microflagellate Food-Chain. 2. Population-Dynamics and Carbon Cycling. *Marine Ecology-Progress Series*, **24**, 243-254.

- Caron, D.A., Goldman, J.C. and Dennett, M.R.** (1988) Experimental Demonstration of the Roles of Bacteria and Bacterivorous Protozoa in Plankton Nutrient Cycles. *Hydrobiologia*, **159**, 27-40.
- Caron, D.A., Lim, E.L., Dennett, M.R., Gast, R.J., Kosman, C. and DeLong, E.F.** (1999) Molecular phylogenetic analysis of the heterotrophic chrysophyte genus *Paraphysomonas* (Chrysophyceae), and the design of rRNA-targeted oligonucleotide probes for two species. *Journal of Phycology*, **35**, 824-837.
- Carrick, H.J., Fahnenstiel, G.L., Stoermer, E.F. and Wetzel, R.G.** (1991) The importance of zooplankton-protozoan trophic couplings in Lake Michigan. *Limnology and Oceanography*, **36**, 1335-1345.
- Cavalier-Smith, T.** (2000) Flagellate megaevolution. In Leadbeater, B.S.C. and Green, J.C. (eds.), *The Flagellates*. Taylor and Francis, London, pp. 361-389.
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A.K., Bhadra, R.K., Ghosh, A.N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S.M., Takeda, Y., Colwell, R.R. and Nair, G.B.** (2000) Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4022-4028.
- Claustre, H. and Marty, J.-C.** (1995) Specific phytoplankton biomasses and their relation to primary production in the tropical North Atlantic. *Deep-Sea Research I*, **42**, 1475-1493.
- Colwell, R.R. and Huq, A.** (1999) Global microbial ecology: biogeography and diversity of *Vibriosis* as a model. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 134S-137S.
- Colwell, R.R., Seidler, R.J., Kaper, J., Joseph, S.W., Garges, S., Lockman, H., Maneval, D., Bradford, H., Roberts, N., Remmers, E., Huq, I. and Huq, A.** (1981) Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype-O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 555-558.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L.** (2000a) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Applied & Environmental Microbiology*, **66**, 5116-5122.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L.** (2000b) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high- molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1692-1697.
- Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, Neveux, J., Machado, C. and Claustre, H.** (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature*, **370**, 255.

- del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., Vaqué, D., Mura, P., Agusti, S. and Duarte, C.M. (1996) Bacterioplankton community structure: Protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1169-1179.
- DeLong, E.F. (1992) Archaea in Coastal Marine Environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 5685-5689.
- DeLong, E.F., Franks, D.G. and Alldredge, A.L. (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, **38**, 924-934.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 1360-1363.
- Dennett, M.R., Mathot, S., Caron, D.A., Smith, W.O. and Lonsdale, D.J. (2001) Abundance and distribution of phototrophic and heterotrophic nano- and microplankton in the southern Ross Sea. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, **48**, 4019-4037.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C. and Massana, R. (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2932-2941.
- Dolan, J.R. and Gallegos, C.L. (1991) Trophic Coupling of Rotifers, Microflagellates, and Bacteria During Fall Months in the Rhode River Estuary. *Marine Ecology-Progress Series*, **77**, 147-156.
- Eilers, H., Pernthaler, J. and Amann, R. (2000b) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close-up on cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4634-4640.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F.O. and Amann, R. (2000a) Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3044-3051.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F.O., Gerdt, G. and Amann, R. (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 5134-5142.
- Elbrächter, E. (1990) Algenmassenvermehrung und toxische Effekte. In Lozan, J.L., Lenz, W., Rachor, E., Waterman, B. and von Westernhagen, H. (eds.), *Warnsignale aus der Nordsee*. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 111-118.

- Fenchel, T.** (1986) The Ecology of Heterotrophic Microflagellates. *Advances in Microbial Ecology*, **9**, 57-97.
- Fenchel, T.** (1988) Marine plankton food chains. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **19**, 19-38.
- Finlay, B.J., Clarke, K.J., Cowling, A.J., Hindle, R.M., Rogerson, A. and Berninger, U.G.** (1988) On the Abundance and Distribution of Protozoa and Their Food in a Productive Fresh-Water Pond. *European Journal of Protistology*, **23**, 205-217.
- Fogg, G.E.** (1995) Some Comments On Picoplankton and Its Importance in the Pelagic Ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, **9**, 33-39.
- Fried, J., Ludwig, W., Psenner, R. and Schleifer, K.H.** (2002) Improvement of ciliate identification and quantification: a new protocol for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in combination with silver stain techniques. *Systematic and Applied Microbiology*, **25**, 555-571.
- Fuchs, B.M., Zubkov, M.V., Sahm, K., Burkill, P.H. and Amann, R.** (2000) Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology*, **2**, 191-201.
- Fuhrman, J.A.** (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-548.
- Fuhrman, J.A., McCallum, K. and Davis, A.A.** (1992) Novel Major Archaeobacterial Group From Marine Plankton. *Nature*, **356**, 148-149.
- Fuhrman, J.A. and Noble, R.T.** (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1236-1242.
- Fuhrman, J.A., Sleeter, T.D., Carlson, C.A. and Proctor, L.M.** (1989) Dominance of Bacterial Biomass in the Sargasso Sea and Its Ecological Implications. *Marine Ecology-Progress Series*, **57**, 207-217.
- Giovannoni, S. and Rappé, M.** (2000) Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In Kirchman, D.L. (ed.) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, New York, pp. 47-84.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G.** (1990) Genetic Diversity in Sargasso Sea Bacterioplankton. *Nature*, **345**, 60-63.
- Giovannoni, S.J., Delong, E.F., Olsen, G.J. and Pace, N.R.** (1988) Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial-Cells. *Journal of Bacteriology*, **170**, 720-726.

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3721-3726.
- Goldman, J.C. and Dennett, M.R.** (1985) Susceptibility of Some Marine-Phytoplankton Species to Cell Breakage During Filtration and Post-Filtration Rinsing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **86**, 47-58.
- González, J.M., Sherr, E.B. and Sherr, B.F.** (1990) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 583-589.
- González, J.M., Sherr, E.B. and Sherr, B.F.** (1993) Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. *Marine Ecology Progress Series*, **102**, 257-267.
- Grossart, H.P., Riemann, L. and Azam, F.** (2001) Bacterial motility in the sea and its ecological implications. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 247-258.
- Gustafson, D.E., Stoecker, D.K., Johnson, M.D., Van Heukelem, W.F. and Sneider, K.** (2000) Cryptophyte algae are robbed of their organelles by the marine ciliate *Mesodinium rubrum*. *Nature*, **405**, 1049-1052.
- Hagmeier, E. and Bauerfeind, E.** (1990) Phytoplankton. In Lozan, J.L., Lenz, W., Rachor, E., Waterman, B. and von Westernhagen, H. (eds.), *Warnsignale aus der Nordsee*. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 102-110.
- Hahn, M.W. and Höfle, M.G.** (1999) Flagellate predation on a bacterial model community: Interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4863-4872.
- Hahn, M.W. and Höfle, M.G.** (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *Fems Microbiology Ecology*, **35**, 113-121.
- Havskum, H. and Skjoldborg Hansen, A.** (1997) Importance of pigmented and colourless nano-sized protists as grazers on nanoplankton in a phosphate depleted Norwegian fjord and in enclosures. *Aquatic Microbial Ecology*, **12**, 139-151.
- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B. and Colwell, R.R.** (2002) Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5488-5497.
- Heissenberger, A., Leppard, G.G. and Herndl, G.J.** (1996) Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4521-4528.

- Hensen, V.** (1887) Fünfter Bericht der Kommission zur wissenschaftlichen Untersuchung deutscher Meere, in Kiel für die Jahre 1882 bis 1886. *Ueber die Bestimmung des Plankton's oder des im Meere treibenden Materials an Pflanzen und Thieren; nebst Anhang*. Paul Parey, Berlin, pp. 1-108.
- Ingraham, J.L., Maaloe, O. and Neidhardt, F.C.** (1983) *Growth of the bacterial cell*. Schauer Associates Inc., Sunderland, Mass.
- Jerome, C.A., Montagnes, D.J.S. and Taylor, F.J.R.** (1993) The Effect of the Quantitative Protargol Stain and Lugol's and Bouin's Fixatives on Cell Size: A More Accurate Estimate of Ciliate Species Biomass. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**, 254-259.
- Jones, R.I.** (1994) Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Marine microbial food webs*, **8**, 87-96.
- Jürgens, K. and Güde, H.** (1994) The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series*, **112**, 169-188.
- Jürgens, K. and Matz, C.** (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 413-434.
- Jürgens, K., Pernthaler, P., Schalla, S. and Amann, R.** (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1241-1250.
- Karner, M.B., DeLong, E.F. and Karl, D.M.** (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507-510.
- Kirchman, D.L.** (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *Fems Microbiology Ecology*, **39**, 91-100.
- Kühn, S.F., Drebes, G. and Schnepf, E.** (1996) Five new species of the nanoflagellate *Pirsonia* in the German Bight, North Sea, feeding on planktic diatoms. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, **50**, 205-222.
- Lancelot, C., Billen, G., Sournia, A., Weisse, T., Colijn, J., Veldhuis, M.J.W., Davies, A. and Wassman, P.** (1987) *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the continental coastal zones of the North Sea. *Ambio*, **16**, 38-46.
- Li, W.K.W., Dickie, P.M., Irwin, B.D. and Wood, A.M.** (1992) Biomass of Bacteria, Cyanobacteria, Prochlorophytes and Photosynthetic Eukaryotes in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers*, **39**, 501-519.

- Lim, E.L.** (1996) Molecular identification of nanoplanktonic protists based on small subunit ribosomal RNA gene sequences for ecological studies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**, 101-106.
- Lim, E.L., Caron, D.A. and DeLong, E.F.** (1996) Development and field application of a quantitative method for examining natural assemblages of protists with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1416-1423.
- Lim, E.L., Dennett, M.R. and Caron, D.A.** (1999) The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnology and Oceanography*, **44**, 37-51.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. and Moreira, D.** (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, **409**.
- Maestrini, S.Y. and Graneli, E.** (1991) Environmental-Conditions and Ecophysiological Mechanisms Which Led to the 1988 Chrysochromulina-Polylepis Bloom - an Hypothesis. *Oceanologica Acta*, **14**, 397-413.
- Massana, R., DeLong, E.F. and Pedros-Alio, C.** (2000) A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1777-1787.
- Massana, R., Guillou, L., Díez, B. and Pedrós-Alió, C.** (2002) Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Applied Environmental Microbiology*, **68**, 4554-4558.
- Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M. and DeLong, E.F.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 50-56.
- Massana, R., Pedros-Alio, C., Casamayor, E.O. and Gasol, J.M.** (2001) Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnology and Oceanography*, **46**, 1181-1188.
- Moon-van der Staay, S.Y., de Wachter, R. and Vaultot, D.** (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**, 607-610.
- Moon-van der Staay, S.Y., van der Staay, G.W.M., Guillou, L., Vaultot, D., Claustre, H. and Medlin, L.K.** (2000) Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, **45**, 98-109.

- Mullins, T.D., Britschgi, T.B., Krest, R.L. and Giovannoni, S.J. (1995) Genetic Comparisons Reveal the Same Unknown Bacterial Lineages in Atlantic and Pacific Bacterioplankton Communities. *Limnology and Oceanography*, **40**, 148-158.
- Newell, S.Y. (1994) Ecomethodology For Organoosmotrophs - Prokaryotic Unicellular Versus Eukaryotic Mycelial. *Microbial Ecology*, **28**, 151-157.
- Not, F., Simon, N., Biegala, I.C. and Vaultot, D. (2002) Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**, 157-166.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. and Stahl, D.A. (1986) Microbial Ecology and Evolution - a Ribosomal-RNA Approach. *Annual Review of Microbiology*, **40**, 337-365.
- Pace, M.L., McManus, G.B. and Findlay, S.E.G. (1990) Planktonic Community Structure Determines the Fate of Bacterial Production in a Temperate Lake. *Limnology and Oceanography*, **35**, 795-808.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2002b) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3094-3101.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Eilers, H. and Amann, R. (2001a) Growth patterns of two marine isolates: Adaptations to substrate patchiness? *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4077-4083.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. and Amann, R. (2002a) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 661-667.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R. and Psenner, R. (1997) Contrasting Bacterial Strategies To Coexist with a Flagellate Predator in an Experimental Microbial Assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 596-601.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Nübel, U., Glöckner, F.-O., Psenner, R. and Amann, R. (2001b) Predator-specific enrichment of Actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Applied and environmental Microbiology*, **67**, 2145-2155.
- Pinhassi, J. and Hagström, A. (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 245-256.

- Pinhassi, J., Zweifel, U.L. and Hagström, A.** (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3359-3366.
- Pomeroy, L.R.** (1974) The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *BioScience*, **24**, 499-504.
- Poremba, K., Durselen, C.D. and Stoeck, T.** (1999b) Succession of bacterial abundance, activity and temperature adaptation during winter 1996 in parts of the German Wadden Sea and adjacent coastal waters. *Journal of Sea Research*, **42**, 1-10.
- Poremba, K., Tillmann, U. and Hesse, K.J.** (1999a) Distribution patterns of bacterioplankton and chlorophyll-a in the German Wadden Sea. *Helgoland Marine Research*, **53**, 28-35.
- Proctor, L.M. and Fuhrman, J.A.** (1990) Viral Mortality of Marine-Bacteria and Cyanobacteria. *Nature*, **343**, 60-62.
- Radach, G., Schönfeld, W. and Lenhart, H.** (1990) Nährstoffe in der Nordsee - Eutrophierung, Hypertrophierung und deren Auswirkungen. In Lozan, J.L., Lenz, W., Rachor, E., Waterman, B. and von Westernhagen, H. (eds.), *Warnsignale aus der Nordsee*. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 48-64.
- Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L. and Giovannoni, S.J.** (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, **418**, 630-633.
- Raven, J.A.** (1997) Phagotrophy in phototrophs. *Limnology and Oceanography*, **42**, 198-205.
- Rice, J., O'Connor, C.D., Sleigh, M.A., Burkill, P.H., Giles, I.G. and Zubkov, M.V.** (1997) Fluorescent oligonucleotide rDNA probes that specifically bind to a common nanoflagellate, *Paraphysomonas vestita*. *Microbiology*, **143**, 1717-1727.
- Sanders, R.W.** (1991) Mixotrophic Protists in Marine and Freshwater Ecosystems. *Journal of Protozoology*, **38**, 76-81.
- Sanders, R.W. and Porter, K.G.** (1988) Phagotrophic Phytoflagellates. *Advances In Microbial Ecology*, **10**, 167-192.
- Sanno, N., Teramoto, A., Matsuno, A., Takekoshi, S., Itoh, J. and Osamura, R.Y.** (1996) Expression of Pit-1 and estrogen receptor messenger RNA in prolactin-producing pituitary adenomas. *Modern Pathology*, **9**, 526-533.
- Schäfer, H., Servais, P. and Muyzer, G.** (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Archives of Microbiology*, **173**, 138-145.

- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. and Amann, R.** (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3268-3273.
- Sheldon, R.W., Nival, P. and Rassoulzadegan, F.** (1986) An experimental investigation of a flagellate-ciliate-copepod food chain with some observations relevant to the linear biomass hypothesis. *Limnology and Oceanography*, **31**, 184-188.
- Sherr, B.F. and Sherr, E.B.** (1984) Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In Klug, M.J. and Reddy, C.A. (eds.), *Current perspectives in Microbial Ecology*. ASM, Washington, pp. 412-423.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., Andrew, T.L., Fallon, R.D. and Newell, S.Y.** (1986) Trophic Interactions Between Heterotrophic Protozoa and Bacterioplankton in Estuarine Water Analyzed With Selective Metabolic-Inhibitors. *Marine Ecology-Progress Series*, **32**, 169-179.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. and McDaniel, J.** (1992) Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2381-2385.
- Sherr, E.B., Caron, D.A. and Sherr, B.F.** (1993b) Staining of Heterotrophic Protists for Visualization via Epifluorescence Microscopy. In Kemp, P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole (ed.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Boca Raton, pp. 213-227.
- Sherr, E.B. and Sherr, B.F.** (1994) Bacterivory and Herbivory - Key Roles of Phagotrophic Protists in Pelagic Food Webs. *Microbial Ecology*, **28**, 223-235.
- Sherr, E.B. and Sherr, B.F.** (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **81**, 293-308.
- Sieburth, J.M.** (1979) *Sea microbes*. Oxford University Press, New York.
- Sieburth, J.M., Smetacek, V. and Lenz, J.** (1978) Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, **23**, 1256-1263.
- Simek, K. and Chrzanowski, T.H.** (1992) Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3715-3720.

- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., Masin, M. and Amann, R.** (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2723-2733.
- Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J. and Psenner, R.** (1997) Morphological and Compositional Shifts in an Experimental Bacterial Community Influenced by Protists with Contrasting Feeding Modes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 587-595.
- Simon, M., Glöckner, F.O. and Amann, R.** (1999) Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 275-284.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. and Montgomery, L.** (1988) Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes For Studies of Ruminant Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1079-1084.
- Stoeck, T. and Epstein, S.** (2003) Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2657-2663.
- Stoecker, D.K., Michaels, A.E. and Davis, L.H.** (1987) Large Proportion of Marine Planktonic Ciliates Found to Contain Functional Chloroplasts. *Nature*, **326**, 790-792.
- Suzuki, M.T.** (1999) Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 261-272.
- Tansley, A.G. and Adamson, R.S.** (1925) Studies of the vegetation of the English chalk III: The chalk grasslands of Hampshire-Sussex border. *Journal of Ecology*, **13**, 177-223.
- Thingstad, T.F.** (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, **45**, 1320-1328.
- Thingstad, T.F. and Lignell, R.** (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 19-27.
- Torrella, F. and Morita, R.Y.** (1981) Microcultural Study of Bacterial Size Changes and Microcolony and Ultramicrocolony Formation By Heterotrophic Bacteria in Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 518-527.

- Tréguer, P., Nelson, D.M., van Bennekom, A.J., DeMaster, D.J., Leynaert, A. and Quéguiner, B.** (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*, **268**, 375-379.
- Urbach, E., Scanlan, D.J., Distel, D.L., Waterbury, J.B. and Chisholm, S.W.** (1998) Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution*, **46**, 188-201.
- van Bennekom, A.J., van Krijgsman, E., Hartingsveld, G.C., Veer, v.d. and van Voorst, H.F.J.** (1974) The seasonal cycle of reactive silicate and suspended diatoms in the Dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, **8**, 174-207.
- Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W.** (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, **14**, 136-143.
- Weinbauer, M.G. and Höfle, M.G.** (1998) Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 431-438.
- Wichels, A., Gerdt, G. and Schütt C.** (2002) Pseudoalteromonas spp. phages, a significant group of marine bacteriophages in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 233-239.
- Yndestad, M. and Underdahl, B.** (1985) Survey of PSP in mussels (*Mytilus edulis* L.) in Norway. In Anderson, D.M., White, A.W. and Baden, D.G. (eds.), *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam, pp. 457-460.
- Zweifel, U.L. and Hagstrom, A.** (1995) Total Counts of Marine-Bacteria Include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts). *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2180-2185.

Teil II

Publikationen

Publikationsliste und Erläuterungen

Diese Dissertation beruht zu einem großen Teil auf drei Publikationen. Die Beiträge der verschiedenen Autoren zu den Publikationen werden im Folgenden erläutert.

1. **Christine Beardsley, Karen Wiltshire, Rudolf Amann, and Jakob Pernthaler:**
Within-season variability of microbial plankton in the North Sea.
Manuscript to be submitted to *Limnology and Oceanography*.

Entwicklung des Konzeptes von C.B. und J.P., Durchführung der Experimente von C.B. und K.W., Erstellen des Manuskriptes von C.B. unter redaktioneller Mitarbeit von J.P., K.W. und R.A.

2. **Christine Beardsley, Jakob Pernthaler, Werner Wosniok, and Rudolf Amann (2003):** Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology* 69:2624-2630.

Entwicklung des Konzeptes von J.P. und C.B., Durchführung der Experimente von C.B., Erstellen des Manuskriptes von J.P. und C.B. unter redaktioneller Mitarbeit von R.A.

3. **Christine Beardsley, Jakob Pernthaler, Katrin Knittel, and Rudolf Amann:**
Detection of marine nanoplankton by fluorescence *in situ* hybridization and tyramide signal amplification. Manuscript to be submitted to *Aquatic Microbial Ecology*.

Entwicklung des Konzeptes von C.B., K.K. und J.P., Durchführung der Experimente von C.B., Erstellen des Manuskriptes von C.B. unter redaktioneller Mitarbeit von J.P. und R.A.

1.

**Within-season variability of microbial plankton
in the North Sea**

Christine Beardsley¹, Karen Wiltshire², Rudolf Amann¹,
and Jakob Pernthaler¹

¹Max Planck Institute for marine Microbiology, Bremen, Germany

²Biologische Anstalt Helgoland, Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und
Meeresforschung, Helgoland, Germany

Manuscript to be submitted to *Limnology and Oceanography*

Abstract

This study addressed the within-season variability of coastal North Sea pico-, nano-, and mesoplankton communities with high temporal resolution during different seasons and years. We explored to which extent fine scale temporal changes in bacterial abundance and community composition were related to changes of abiotic and other biological parameters. During all three sampling periods pronounced short-term variability of temperature, salinity, nutrient concentrations, and abundances of photo- and heterotrophic protists was observed. The stability of the studied microbial populations differed both between seasons and successive years. The bacterial abundance was approximately 2-fold higher in August 2002 than in August 2000, but concurrently the relative contributions of *Bacteroidetes*, γ -proteobacteria, and *Roseobacter* spp. were significantly lower. In the June 2001 sampling period the fraction of cells that could be detected by fluorescence *in situ* hybridization and tyramide signal amplification (FISH-TSA) with any of the used probes transiently decreased to approximately half the values than before. However, the reason for this sudden decline of viable bacterial cells remained unknown. Furthermore, during all sampling periods we detected remarkable short-term changes in relative abundances within the γ -proteobacteria, specifically of bacteria related to the SAR 86-clade. In contrast, members of the genus *Roseobacter* formed more stable populations with only small daily variations in relative abundance. Short-term variability thus appears to be a significant phenomenon in coastal North Sea surface waters, which has been largely neglected by traditional sampling schemes.

Introduction

The abundance and distribution of bacteria in both, spatial and temporal dimensions and the relative contribution of different bacterial taxa to the total community are important aspects for defining their role in marine environments (Giovannoni and Rappé, 2000). Many studies address the spatial variability of marine bacterioplankton communities, e.g., the changes of the prokaryotic community composition are analysed along transects (Poremba *et al.*, 1999a; Cottrell and Kirchman, 2000a; Pernthaler *et al.*, 2002a), salinity gradients (Benlloch *et al.*, 2002; Bouvier and del Giorgio, 2002) or depth profiles (Karner *et al.*, 2001). Such spatial heterogeneity (patchiness) of bacterial abundance and species

richness has been recognised even at the micro-scale level (Mitchell and Fuhrman, 1989; Duarte and Vaque, 1992; Long and Azam, 2001).

Most investigations on the temporal variability focus on the changes of the bacterial community composition (BCC) between different seasons. In such seasonal or annual studies samples are commonly taken weekly, biweekly, or monthly (Pinhassi and Hagström, 2000; Eilers *et al.*, 2001; Heidelberg *et al.*, 2002). However, it is unknown to what extent these samples are representative for a given time interval. The significance of changes between weekly or monthly taken samples could be better interpreted if temporally small-scale changes within the same water mass were known.

The stability of the microbial community, especially in shallow coastal regions, might be influenced by potentially rapid changes of physico-chemical parameters in the environment. In the German Bight of the North Sea possible causes of such variability are wind, precipitation, hydrology, sediment resuspension, river discharge, and influx of water of different salinity from the English Channel or the Baltic Sea. Moreover, bacteria are also closely interrelated with other components of the marine microbial food web, e.g., with changes in the abundance and distribution of protists. While heterotrophic nanoflagellates are the main consumers of bacterial biomass (Fenchel, 1982d; Sherr and Sherr, 1984), the role of diatoms as well as of pigmented flagellates and alveolates might be of two kinds, i.e. they either compete for the same nutrients or are able to enhance bacterial growth by the release of dissolved organic matter (DOM) (Azam *et al.*, 1983).

In connection with the potentially fast growth rates of bacteria as an indication of possible response time, one could expect an impact on the stability of bacterial abundance and community composition. In order to understand why particular bacterial groups dominate marine picoplankton communities at certain times and locations, it could be important to know if all bacteria are equally affected by variations of environmental conditions, or if some populations are more stable than others.

The main goal of our study was to examine the within-seasonal changes of the bacterial abundances and community composition in the North Sea on the basis of high frequency sampling. For the interpretation of our results we carefully considered abiotic parameters such as general weather conditions, temperature, salinity, and nutrient concentrations. Additionally, biotic factors were determined and compared with the bacterial distribution patterns. We were interested in exploring whether and how the temporal changes in bacterial abundance and composition are related with the quantitative changes of photo- and heterotrophic protists. To find out if different bacterial groups

exhibit the same variability with respect to temporal small-scale changes of environmental conditions we focussed on phylogenetic lineages that have been shown to build substantial populations at least temporarily in coastal North Sea waters (Eilers *et al.*, 2001). This study was conducted over three sampling periods of four to five weeks, off Helgoland Island in the German Bight of the North Sea.

Materials and Methods

Sample collection. Surface water samples from approximately 1 m depth were collected at the station Helgoland Roads (54° 11,18' N, 7° 54' E) in the German Bight of the North Sea. Due to the low average water depth of 8 m the water body is generally well mixed. Sampling was performed on working days between 14th of August and 8th of September 2000, 29th of May and 28th of June 2001, and 12th of August and 6th of September 2002.

Abiotic parameters. The general weather conditions were recorded by the Deutscher Wetterdienst, weather station Helgoland (www.deutscher-wetterdienst.de). Water temperature was measured *in situ* immediately after sample collection with a calibrated thermometer. Salinity was determined using a salinometer (Guildline Autosol) at 18°C. Concentrations of the nutrients PO₄³⁻, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, SiO₄ were analysed photometrically according to the methods described in *Methods of Seawater Analyses* (Grasshoff *et al.*, 1999).

Bacterial abundance and community composition. Samples were fixed with freshly prepared buffered paraformaldehyde solution as described in Glöckner *et al.* (1996). Two parallel subsamples of 10 ml each were concentrated on polycarbonate membranes (GTTP, diameter: 47mm; pore size: 0.2 µm, Millipore), rinsed with double-distilled water, and stored at -20°C.

North Sea bacterioplankton community structure was analysed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with horseradish peroxidase (HRP) labelled oligonucleotide probes and tyramide signal amplification (TSA) as described previously (Pernthaler *et al.*, 2002b). In order to prevent cell loss, the filters were embedded in low gelling point agarose (concentration, 0.1% w/v, MetaPhor Bioproducts, Rockland, Maine) before they were permeabilised by digestion with a lysozyme solution (10 mg ml⁻¹ in 0.05 M EDTA and 0.1 M Tris-HCl [pH 7.5]; Fluka, Taufkirchen, Germany) for 30 min at 37°C. Cells on filter sections were hybridised with HRP-labelled oligonucleotide probes (Thermo Electron Corp., Ulm, Germany) targeted to most organisms of the domain Bacteria (EUB 338)

(Amann *et al.*, 1990b), γ -proteobacteria (GAM 42a) (Manz *et al.*, 1992), *Bacteroidetes* (CF 319a) (Manz *et al.*, 1992), marine α -proteobacteria of the subgroup *Roseobacter* spp. (ROS 537) (González and Moran, 1997), members of the *Cytophaga marinoflava*/*C. latercula* lineage (CYT 1448) (Eilers *et al.*, 2001), to bacteria affiliated with the SAR 86-clade (SAR 86-1249) (Eilers *et al.*, 2001) and the NOR 5-clade (NOR 5-730) (Eilers *et al.*, 2001). The EUB 338 antisense probe NON 338 (Wallner, 1995) served as a negative control. Additionally, selected samples from June 2001 were hybridised with oligonucleotide probes specific for bacteria including *Verrucomicrobia* (EUB 338-V) and *Planctomyces* (EUB 338-P) (Daims *et al.*, 1999), for Euryarchaea (EURY 806) (Pernthaler, unpubl.) and for Actinobacteria (HGC 69a) (Amann *et al.*, 1995) applying the protocol of Sekar *et al.* (2003). The probe EURY 806 was applied to all samples from August / September 2002, also. Detailed description of the hybridisation conditions are given in (Pernthaler *et al.*, 2002b). Hybridised filter sections were air dried and embedded on microscopic slides using a previously described mounting mix, which contains the general DNA-stain 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for counterstaining (Pernthaler *et al.*, 2002b).

Automated cell counts were performed as described by Pernthaler *et al.* (2003). Cells were visualised by epifluorescence microscopy at 63x magnification using a Zeiss Axioplan II Imaging microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with motorised components and a scanning stage for microscopic slides (for details see Pernthaler *et al.* 2003). Image pairs were acquired with a cooled slow-scan black-and-white charge-coupled device camera (ORCA, Hamamatsu, Herrsching, Germany) and analysed using the image analysis package KS400 (Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Germany). The relative abundance of hybridised cells was counted as percentages of all DAPI-stained cells in identical microscopic fields. The total abundance of all DAPI-stained cells was determined as the mean counts of five parallel filter sections for each sample. Between 1000 and >2000 DAPI-stained cells were enumerated per individual filter section. Samples that were not automatically countable were enumerated using manual image acquisition. Counts obtained with the negative control probe NON 338 were subtracted from all other hybridisation counts. For 20 samples triplicate counts were performed to establish the methodological precision of the counting procedure.

Heterotrophic nanoflagellate abundance. Samples were processed as described in Beardsley *et al.* (2003). Briefly, samples were fixed with alkaline Lugol's solution (final concentration, 0.1%) followed by particle-free formaldehyde (1.8%) and sodium

thiosulfate ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 4°C for 1-24 h. Aliquots of 20-50 ml were concentrated on black polycarbonate membranes (pore size, $0.8 \mu\text{m}$; Millipore) and double-stained with the fluorochromes DAPI and FITC ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $33 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively; modified from Sherr and Sherr (1993b)). Filters were embedded on microscopic slides in Cargille-Type A immersion oil (Cargille Laboratories, New Jersey). At least two parallel filters were produced from every sample. Eukaryotic cells were visualised by epifluorescence microscopy at 1000x magnification (Axiophot2, Carl Zeiss, Jena, Germany) using UV and blue excitation (filter sets Zeiss01 and Zeiss09, respectively; Carl Zeiss). Heterotrophic nanoflagellates (HNF, cell length of $2\text{-}20 \mu\text{m}$) were distinguished from pigmented (mixo- and autotrophic) eukaryotes by the red autofluorescence of the chloroplasts of the latter. 50 microscopic fields of view were counted per polycarbonate membrane.

Phytoplankton abundance. Surface water samples were fixed with Lugols solution and 50 ml of the sample settled out onto the coverslip of a Utermöhl counting chamber. The settled cells were then counted under an inverse microscope (Zeiss, Axiovert 135, Karl Zeiss, Germany).

Statistical analysis. Correlation analyses was performed for the analysis of the relationship between salinity and temperature in all three years (Spearman rank correlation). Differences of means in temperatures and of relative abundances of bacterial populations in 2000 and 2002, were determined by non-parametric tests (Mann-Whitney-U test).

Results

Abiotic parameters. The general weather conditions in August / September 2000 were characterised by mild air and water temperatures in connection with low precipitation. From 14th August to 8th September the water temperature at the Station "Helgoland Roads" varied between 16.4°C and 17.8°C (mean, 16.9°C) and slightly decreased towards the end of the sampling period (Fig. 1a). Salinity varied between 30.4 psu and 32.4 psu during the first ten days of our measurements and stabilised thereafter at approx. 32.3 psu (Fig. 1a). The salinity was significantly negatively correlated with water temperature ($R^2 = 0.77$, $r = 0.9$, $p < 0.001$). The nutrient concentrations were at their usual minimal summer values (Tab. 1).

The summer of 2002 was substantially warmer than the average since 1971. Helgoland water temperatures ranged from 17.6°C to 20.0°C between 12th August and 6th

September (Fig. 2a). The mean water temperature during that sampling period (18.9°C) was significantly higher than in August / September 2000 (2°C , U-test, $p < 0.001$). The average salinity during this period was 31.7 psu, but values in August were considerably

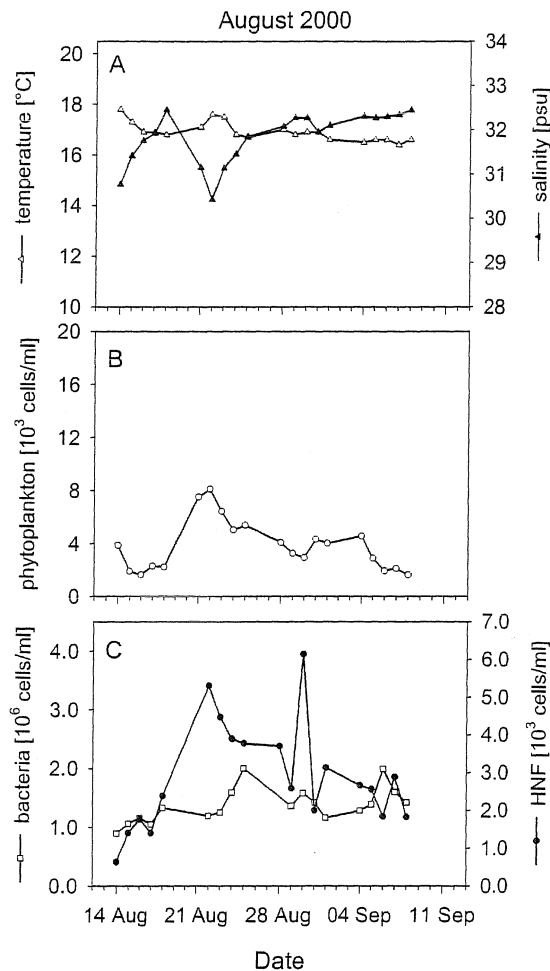


Fig. 1: Temporal dynamics of biotic and abiotic variables measured at marine station 'Helgoland Roads' during August 2000. A: temperature and salinity, B: abundance of phytoplankton, C: abundance of bacteria and heterotrophic nanoflagellates.

higher (ca. 32-33 psu) and decreased to 28.3 psu on September 2nd, whereas temperatures remained unchanged (Fig. 2a). Salinity and temperature were not statistically correlated ($r = 0.2$, $p > 0.05$). From mid to end of August 2002 the concentrations of all analysed nutrients were comparable to values of 2000, but showed substantial peaks at the beginning of September 2002 (Tab. 1).

In 2001 the sampling took place two months earlier during late spring / early summer. Compared with the long-term monthly average, May was unusually warm and dry. A sudden change of weather to storms with wind velocities of up to 60 km h^{-1} , in bursts of up to 90 km h^{-1} , occurred at the 3rd of June (pers. comm. W. Hansen, Deutscher Wetterdienst, Station Helgoland).

Most of June was significantly

cooler than the long-term monthly average, and the water temperature slowly increased from 11°C to 15.6°C (average: 13.1°C ; Fig. 3a). Although precipitation was significantly higher in June than in May, the salinity was stable at ca. 32.1 psu (average: Fig. 3a) and was not statistically correlated ($r = 0.3$, $p > 0.05$) to temperature. The storm event had no significant impact on the water temperature or salinity, but a 2-3-fold increase in the concentrations of silicate and phosphate was observed thereafter. Ammonium was highly variable (range: $2\text{-}9 \mu\text{mol l}^{-1}$) during the first half of June and declined thereafter. Nitrite

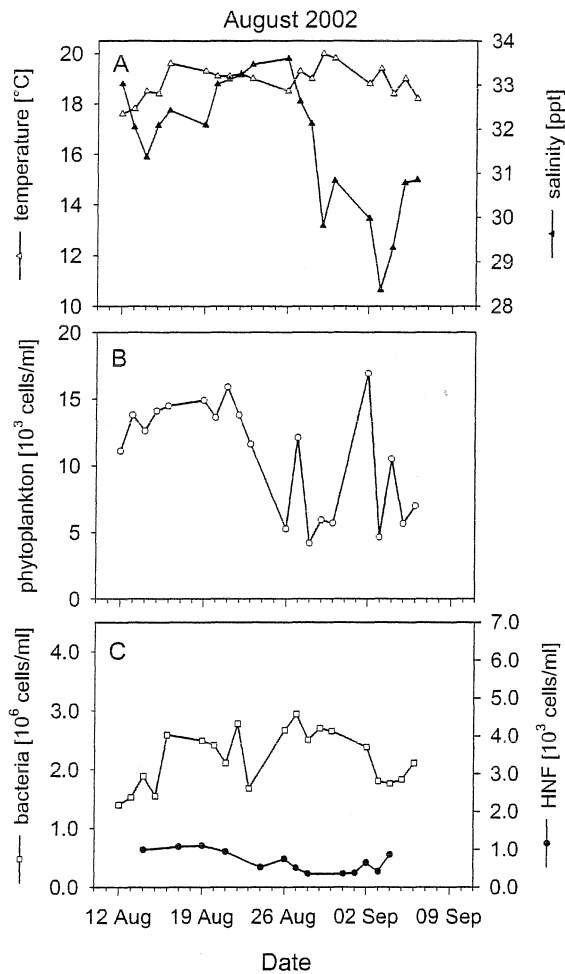


Fig. 2: Temporal dynamics of biotic and abiotic variables measured at marine station 'Helgoland Roads' during August 2002. A: temperature and salinity, B: abundance of phytoplankton, C: abundance of bacteria and heterotrophic nanoflagellates.

and nitrate concentrations showed typical values for June, i.e.: on average $0.5 \mu\text{mol l}^{-1}$ and $10.5 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively (Tab. 1).

Heterotrophic nanoflagellate and phytoplankton abundances. Within one week, in August / September 2000 sampling period heterotrophic nanoflagellates (HNF) increased eight fold in abundance from 6.3×10^2 cells ml^{-1} (Aug. 14th) to 5.3×10^3 cells ml^{-1} (Aug. 22nd, Fig. 1c). The phytoplankton community mainly consisted of diatoms, phytoflagellates, and phototrophic ciliates. The total abundance of the phytoplankton was always dominated by flagellated cells. After an initial decrease of total phytoplankton abundance from 3.9×10^3 cells ml^{-1} to 1.6×10^3 cells ml^{-1} (Fig. 1b), which was mainly caused by the decline of *Noctiluca scintillans*, the overall numbers increased to a maximum of 8.1×10^3 cells ml^{-1} simultaneously with the HNF maximum. Subsequently, HNF and phytoplankton gradually decreased to 1.8×10^3 cells ml^{-1} and 1.6×10^3 cells ml^{-1} , respectively, on Sept. 8th with one exception on the 30th of August Fig. 1b+c).

HNF abundances in mid August 2002 were slightly higher than in 2000 (9.9×10^2 cells ml^{-1}). The numbers slowly decreased to 3.5×10^2 cells ml^{-1} at the end of August 2002 and more than doubled thereafter to 8.6×10^2 cells ml^{-1} (Fig. 2c). In contrast, the total phytoplankton abundance was 2-3 times higher (1.1 - 1.6×10^3 cells ml^{-1}) in August 2002 than in 2000 (Fig. 2b). At an *in situ* temperature of 19°C in the 3rd week of August the water was intensively green caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. Within one week the total phytoplankton abundance, which consisted

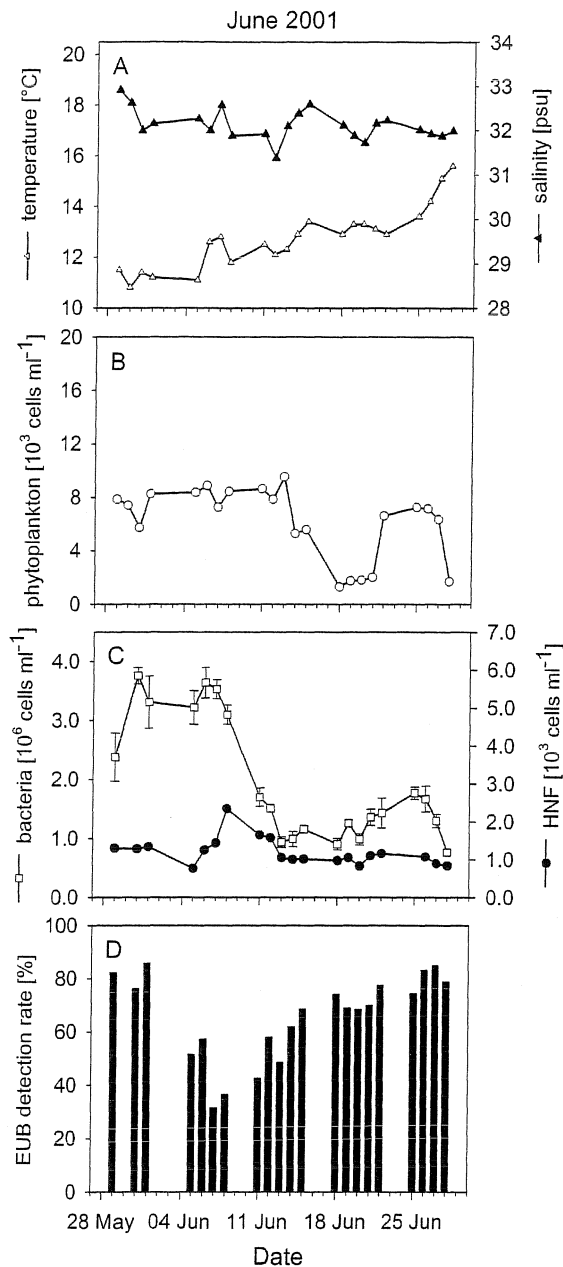


Fig. 3: Temporal dynamics of biotic and abiotic variables measured at marine station 'Helgoland Roads' during June 2001. A: temperature and salinity, B: abundance of phytoplankton, C: abundance of bacteria and heterotrophic nanoflagellates. D: detection of *Bacteria* after FISH-TSA with probe EUB 338.

mainly of phytoflagellates, decreased (5.3×10^3 cells ml⁻¹), but remained variable until the end of the observation period (Fig. 2b).

The abundance of HNF at the end of May 2001 was 1.3×10^3 cells ml⁻¹ (Fig. 3c). After the storm on the 3rd of June the abundance of HNF initially decreased but subsequently increased by a factor of 3 within 3 days. During the first half of June the total phytoplankton abundance varied between 5.7×10^3 cells ml⁻¹ and 9.5×10^3 cells ml⁻¹ (Fig. 3b). The phytoplankton abundance subsequently decreased to 1.3 – 2.3×10^3 cells ml⁻¹. Small colonies of *Phaeocystis* spp. and the phototrophic ciliate *Mesodinium rubrum* were highly abundant from mid to end of June, the latter colouring the water pink.

Bacterial abundances and population dynamics.

Bacterial abundances in August / September 2000 varied between 8.9×10^5 cells ml⁻¹ and 2.0×10^6 cells ml⁻¹ (mean 1.4×10^6 cells ml⁻¹; Fig. 1c). Changes of total cell numbers by factors of 2-3 were common within the four weeks of investigation. In August / September 2002 the average abundance was nearly twice as high (2.2×10^6 cells ml⁻¹), but similar fluctuation patterns were observed (Fig. 2c). In both years the FISH detection rate with the

general bacterial probe (EUB 338) followed the patterns of total abundances (Tab. 2). It ranged between 70-90% of total bacterial abundance (average, 79.5% in both years). The

evaluation of the methodological error from triplicate counts revealed standard deviations of $\pm 2\text{-}5 \times 10^4$ cells ml^{-1} (averages from bacterial populations of different relative abundances). In our samples this corresponded to $\pm 3\%$ of total bacterial cell counts.

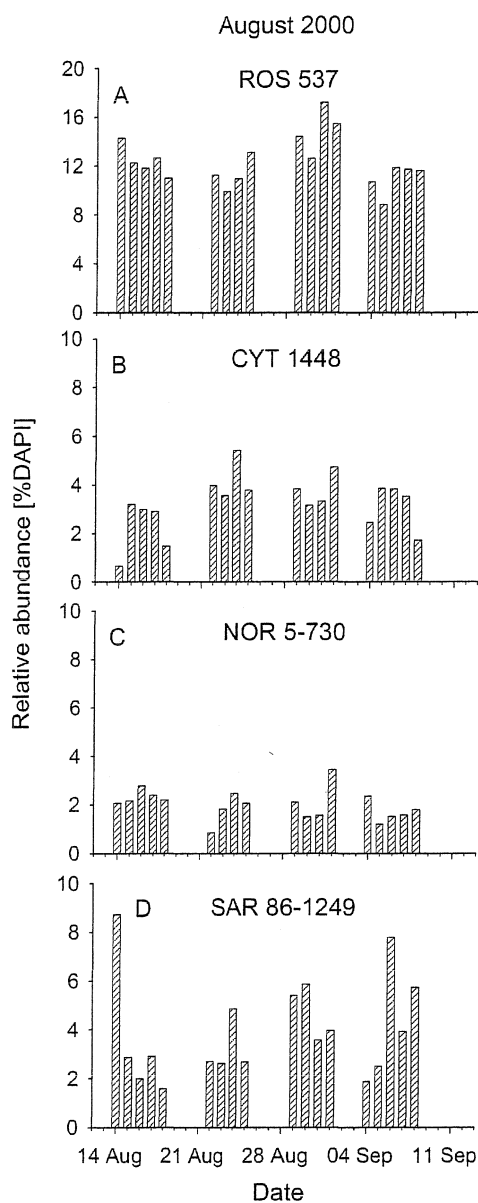


Fig. 4: Temporal dynamics of relative bacterial abundances as detected with probes ROS 537 (*Roseobacter* spp., A), CYT 1448 (*Cytophaga marinoflava/C. latercula* lineage, B), NOR 5-730 (NOR 5-group, C), and SAR 86-1249 (SAR 86-group, D) (August 2000).

In both years, *Bacteroidetes* (probe CF 319a) were the most abundant group of bacteria detected with our set of probes and constituted 15-40% of total counts (Tab. 2). This was equivalent to 20-50% of all bacteria detected by FISH with the probe EUB 338 and on average corresponded to $4.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ cells ml^{-1} in 2000 and $5.3 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$ cells ml^{-1} in 2002. *Bacteroidetes* tended to decrease in relative abundance with lower salinities in 2000 and 2002, but the correlation was not statistically significant. The *Cytophaga marinoflava/C. latercula* lineage (CYT 1448) formed only a small fraction of 2-3% of total picoplankton on average in both years (Figs. 4 and 5). This group contributed between 2-16% (2000) and 2-18% (2002) to the abundance of the *Bacteroidetes*. The γ -proteobacteria contributed on average 14% and 10% to the total picoplankton (corresponding to $2.1 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ cells ml^{-1} and $2.3 \times 10^5 \pm 7.2 \times 10^4$ cells ml^{-1}) in August / September 2000 and 2002 (Tab. 2). This was equivalent to on average 18% and 14% of FISH detection with probe EUB 338 in 2000 and 2002, respectively. However, the γ -proteobacteria formed temporarily maxima of up to 34% of total cell counts (equals 40% of FISH detection with probe EUB 338). These peaks were, in part, reflected by one important subgroup of marine γ -proteobacteria, the

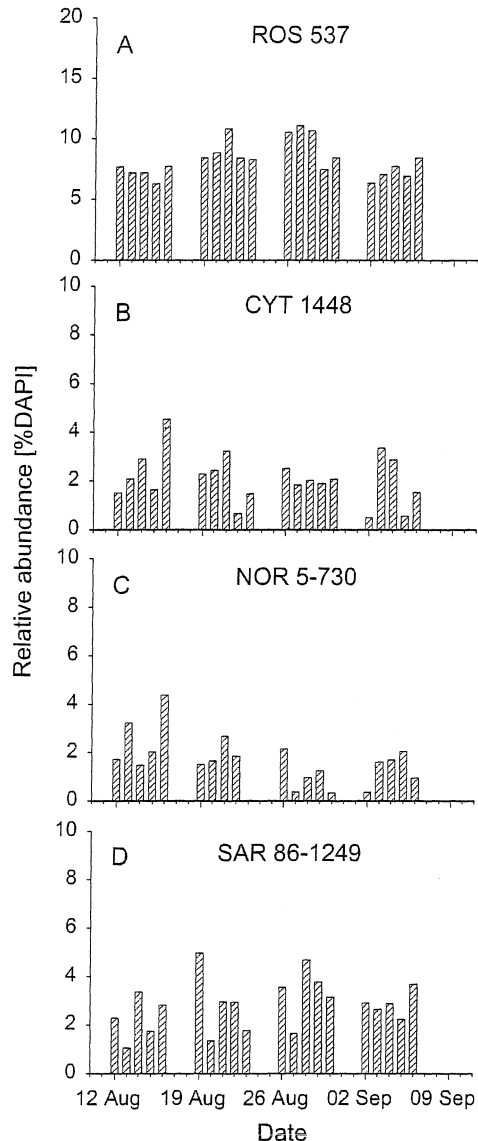


Fig. 5: Temporal dynamics of relative bacterial abundances as detected with probes ROS 537 (*Roseobacter* spp., A), CYT 1448 (*Cytophaga marinoflava*/*C. latercula* lineage, B), NOR 5-730 (NOR 5-group, C), and SAR 86-1249 (SAR 86-group, D) (August 2002).

determined by DAPI-counts remained high for approx. 4 days and steeply decreased thereafter to 25% of the previous abundance (9.4×10^5 cells ml^{-1}). The total cell numbers remained stable for nearly one week and subsequently doubled (15th of June). During the last week of June another sharp decrease of the bacterial abundance was observed (Fig. 3c). The FISH detection with the probe EUB 338 decreased strongly after the storm event from more than 80% to 32% of total cell counts (Fig. 3d). In parallel, numerous small DAPI-stained particles were observed on all filter preparations between the 5th and

SAR 86-clade (average, 4%; max, 9%; Figs. 4 and 5). Another marine γ -proteobacterial group, the NOR 5-clade, contributed ca. 2% to the total counts (Figs. 4 and 5). NOR5 and SAR86 together represented between 18-74% of all γ -proteobacteria. The *Roseobacter* lineage, a subgroup of marine α -proteobacteria, (probe ROS 537) contributed between 9-17% (average, 12%, corresponding to $1.7 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$ cells ml^{-1}) in 2000 and 6-11% (average, 8%, corresponding to $\pm 1.8 \times 10^5 \pm 6.4 \times 10^4$ cells ml^{-1}) to the total bacterial community (Figs. 4 and 5). The relative contributions of *Bacteroidetes*, γ -proteobacteria, and *Roseobacter* to the picoplankton community composition were significantly different between the two sampling periods in August /September 2000 and 2002 (U-tests, $p(\text{Bacter.}) = 0.003$, $p(\gamma\text{-proteob.}) = 0.001$ $p(\text{Ros.}) < 0.001$) although their absolute cell numbers were very similar in both years.

The bacterial abundance was approximately 2-fold higher at end of May / beginning of June 2001 than in August / September 2000 and 2002. After the storm on the 3rd of June the total cell numbers as

15th of June. Thereafter, the FISH detection recovered quickly and reached values of 69% and higher.

The drop of FISH detectability and of total abundances in June 2001 was mirrored in all analysed populations. While *Bacteroidetes* and *Roseobacter* recovered to typical relative abundances (average of last week of June: 16% and 32% of total cell counts,

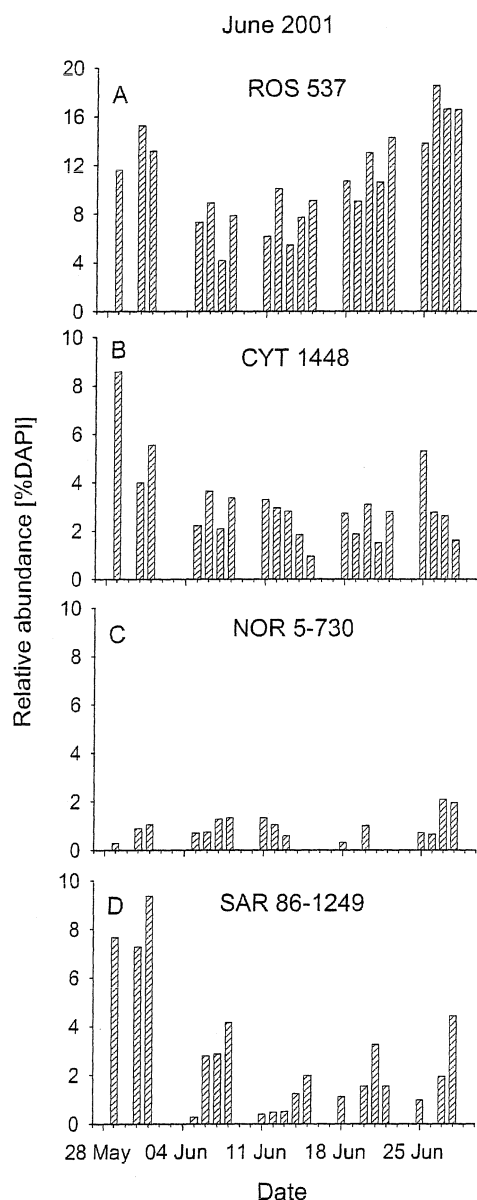


Fig. 6: Temporal dynamics of relative bacterial abundances as detected with probes ROS 537 (*Roseobacter* spp., A), CYT 1448 (*Cytophaga marinoflava*/*C. latercula* lineage, B), NOR 5-730 (NOR 5-group, C), and SAR 86-1249 (SAR 86-group, D) (June 2001).

respectively), γ -proteobacteria and members of the SAR 86-clade and the *Cytophaga marinoflava*/*C. latercula* lineage sustained approximately only half of their original relative abundances (last weeks average, 9%, 2% and 3%, respectively; Fig. 6 and Tab. 2). On average, the fraction of *Bacteroidetes*, *Roseobacter*, and γ -proteobacteria together constituted between 43-93% of all FISH-stained cells, which is comparable to the values for 2000 and 2002. Changes within the NOR 5-clade could not be evaluated, because their relative abundances were close to the methodological detection limit.

For most bacterial groups a doubling or reduction to the half of the size of the population within a season was observed. By the calculation and comparison of weekly means and variances of the relative abundances of individual bacterial lineages different patterns of variation could be detected. *Bacteroidetes* exhibited large changes between low and high variances (weekly means, 20-38%, $s^2 = \pm 0.2-45$, CV = 1-45%) over a times scale of four weeks, whereas *Roseobacter* tended to be more

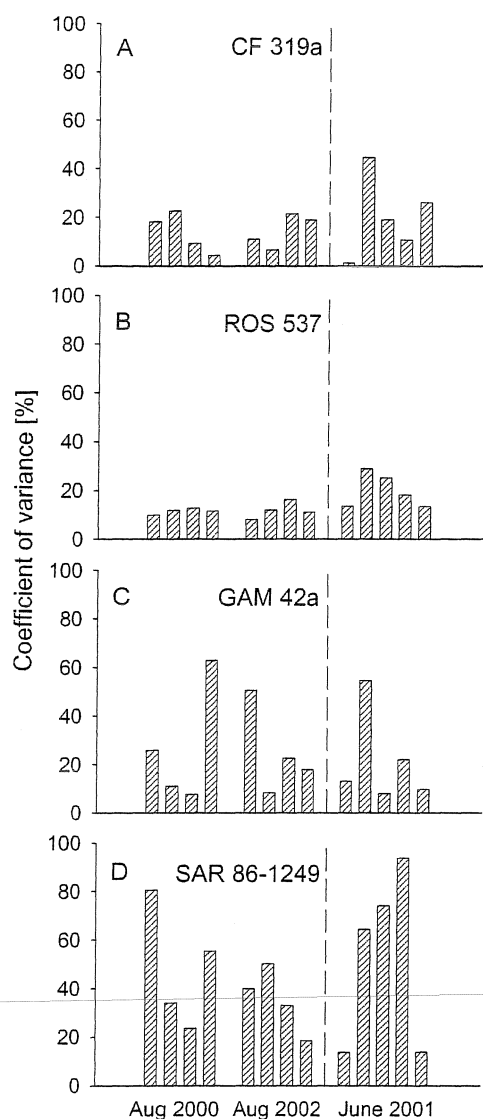


Fig. 7: Weekly coefficients of variation of the relative bacterial abundances as detected with probes CF 319a (*Bacteroidetes*, A), ROS 537 (*Roseobacter* spp., B), GAM 42a (γ -proteobacteria, C), and SAR 86-1249 (SAR 86-group, D). Vertical lines separate samplings in June 2001 from samplings in August 2000 and 2002.

stable with only moderate changes (weekly means, 7-15%, $s^2 = \pm 0.3-4.4$, CV = 8-29%; Fig. 7). In both groups changes seem to occur at comparatively slow rates with only small changes on consecutive days. On the other hand, γ -proteobacteria, including the subgroup SAR 86, exhibited pronounced daily fluctuations (weekly means, 7-20%, $s^2 = \pm 0.3-100$, CV = 8-63%, and weekly means, 1-15%, $s^2 = \pm 0.3-8.5$, CV = 14-94%, respectively; Fig. 7).

Discussion

We studied changes of the pico- and nanoplankton communities in the North Sea at fine temporal resolution during different seasons and years. The German Bight is a highly dynamic system with average water residence times of only 0.2 years (Schmidt, 1980). August typically represents the period of highest precipitation. This was clearly reflected in the significantly larger amplitude of salinity fluctuations during the two August sampling periods, as compared to the June sampling (Figs. 1a-3a). Nevertheless, the annual differences in physico-chemical and biological parameters were considerable also

within a single season. For example, the average temperature, bacterial abundances and phytoplankton concentrations were significantly higher during August 2002 (Figs. 1a, 2a), whereas the abundances of HNF were on average only one third as high as in August 2000 (Figs. 1c, 3c). In addition, higher abundances of predatory zooplankton are reported in August 2002 (Mursys archive, http://www.bsh.de/Meeresumwelt/Mursys/Mursys_001/archiv.html), which might explain the observed differences in HNF numbers between the

two years. At the end of August 2002 salinity dropped drastically to < 29 psu (Fig 2a). This coincided with maxima in nutrient concentrations (Tab. 1), and with unusually high precipitation that also caused severe floodings in Austria, Germany and the Czech Republic. The freshwater input during the second half of August 2002 was moreover mirrored by a high variability of nutrient concentrations (Tab. 1) and high fluctuations of phytoplankton abundances (Fig. 2 b).

Table 1: Nutrient dynamics of surface water samples from marine station 'Helgoland Roads'.

August 2000					August 2002					June 2001				
date	PO ₄ ³⁻	SiO ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	date	PO ₄ ³⁻	SiO ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	date	PO ₄ ³⁻	SiO ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻
	[μmol l ⁻¹]					[μmol l ⁻¹]					[μmol l ⁻¹]			
14 Aug	0.7	2.5	3.6	6.6 0.5	12 Aug	0.1	2.4	1.0	3.3 0.4	29 Mai	0.1	0.3	4.1	14.0 0.4
15 Aug	0.5	2.4	2.1	4.4 0.4	13 Aug	0.4	1.4	1.8	4.1 0.5	30 Mai	0.1	0.4	6.1	12.4 0.3
16 Aug	0.4	2.4	3.2	3.6 0.4	14 Aug	0.3	1.1	1.4	7.1 0.6	31 Mai	0.0	0.4	8.8	9.3 0.3
17 Aug	0.3	1.6	2.2	3.1 0.3	15 Aug	0.3	0.5	0.7	6.0 0.6	1 Jun	0.1	0.6	4.7	12.3 0.3
18 Aug	0.2	2.0	1.7	2.0 0.3	16 Aug	0.0	0.3	0.7	5.2 0.5	5 Jun	0.2	1.1	4.9	11.3 0.3
21 Aug	0.2	1.1	1.4	1.6 0.3	19 Aug	0.1	1.2	2.4	2.3 0.2	6 Jun	0.4	1.8	2.3	10.1 0.4
22 Aug	0.2	0.5	1.7	1.2 0.3	20 Aug	0.1	1.8	0.8	1.7 0.3	7 Jun	0.2	1.8	7.8	10.9 0.4
23 Aug	0.2	1.0	0.7	1.0 0.2	21 Aug	0.1	1.8	0.9	1.7 0.3	8 Jun	0.4	1.3	4.3	9.9 0.4
24 Aug	0.3	1.0	0.5	1.3 0.3	22 Aug	0.2	2.2	1.8	12.8 0.4	11 Jun	0.4	1.8	5.0	11.9 0.5
25 Aug	0.3	2.3	1.2	2.0 0.3	23 Aug	0.0	2.5	0.8	1.8 0.2	12 Jun	0.2	1.7	7.5	9.8 0.3
28 Aug	0.3	2.0	1.3	1.0 0.2	26 Aug	0.1	1.6	1.1	1.3 0.2	13 Jun	0.5	2.4	9.3	13.6 0.5
29 Aug	0.2	2.1	1.8	1.7 0.3	27 Aug	0.1	0.7	1.7	3.5 0.3	14 Jun	0.4	2.0	9.1	10.7 0.5
30 Aug	0.2	1.8	1.5	1.9 0.2	28 Aug	0.4	2.7	1.5	4.3 0.3	15 Jun	0.4	2.0	8.0	13.5 0.5
31 Aug	0.3	1.7	1.3	2.1 0.3	29 Aug	0.8	1.6	1.9	14.7 0.6	18 Jun	0.3	1.9	8.4	11.8 0.5
1 Sep	0.3	1.6	0.9	2.1 0.3	30 Aug	0.4	1.9	1.1	7.3 0.4	19 Jun	0.3	1.3	8.9	12.9 0.5
4 Sep	0.4	2.7	2.6	2.0 0.2	2 Sep	0.3	2.4	11.7	18.0 0.4	20 Jun	0.2	1.9	6.8	13.6 0.5
5 Sep	0.4	2.7	2.1	2.2 0.3	3 Sep	0.8	6.3	1.3	13.0 0.6	21 Jun	0.1	1.6	6.4	10.2 0.4
6 Sep	0.4	3.1	0.6	2.0 0.2	4 Sep	0.5	3.4	2.2	7.4 0.8	22 Jun	0.2	1.9	4.9	5.9 0.4
7 Sep	0.3	3.1	1.9	1.1 0.3	5 Sep	0.6	3.3	2.2	7.3 0.8	25 Jun	0.3	1.4	5.3	8.8 0.5
8 Sep	0.4	3.1	0.4	1.4 0.3	6 Sep	0.6	3.9	2.0	6.0 0.4	26 Jun	1.1	1.4	3.0	9.0 0.6
										27 Jun	0.1	1.2	2.8	7.9 0.6
										28 Jun	0.1	1.1	2.4	7.6 0.6

In view of these considerable differences between the two August sampling periods one would not expect to encounter similarities in the composition of the microbial communities. Indeed, the relative contributions of *Roseobacter* spp., γ -proteobacteria, and *Bacteroidetes* were significantly higher in August 2000 than in 2002. However, considering the differences in total bacterial counts between the two years, it is apparent that the absolute cell densities of bacteria from these groups were nevertheless comparable in the two years. This suggests that these two groups may form predictable cell populations during late summer in the German Bight. It moreover implies that the apparent differences in total bacterial numbers between the two studied years are likely due to differences in other bacterial populations.

The June 2001 sampling period was characterised by a continuous increase in temperature (Fig. 3a). During the first half of the study period HNF and bacterial abundances appeared to follow classic predator-prey dynamics (Fig. 3c). Interestingly,

both components of the microbial food web decreased in abundances already before a breakdown of the phytoplankton community was observed (Fig 3b). The decline of bacterial total abundances was preceded by a pronounced but transient decrease in the fraction of cells that could be detected by FISH with the general bacterial probe EUB 338 (Fig. 3a, d). To our knowledge, the CARD-FISH technique is largely independent of growth-related fluctuations in bacterial rRNA content (Pernthaler *et al.*, 2002b), and microbial cells can be detected by this method even in winter samples or after prolonged periods of starvation. We moreover confirmed that the abundances of marine Euryarchaeota, which are another potential component of coastal North Sea summer plankton (Pernthaler *et al.*, 2002a) were low throughout this season (data not shown). This indicates that a substantial fraction of bacterial cells during early June 2001 were virtually devoid of ribosomes, and consequently moribund or dead even before the bacterial cell numbers visibly decreased (Fig. 3c). Evidence from electron microscopy and specific fluorescence staining assays suggests that at certain periods the plankton might indeed harbour high percentages of dead bacterial cells (Zweifel and Hagström, 1995; Heissenberger *et al.*, 1996). Presently it is unknown what might have caused such a decline of viable bacteria in the German Bight. The decrease in bacterioplankton FISH detectability coincided with an unusual storm event that might have increased resuspension of sediment particles that might be mistaken for bacteria by the DAPI direct count method. However, such resuspension should then have been reflected in increased total cell numbers, which was not the case (Fig. 3c). Alternatively, the observed decline in bacterioplankton viability might be related to viral lysis (Fuhrman and Noble, 1995; Wommack and Colwell, 2000). This would be a likely explanation if the bacterial community had consisted of a single dominant group or phylotype during that period. It is, however, much harder to envisage that various specific viruses could have simultaneously attacked different phylogenetic groups as unrelated as, e.g., *Roseobacter* spp. and members of the SAR 86-clade (Fig. 6). The community contribution of these bacteria significantly declined in parallel with the drop of FISH detectability, and only *Roseobacter* could re-establish its relative importance in the microbial assemblage thereafter. This might in fact indicate a taxonomic shift within the *Roseobacter* spp. group that could not be resolved by the general probe ROS 537.

The general FISH probes for γ -proteobacteria and *Bacteroidetes*, GAM 42a and CF 319a, likely target a number of ecologically distinct populations. *Bacteroidetes* represented between 20 and 40% of total counts during all study periods, which

corresponds well with earlier findings from the German Bight and from other coastal habitats (Cottrell and Kirchman, 2000a; Eilers *et al.*, 2001). At present, only a small fraction of this important group of coastal heterotrophic picoplankton can be assigned to specific populations. One subgroup, the *Cytophaga marinoflava*/*C. latercula* lineage (Eilers *et al.*, 2001) contributed only 2-3% to total bacterial counts (Figs.4, 5, 6), which corresponded to approximately 10% of cells detected by CF 319a. In contrast, approximately one third of all γ -proteobacteria could be identified by only two specific probes for the SAR 86- and NOR 5-clades. At one sampling date (June 7, 2001), virtually all γ -proteobacteria were members of these two groups.

Table 2: Detection of *Bacteria* (EUB 338), *Bacteroidetes* (CF 319a), and γ -proteobacteria (GAM 42a) with FISH-TSA as percentage of DAPI-stained cells.

August 2000				August 2002				June 2001		
date	EUB 338	CF 319a	GAM 42a	date	EUB 338	CF 319a	GAM 42a	date	CF 319a	GAM 42a
14 Aug	80	40	16	12 Aug	71	27	7	29 Mai	38	19
15 Aug	70	33	10	13 Aug	70	21	21	31 Mai	38	18
16 Aug	81	28	18	14 Aug	69	27	16	1 Jun	38	23
17 Aug	76	37	11	15 Aug	70	24	7	5 Jun	18	15
18 Aug	75	26	12	16 Aug	71	24	10	6 Jun	16	7
22 Aug	79	25	11	19 Aug	85	34	9	7 Jun	7	4
23 Aug	84	22	14	20 Aug	83	29	10	8 Jun	9	8
24 Aug	85	33	14	21 Aug	83	30	9	11 Jun	10	7
25 Aug	82	36	13	22 Aug	87	30	10	12 Jun	13	8
29 Aug	89	34	16	23 Aug	80	30	10	13 Jun	14	8
30 Aug	72	29	16	26 Aug	83	22	8	14 Jun	12	6
31 Aug	80	32	14	27 Aug	80	24	9	15 Jun	17	7
1 Sep	84	36	14	28 Aug	85	23	11	18 Jun	25	7
4 Sep	78	28	13	29 Aug	81	17	10	19 Jun	26	10
5 Sep	83	26	10	30 Aug	75	14	14	20 Jun	33	8
6 Sep	82	27	34	2 Sep	87	16	12	21 Jun	29	5
7 Sep	76	29	10	3 Sep	80	27	8	22 Jun	29	7
8 Sep	75	29	13	4 Sep	87	26	11	25 Jun	31	10
				5 Sep	85	22	9	26 Jun	23	8
				6 Sep	87	25	11	27 Jun	39	8
								28 Jun	34	9

The high weekly variability in the community contribution of members of the SAR 86-clade is in striking contrast with the remarkably stable relative abundances of bacteria related to *Roseobacter* spp. (Fig 7). From bottle incubations of prefiltered North Sea water it is known that the abundances of members of the SAR 86-clade are largely unaffected by sudden changes in growth conditions (Eilers *et al.*, 2001). In contrast, some *Roseobacter* species can be readily enriched and isolated from coastal seawater (González and Moran, 1997). This could suggest that various *Roseobacter* strains might compensate environmental variability by rapid growth, resulting in the observed apparent stability of bacteria related to this group in German Bight waters. On the other hand, members of the SAR 86-clade appear to be a fundamentally more variable component of coastal North Sea

picoplankton. High horizontal fluctuations of these bacteria have also been reported from transects across the German Bight (Pernthaler *et al.*, 2002a).

The γ -proteobacteria on average contributed between 10 and 14% to total bacterial counts (Tab. 2). Within this group, occasional peaks of relative abundances of up to 34% were observed, as reflected in high weekly coefficients of variance (Fig. 7, Tab. 2). The high variability in the community contribution of cells from the SAR 86-clade (Fig. 7) can only explain a small part of this fluctuation. The coastal planktonic γ -proteobacteria are known to encompass a set of genera that are ecologically very different from members of the SAR 86-clade. These bacteria are able to rapidly respond to changing environmental conditions (Eilers *et al.*, 2000b). Such fast responding γ -proteobacteria are e.g., *Alteromonas* spp., *Colwellia* spp., *Pseudoalteromonas* spp., and *Vibrio* spp. Evidence from incubation experiments indicate that bacteria related to these groups are rapidly eliminated by selective HNF predation (Beardsley *et al.*, 2003), and usually they are present in the water column at very low abundances (Eilers *et al.*, 2001). Therefore they were not included in the present investigation. One might nevertheless speculate that the extremely high weekly variability of γ -proteobacteria observed sporadically during all three study periods (Fig. 7) could be related to short-lived blooms of such opportunistic bacteria.

In summary, short-term variability is an important phenomenon in the water column of the coastal North Sea that has been largely neglected by traditional sampling schemes. The stability of the studied bacterial populations appeared to significantly differ both between seasons and successive years. During both August sampling periods the contribution of *Roseobacter* spp. to the microbial assemblages was surprisingly constant irrespective of high short-term changes in physico-chemical or other biological parameters (Fig. 7), whereas members of the SAR 86-clade always exhibited pronounced fluctuations. At present, it cannot be distinguished to which extend this contrasting variability is related to horizontal discontinuities and transport or to temporal successions and microbial growth processes.

Acknowledgements

We thank Antje Wichels and Gunnar Gerdts for fruitful discussions on site and Linda Keller and Mandana Mirhaj for their help in the lab. The Biologische Anstalt Helgoland of the Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany, is

acknowledged for providing lab facilities. This work was supported by the European Union (EVK3-2001-00194 BASICS) and by the Max Planck Society.

References

- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A.** (1990b) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.** (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews*, **59**, 143-169.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F.** (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257-263.
- Beardsley, C., Pernthaler, J., Wosniok, W. and Amann, R.** (2003) Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2624-2630.
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E.O., Ovreas, L., Goddard, V., Daae, F.L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedros-Alio, C. and Rodriguez-Valera, F.** (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, **4**, 349-360.
- Bouvier, T.C. and del Giorgio, P.A.** (2002) Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, **47**, 453-470.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L.** (2000a) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5116-5122.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M.** (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.
- Duarte, C.M. and Vaque, D.** (1992) Scale dependence of bacterioplankton patchiness. *Marine Ecology-Progress Series*, **84**, 95-100.

- Eilers, H., Pernthaler, J. and Amann, R.** (2000b) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close-up on cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4634-4640.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glockner, F.O., Gerdt, G. and Amann, R.** (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 5134-5142.
- Fenchel, T.** (1982d) Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Marine Ecology-Progress Series*, **9**, 35-42.
- Fuhrman, J.A. and Noble, R.T.** (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1236-1242.
- Giovannoni, S. and Rappé, M.** (2000) Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In Kirchman, D.L. (ed.) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, New York, pp. 47-84.
- Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. and Schleifer, K.-H.** (1996) An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**, 403-406.
- González, J.M. and Moran, M.A.** (1997) Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4237-4242.
- Grasshoff, K., Kremling, K. and Ehrhard, M.** (1999) *Methods of Seawater Analyses*. Wiley-vch, Weinheim.
- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B. and Colwell, R.R.** (2002) Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5488-5497.
- Heissenberger, A., Leppard, G.G. and Herndl, G.J.** (1996) Relationships between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4521-4528.
- Karner, M.B., DeLong, E.F. and Karl, D.M.** (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507-510.
- Long, R.A. and Azam, F.** (2001) Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. *Aquatic Microbial Ecology*, **26**, 103-113.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H.** (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria - Problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.

- Mitchell, J.G. and Fuhrman, J.A.** (1989) Centimeter scale vertical heterogeneity in bacteria and chlorophyll-*a*. *Marine Ecology-Progress Series*, **54**, 141-148.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. and Amann, R.** (2002a) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 661-667.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R.** (2002b) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3094-3101.
- Pernthaler, J., Pernthaler, A. and Amann, R.** (2003) Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2631-2637.
- Pinhassi, J. and Hagström, A.** (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 245-256.
- Poremba, K., Tillmann, U. and Hesse, K.J.** (1999a) Distribution patterns of bacterioplankton and chlorophyll-*a* in the German Wadden Sea. *Helgoland Marine Research*, **53**, 28-35.
- Schmidt, D.** (1980) Comparison of trace heavy-metal levels from monitoring in the German Bight and the Southwestern Baltic Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **33**, 576-586.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T. and Amann, R.** (2003) An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2928-2935.
- Sherr, B.F. and Sherr, E.B.** (1984) Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In Klug, M.J. and Reddy, C.A. (eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. ASM, Washington, pp. 412-423.
- Sherr, E.B., Caron, D.A. and Sherr, B.F.** (1993b) Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. In Kemp, P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole (ed.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Boca Raton, pp. 213-227.
- Wallner, G., R. Erhart and R. Amann.** (1995) Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1859-1866.

Wommack, K.E. and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 69-114.

Zweifel, U.L. and Hagström, A. (1995) Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleotide-containing bacteria (ghosts). *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2180-2185.

2.

**Are readily culturable bacteria in coastal North
Sea waters suppressed by selective grazing
mortality ?**

Christine Beardsley¹, Jakob Pernthaler¹, Werner Wosniok²,
and Rudolf Amann¹

¹Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany

²Institute for Statistics, University of Bremen, Bremen, Germany

Applied and Environmental Microbiology 69:2624-2630 (2003)

Abstract

We studied the growth of six culturable bacterial lineages from coastal North Sea picoplankton in environmental samples under different incubation conditions. The grazing pressure of heterotrophic nanoflagellates (HNF) was reduced either by double prefiltration through 0.8 μm pore size filters or by tenfold dilutions with 0.2 μm prefiltered sea water. We hypothesized that those γ -proteobacterial genera which are rapidly enriched would also be most strongly affected by HNF regrowth. In the absence of HNF the mean protein content per bacterial cell increased in both treatments, as compared to environmental samples, whereas the opposite trend was found in incubations of unaltered sea water. Significant responses to the experimental manipulations were observed in populations of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio*. No treatment-specific effects could be detected for members of the *Roseobacter* group, the *Cytophaga latercula* - *C. marinoflava* lineage or the NOR 5 clade. Statistical analysis confirmed a transient increase in the proportions of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* at reduced HNF densities only, followed by an overproportional decline during the phase of HNF regrowth. Cells from these genera were significantly larger than the community average in the dilution treatments, and changes in their relative abundances were negatively correlated with HNF densities. Our findings suggest that bacteria affiliated with frequently isolated genera such as *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* might be rare in coastal North Sea picoplankton because their rapid growth response to changing environmental conditions is counter-balanced by higher grazing mortality.

Introduction

During the past years, our understanding of the ecological importance of culturable and uncultured lineages of marine picoplankton has been repeatedly challenged. For more than a decade, direct molecular cloning of microbial 16S rDNA sequences has revealed high diversity of uncultured bacteria and archaea (11, 15). These microbial lineages were regarded as more typical for the pelagic environment than members of the traditionally isolated genera. However, cloning of PCR amplicates has been shown to discriminate, e.g., against the Bacteroidetes (2), an important group of coastal marine bacteria (7) with many culturable representatives (34). At the same time, the ecological importance of members from culturable bacterial lineages such as the *Roseobacter* clade is increasingly

recognized (19, 52). Moreover, innovative cultivation approaches have yielded isolates from previously uncultured bacterial lineages that form substantial populations in the marine environment (7, 37). The most extreme positions have been voiced by Pinhassi et al. (34), who argued that the majority of common picoplankton bacteria are able to form colonies on agar plates and rich media, and Garcia-Martínez et al. (13), who claimed that >50% of picoplankton rRNA in deeper Mediterranean waters originates from *Alteromonas macleodii*-like bacteria.

Nevertheless, some genera of marine bacteria that are frequently isolated by classic ZoBell techniques are apparently rare in the picoplankton of coastal North Sea surface waters, as determined by direct counts after specific fluorescence in situ hybridization (FISH) (5, 6). Representatives of such readily culturable bacterial lineages with conspicuously low in situ population densities in the German Bight are *Alteromonas*, *Colwellia*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio* (6). Since members of these genera typically form larger cells than so-called "oligotrophic" marine isolates (1, 37), we hypothesized that these opportunistically growing γ -proteobacteria might be a preferred target of selective predation.

Free-living heterotrophic nanoflagellates (HNF) are ubiquitous bacterial grazers (38, 40). Although the phenotypic prey selectivity of aquatic HNF was first discovered in marine systems (20, 28), its potential effects on the genotypic composition of microbial communities have mainly been studied in freshwaters (22, 25, 33, 44, 45). So far, few investigations have presented evidence that taxon-specific grazing effects might occur in marine picoplankton. Suzuki (48) reported significant differences in the composition of PCR amplified microbial 16S rDNA from 24 h bottle incubations of filtered and unfiltered seawater, but the available method did not allow a precise phylogenetic affiliation of the rDNA in question. Other investigations have reported qualitative community changes during confinement (27, 39), but could not establish a quantitative relationship between the dynamics of individual bacterial populations, phenotypic traits of single cells, and HNF abundances.

We set up incubations of North Sea water in which HNF abundances were reduced by filtration or dilution, and followed the development of the microbial community in these treatments during the initial phase of HNF regrowth. Based on previous observations (5), we presumed that members of different frequently cultured γ -proteobacterial lineages would rapidly establish high densities following HNF removal, so that the effects of predation on these bacteria could be studied as HNF populations recovered without the

addition of tracer cells from cultures. The dynamics of control groups were also monitored, i.e., of other bacteria that are also culturable but nevertheless common in the picoplankton. In addition, the cell sizes of 3 rapidly enriched bacterial genera and of the total community were determined as well as the changes in mean per cell protein content of the bacterial assemblages during the incubations.

Materials and Methods

Study site and experimental design. The incubation experiments were conducted at the Biologische Anstalt Helgoland of the Alfred-Wegener Institute for Polar and Marine Research between August 29 and September 3, 2000. The island of Helgoland is located approximately 50 km offshore in the German Bight of the North Sea. Water was collected at the sampling site "Helgoland Roads" (54.09 N, 7.52 E) from approximately 1 m depth in a pre-rinsed 50 l polyethylene container. It was stored at 4°C until further processing (within 6 h after sampling). Three experimental treatments were set up in triplicates of 3 l volume in acid-washed, pre-rinsed 5 l glass bottles (Schott, Germany). Treatments were: (i) "Untreated", i.e. bottles were filled with 3000 ml of the unmanipulated sea water; (ii) "Dilution", i.e. 300 ml of seawater was tenfold diluted with 2700 ml of seawater that had been prefiltered through 0.2 µm pore size filters (Sartorius, Göttingen, Germany); (iii) "Prefiltration", i.e., seawater was filtered twice through 0.8 µm polycarbonate membranes (ATTP, diameter, 47 mm, Millipore, Eschborn, Germany). The choice of filter types followed the recommendations of Gasol et al. (14). All bottles were incubated in the dark at 16°C for five days. Samples were analyzed daily (day 0 to day 5) to determine total bacterial and HNF cell numbers, bacterial per cell protein content, and the population dynamics and cell sizes of selected bacterial groups. At the sampling date and during the first 3 days of the incubations, additional water samples were collected daily at Helgoland Roads and also analyzed for bacterial numbers and per cell protein content.

HNF abundances. Portions of 100-300 ml were fixed with alkaline Lugol's solution (final concentration, 0.1%) followed by particle-free formaldehyde (1.8%) and sodium thiosulfate (60 µg ml⁻¹) (modified from ref. (41)). Samples were fixed at 4°C for 1-24 h. Portions of 20-50 ml from these subsamples were concentrated on black polycarbonate membranes (ATTP, diameter, 25 mm, pore size, 0.8 µm; Millipore) and double-stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg ml⁻¹, staining time, 3 min) and fluorescein isothiocyanate (FITC, 33 µg ml⁻¹; staining time, 6 min) (modified from

(41)). Filters were embedded on microscopic slides in Cargille-Type A immersion oil (Cargille Laboratories, New Jersey). Two parallel filters were produced for every time point and bottle and stored at -20°C until evaluated. Eukaryotic cells were visualized by epifluorescence microscopy at 1000x magnification (Axiophot2, Carl Zeiss, Jena, Germany). HNF cells (cell length, 2-20 μm) could be unambiguously identified by a combined inspection at UV and blue excitation (filter sets Zeiss01 and Zeiss09, respectively; Carl Zeiss) to detect both their DAPI-stained nucleus and their FITC-stained body outline and -if visible- flagellum. Pigmented (mixo- and autotrophic) flagellates were distinguished from exclusively heterotrophic forms by the red autofluorescence of chloroplasts. At least 20 microscopic fields of view or 200 HNF cells were counted per polycarbonate membrane.

Bacterial abundances and per cell protein content. For bacterial analyses, portions of 40-100 ml from each time point and bottle and from environmental samples between days 0 to 3 were fixed with freshly prepared buffered paraformaldehyde solution as described before (17). For the determination of bacterial abundances and protein content, 4 ml of fixed subsamples were stored frozen until further analysis. Total bacterial cell numbers and the average per cell protein content were determined by flow cytometry (FACStar Plus flow cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg Germany) as described previously (5, 53). The carefully thawed samples were double-stained with the DNA specific stain Hoechst 33342 (HO) and the protein stain SYPRO red (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). At least 2000 HO-positive cells were counted per sample. Counts were converted into numbers of bacteria per ml sample from known concentrations of fluorescent beads added to each sample. These beads served as internal standard to normalize SYPRO fluorescence intensity for estimates of the mean cellular protein content. Samples from day 0 of the Prefiltered treatment for bacterial counts and protein content determination were lost by accident.

Bacterial population dynamics and cell sizes. Subsamples of 10 ml from the paraformaldehyde fixed samples (see above) were concentrated on polycarbonate membranes (GTTP, diameter, 47mm, pore size, 0.2 μm , Millipore), rinsed with double-distilled water, and stored at -20°C . Two parallel filters were produced for every time point and bottle, and replicate samples from two of the bottles were evaluated per treatment.

North Sea bacterioplankton community structure and population dynamics were analyzed by FISH as described previously (31). Cells on filter sections were hybridized

with 5' Cy3 monolabeled oligonucleotide probes (ThermoHybaid, Ulm, Germany). The probes were targeted to all bacteria (EUB 338, EUB 338-II P, EUB 338-III) (3), γ -proteobacteria (GAM 42a) (26), *Alteromonas* spp. (ALT 1413), *Pseudoalteromonas* spp.(PSA 184) (6), *Vibrio* spp. (GV 822), *Roseobacter* spp. (GRb 626) (16), members of the *Cytophaga latercula*-*C. marinoflava* lineage (CYT 1448) including two North Sea isolates, and to bacteria affiliated with the NOR 5 clade (NOR 5-730) (7). The EUB 338 antisense probe NON 338 served as negative control. Hybridized filter sections were counterstained with DAPI (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and embedded on microscopic slides in a 1:5 mixture of Vecta Shield (Vecta Laboratories, Burlingame, CA) and Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., London, U.K.) mounting fluids. Cell counts were performed by epifluorescence microscopy at 1000x magnification. The abundances of FISH-stained cells were determined at green excitation and counted as percentages of all DAPI-stained cells in identical microscopic fields. Between 400 and >2000 DAPI-stained cells were enumerated per sample.

In samples from day 2 of the Dilution treatments the cell sizes of bacteria that hybridized with probes EUB 338, ALT 1413, PSA 184 and GV 822 were determined. Image pairs of FISH and DAPI stained cells were captured in 10 microscopic fields with a cooled slow-scan CCD camera (ORCA, Hamamatsu, Herrsching, Germany). Since DAPI staining may underestimate cell sizes (35), all measurements were performed on FISH stained preparations. However, objects visible at green excitation without colocalized DAPI fluorescence were excluded from measurements. Cell edges were established by previously described strategies (36), and mean cell volumes were estimated from measured area and perimeter. Cell size data from the two replicate bottles were pooled. Altogether > 1000 EUB 338 stained cells were measured, and 150 to 200 cells hybridizing with each of the specific probes.

Statistical analyses. We tested for treatment-specific differences in the relative abundances of individual bacterial populations from the six studied lineages. Changes in community contribution of the different bacterial lineages over time were approximated by a mixed logistic regression model with fixed effects for time and treatment and random effects for replicates. This model was chosen as the least complex equation that could be fitted to the data, and because it is adequate for ratio data (range 0 to 1). As a precondition for the estimation of random effects (i.e. biological variability of replicates), the precision of FISH counts at different relative abundances was established from separate preparations (approximately 5%, 25%, and 90% of probe-positive cells, 5 replicates each). This

empirical factor was then included in a bootstrap analysis, i.e. the random generation of 2000 regression curves. 95% confidence intervals were subsequently calculated from the distribution of the Kolmogorov-Smirnov-distances between the newly generated and the original regression curves.

A two-step Likelihood-ratio test was then applied to determine if the observed data from the three treatments could be described by a single regression (common model), or if the data could be significantly better approximated by different regression curves for different treatments (separate model). First the common model was tested against the separated model in all six bacterial groups. The significance level was adjusted to $\alpha / 6$ (Bonferroni-correction, $p = 0.0083$) to maintain the experimentwise error rate. Subsequent pairwise tests between individual treatments were conducted only for those groups in which the common model (i.e., no treatment effects) could be significantly rejected. Due to the Closed Test Principle for less than 3 pairwise comparisons no further alpha adjustment was required (47).

In those bacterial groups that were significantly affected by the treatments, as detected by the above analysis, we then tested if the responses in community contributions of the individual bacterial groups were significantly related to HNF numbers (Spearman Rank Sum correlations). Changes were calculated as the differences between the relative abundances of the populations on subsequent days. This analysis was limited to the Dilution treatments, because HNF in the Prefiltration treatment formed substantial populations only during the last two days of the incubation period. All calculations were carried out with the SAS ISTAT package (v.8.2, SAS inc., Cary, NC).

Results

Total abundances of bacteria and HNF, bacterial protein content. Bacterial total cell numbers transiently increased during the incubations in all three variants and declined thereafter, whereas no change in abundances was detected in environmental samples (Fig. 1). Maximum abundances were found after 24, 48, and 96 h of enrichment in the Untreated, Dilution and Prefiltration treatments, respectively. In the Dilution treatment a bloom of HNF followed the bacterial bloom with a delay of one day. HNF were effectively reduced to <10 individuals ml^{-1} by double filtration, but re-established a substantial population in these treatments during the last two days of the experiment. In the untreated

variants high initial HNF cell numbers were maintained during the first 48 h, but decreased thereafter.

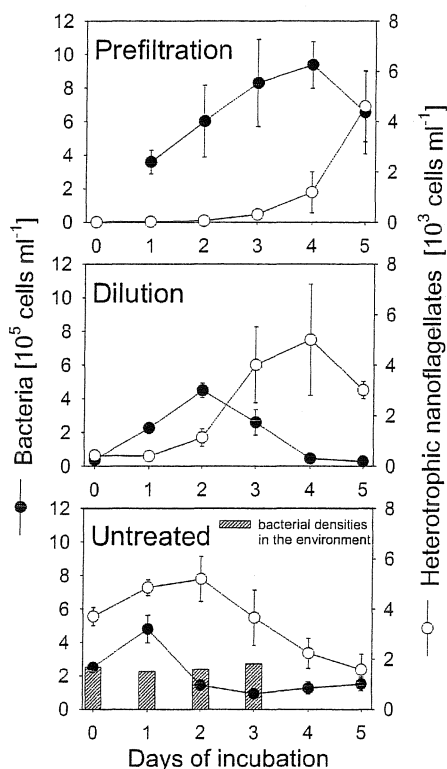


Figure 1: Cell numbers of bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the different treatments (mean \pm standard deviation). Hatched bars: daily samples of North Sea picoplankton.

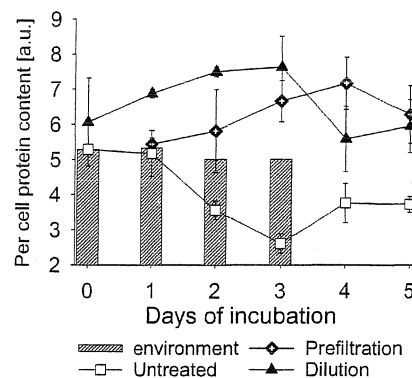


Figure 2: Changes in bacterial mean per cell protein content in the different treatments during the incubation period (mean \pm standard deviation). a.u.: arbitrary units. Hatched bars: daily samples of North Sea picoplankton.

Between days 1 and 3 the mean bacterial per cell protein content was significantly higher in the Dilution treatment than in the environmental samples, and dropped during HNF regrowth (Fig. 2). An increase in the average protein content was also observed in the Prefiltration treatment between days 2 to 4. In the Untreated variants, protein content per cell dropped by >50% during the first three days of incubation, as compared to the environmental values, and slightly increased thereafter.

Community contribution of bacterial groups. The majority of bacteria in the incubations were detectable by FISH with monolabeled probes (Table 1). On average, 79% of all DAPI-stained cells were detectable in the Dilution and Prefiltration treatments, and 74% in the Untreated variants, and detection rates changed little over the incubation period. The fraction of γ -proteobacteria decreased by almost 50% in the Untreated incubations, but almost doubled in the Dilution and Prefiltration treatments. Between days 1 and 5 of the incubation period, an average of 71% and 77% of all γ -proteobacteria were

affiliated with *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* or *Vibrio* in the Dilution and Prefiltration treatments, respectively.

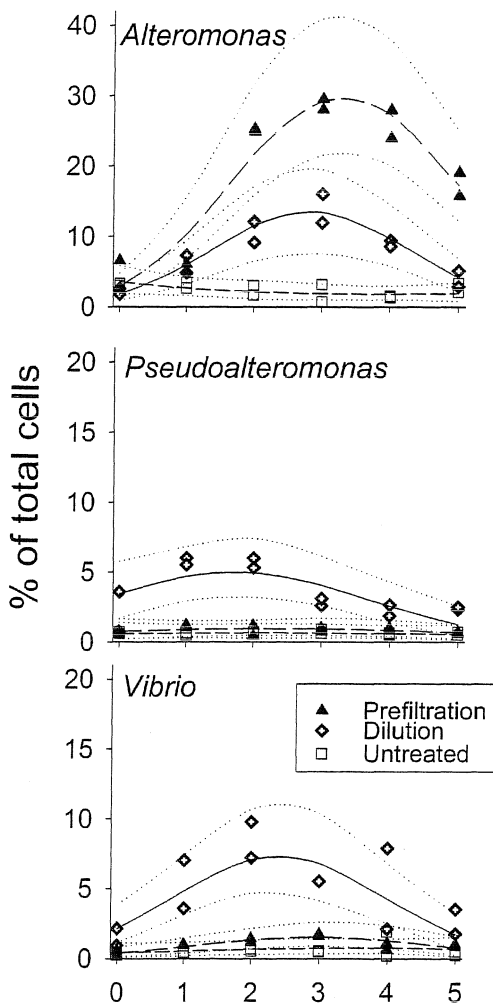


Figure 3: Relative contributions of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio* to the total microbial assemblages in the different treatments. The solid lines represent the population development as modeled by logistic regression and the dotted lines depict the upper and lower limits of the 95% confidence intervals.

Table 1: Relative abundances of cells detectable by FISH with probes EUB338 I-III (all bacteria) and GAM 42a (γ -proteobacteria) in the various treatments during the incubation period (% of all DAPI-stained cells).

Phylogenetic group	Day	% All DAPI-stained cells, replicates A and B					
		1:10 Dilution		0.8 μ m Prefiltration		Untreated	
		A	B	A	B	A	B
Bacteria	0	70	79	84	89	88	82
(probe EUB338 I-III)	1	90	72	83	85	81	81
	2	90	78	73	83	72	69
	3	90	81	73	78	69	58
	4	82	66	73	78	71	69
	5	79	65	75	74	71	78
γ -Proteobacteria	0	17	12	13	12	12	19
(probe GAM42a)	1	17	17	14	15	12	12
	2	30	28	29	37	8	10
	3	32	27	30	39	8	11
	4	21	21	40	43	9	9
	5	18	20	30	37	7	8

Table 2: Results of a two-step likelihood ratio test for significant treatment-specific differences in the studied bacterial groups^a.

Bacteria detected by probe	P^b			
	Step 1	Step 2		
		D=P=U	D=P	D=U
ALT 1413	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
PSA 184	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.2865
GV 822	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0350
CYT 1448	0.0990	-	-	-
NORS-730	0.9460	-	-	-
GRb 626	0.1285	-	-	-

^a P-values above the critical value indicate that the pooled data from several treatments can be equally well described by a single regression curve (i.e., there were no significant differences between treatments.). Significant values of p are depicted in bold. D: Dilution, P: Prefiltration, U: Untreated.

^b Bonferroni adjustment (critical p-value = 0.0083)

Treatment-specific differences in the temporal development of bacterial abundances were compared by Likelihood-ratio tests. Of the studied lineages, only bacteria affiliated with *Alteromonas* significantly responded to both experimental manipulations ($p < 0.001$, Fig. 3, Table 2). In the Prefiltration treatment this group temporarily constituted almost 30% of all bacteria, but declined significantly by the end of the experiment, to $< 20\%$. In the Dilution treatments, a significant transient rise in community contribution was also

observed for populations related to *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* (Fig. 3, Table 2). No treatment-specific response was detected for *Roseobacter*, bacteria related to the *C. latercula*-*C. marinoflava* lineage, or members of the NOR 5 clade (Fig. 4, Table 2). The community contribution of these groups either remained constant or gradually declined in all variants.

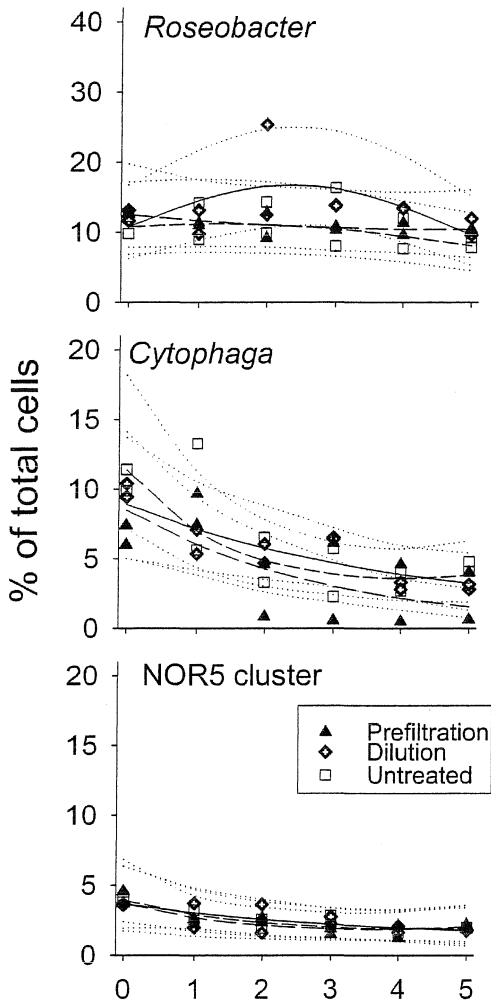


Figure 4: Relative contributions of bacteria related to *Roseobacter*, *Cytophaga latercula*-*C. marinoflava*, and to the NOR 5 clade to the total microbial assemblages in the different treatments.

In the Dilution treatments significant negative correlations were found between the abundances of HNF and the changes in community contribution of bacteria related to *Alteromonas* (Spearman rank correlation coefficient $r_s = -0.66$, $p < 0.05$), *Pseudoalteromonas* ($r_s = -0.63$, $p < 0.05$), and *Vibrio* ($r_s = -0.81$, $p < 0.005$) (Fig. 5). The mean cell volumes of bacteria related to *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio*

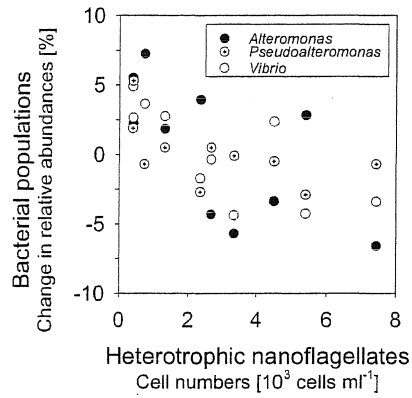


Figure 5: Relationship between the cell numbers of heterotrophic nanoflagellates and the changes in relative abundances of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio* in the Dilution treatments. Negative y-axis values indicate a decrease in community contribution.

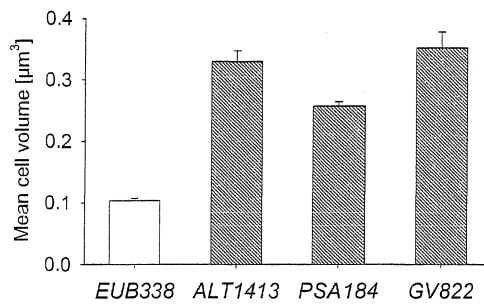


Figure 6: Mean cell volume (\pm standard error) of the total FISH-stained bacterial assemblage and of individual populations in the Dilution treatments at day 2. FISH probes were: EUB338 I-III, all bacteria; ALT 1413, *Alteromonas*; PSA 143, *Pseudoalteromonas*; GV 822, *Vibrio*.

were significantly larger in these treatments at day 2 than the mean cell volume of bacteria hybridizing with the general probe EUB 338 (Fig. 6).

Discussion

Incubation of sea water filtrates in bottles. All six microbial groups studied include culturable strains (6, 7, 19), but there is a conspicuous ecological difference between them. *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio* are usually rare (<1% of all cells) in coastal North Sea bacterioplankton (5, 6). In contrast, *Roseobacter*, bacteria related to the *C. latercula*-*C. marinoflava* lineage, and members of the recently cultured NOR 5 clade can all seasonally form substantial populations in the German Bight (7, 29). This dichotomy was also reflected in the responses of the different groups to our experimental manipulations (Figs. 3, 4). As predicted by our hypothesis, the rare culturable γ -proteobacteria were only enriched in treatments with reduced predator encounter rates, and not in the Untreated variants (Fig. 3).

However, we caution against oversimplification of our results. In 1925 Tansley & Adamson (49) described the invasion and dominance of rare plant species in chalk grassland after fencing out of rabbits, and thus discovered the potential importance of grazing on plant community diversity. Although our bottle incubations of filtered and diluted seawater share some elements with this classic experiment, they also differ in several important features. For one, the physicochemical contact with the environment is much more drastically cut in such manipulations than by a fence, which would probably be more adequately modeled by a dialysis membrane (4, 44). This separation in itself potentially causes a substantial change of the nutrient and substrate conditions, e.g. by sedimentation of particulate matter (46). Confinement of unmanipulated seawater may stimulate growth of aquatic microbial assemblages (39), as was also reflected in the initial increase of bacterial abundances in the Untreated variants (Fig. 1). More importantly, filtration is known to increase the overall activity of microbial communities (8, 42) and release dissolved organic matter, e.g. from breaking algal cells (18). A tenfold dilution with 0.2 μm filtrate thus probably caused a substrate input that stimulated the growth of the studied γ -proteobacterial groups in these treatments during the initial days of the incubations.

In fact, both *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* have been shown to require additional substrates for growth in 0.8 μm filtrates of North Sea water, whereas *Alteromonas* could be

readily enriched in unamended incubations (5). Eilers et al. postulated an ecological difference between these three groups of opportunistically growing bacteria because of their contrasting threshold substrate concentrations required for growth. This was confirmed by our observations. Even if no accidental release or transformation of substrates by filtration is assumed, a tenfold dilution with ambient sea water will necessarily result in reduced interspecific competition between bacterial populations and higher substrate availability per microbial cell. The growth of *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* in the Dilution but not in the Prefiltration treatments (Fig. 3) thus provides further evidence that these bacteria indeed form larger populations only at increased substrate concentrations.

Other lines of evidence also indicate that the population increase of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* after 24 h of bottle incubation must in parts be a reaction to a sudden change in substrate availability. In co-cultures *Pseudoalteromonas* outcompeted other marine bacteria at rapidly changing substrate conditions due to its shorter lag phase (30), but was disadvantaged when exposed to flatter substrate gradients. Strains of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* conserved high levels of ribosomes also during extended periods of non-growth (5, 30), which is most probably a physiological precondition for an opportunistic, "feast-and-famine" life strategy (9). In summary, the rapid growth response of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio* and other γ -proteobacteria in the Dilution or Prefiltration treatment cannot be unambiguously assigned to the experimental reduction of grazing mortality, but it is most probably also related to an increased substrate input.

Size-selective HNF predation. In contrast, there is much clearer evidence for top-down, i.e., predation control of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* populations during the second half of the incubation period. Our study might provide first experimental evidence from marine waters for a larger conceptual model about the impact of size-selective grazing on microbial community structure that has been continuously refined during the past years (21, 22, 24, 25, 32, 33, 44, 45). This concept is based on the observation that there are marked differences in the average cell sizes of various bacterial species at comparable growth rates. Many bacterivorous marine and freshwater HNF are strongly size-selective feeders (20, 43). Bacterial species within a particular cell size range (approximately 1-4 μm of cell length) are thus expected to suffer overproportional loss rates. For example, Hahn & Höfle (21, 22) present a qualitative model that predicts an increase of such "medium-size" bacteria only in the absence of grazing pressure.

Bottle incubations of North Sea water filtrates or dilutions typically induce both an increase in the community contribution of large γ -proteobacteria and increase of the mean community cell size (protein content) (5, 10) (cf. Table 1, Fig. 2). Bacteria affiliated with *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* constituted almost three quarters of all γ -proteobacteria in the Dilution and Prefiltration treatments. Members of these groups in the Dilution treatments were significantly larger than the community average at day 2 (Fig. 6), and fall well in the preferred cell size range for many HNF (24). The significantly overproportional decline of the three γ -proteobacterial populations (Fig. 3) in the Dilution or Prefiltration treatments between days 3 and 5 is, therefore, likely a consequence of size-selective grazing mortality. It is moreover clearly paralleled by a decrease in the mean per cell protein content (a proxy for cell size) of the bacterial community in the Dilution treatment during HNF regrowth (Figs. 1,2). A connection between the fate of the bacterial groups and the predator population in the Dilution treatment is also suggested by the significant negative correlations between changes in the community contributions of *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* and the abundances of HNF (Fig. 5). In these groups high HNF abundances can thus be related to losses that significantly exceed the overall bacterial mortality rate, i.e. declining relative abundances during a phase of declining total cell numbers (Figs 1,3). This indicates that selective mortality was acting upon cells from the three γ -proteobacterial genera in the Dilution treatment during the period of high HNF densities and declining total bacterial abundances (Fig. 1).

Our results apparently contradict the findings of Schäfer et al. (39), who reported an increase of *Alteromonas-macleodii* related 16S rDNA sequences in clone libraries after a grazing-induced decline of a bacterial bloom in a mesocosm of Mediterranean coastal waters. However, the bulk of *A.-macleodii*-related sequence types in that study were obtained either before the effects of grazing were visibly affecting bacterial abundances, or else after the collapse of the predator population. Moreover, Cottrell & Kirchman (2) caution against a misinterpretation of qualitative diversity information as a measure of population sizes. In view of our results, we must thus disagree with the conclusion of Schäfer et al. about the grazing-resistance of *Alteromonas*. That study nevertheless indicates that transient blooms of *Alteromonas*-like bacteria as a response of food web manipulations may also occur in other coastal areas.

The most likely alternative explanation we are aware of is the selective elimination of the studied bacterial groups by viral infection (12). However, there are presently no methods available to study specific host-pathogen interactions in mixed assemblages.

Moreover, aquatic viruses considered to be highly host-specific (50), and, e.g., many species of *Pseudoalteromonas* bacteriophages isolated from coastal North Sea waters were able to lyse only a small number of strains from this lineage (51). To account for a decline of three bacterial groups in the Dilution treatment (Fig. 3), we should therefore postulate the synchronized outbreak of at least three distinct viral populations. Such an assumption clearly violates the "Occam's Razor" principle, since the activity of one single size-selectively foraging predator species can explain the observed population dynamics equally well.

In the words of Tansley & Adamson (49), "The general conclusions are very much what might have been expected from the more or less vague knowledge we already possessed." Our results indicate that some HNF species that are present in North Sea waters and pass through filters with a nominal pore size of 0.8 μm are capable of efficiently suppressing planktonic blooms of *Alteromonas*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, and thus potentially also of e.g. pathogenic *Vibrio* species (23). This process might in part be responsible for the typically low population densities of those readily culturable microbial genera in coastal marine picoplankton.

Acknowledgements

We thank Gunnar Gerdts and Antje Wichels for their continuous support on Helgoland, Martha Schattenhofer for help in the lab, and Barbara MacGregor for critical reading. The Biologische Anstalt Helgoland of the Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Bremerhaven, is acknowledged for providing lab facilities. This work was supported by the European Union (EVK3-2001-00194 BASICS) and by the Max Planck Society.

References

1. **Button, D. K., B. R. Robertson, P. W. Lepp, and T. M. Schmidt.** 1998. A Small, Dilute-Cytoplasm, High-Affinity, Novel Bacterium Isolated By Extinction Culture and Having Kinetic Constants Compatible With Growth At Ambient Concentrations of Dissolved Nutrients in Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4467-4476.

2. **Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman.** 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5116-5122.
3. **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.
4. **Del Giorgio, P. A., J. M. Gasol, D. Vaque, P. Mura, S. Agusti, and C. M. Duarte.** 1996. Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnol. Oceanogr.* **41**:1169-1179.
5. **Eilers, H., J. Pernthaler, and R. Amann.** 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close look on cultivation-induced shifts. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4634-4640.
6. **Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner, and R. Amann.** 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3044-3051.
7. **Eilers, H., J. Pernthaler, J. Peplies, F. O. Glöckner, G. Gerdt, and R. Amann.** 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contribution to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5134-5142.
8. **Ferguson, R. L., E. N. Buckley, and A. V. Palumbo.** 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:49-55.
9. **Flärdh, K., P. S. Cohen, and S. Kjelleberg.** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* **174**:6780-6788.
10. **Fuchs, B. M., M. V. Zubkov, K. Sahm, P. H. Burkil, and R. Amann.** 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environ. Microbiol.* **2**:191-201.
11. **Fuhrman, J. A., K. McCallum, and A. A. Davis.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature.* **356**:148-149.
12. **Fuhrman, J. A., and R. T. Noble.** 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawaters. *Limnol. Oceanogr.* **40**:1236-1242.

13. **Garcia-Martinez, J., S. G. Acinas, R. Massana, and F. Rodriguez-Valera.** 2002. Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions. *Environ. Microbiol.* **4**:42-50.
14. **Gasol, J. M., and X. A. G. Morán.** 1999. Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* **16**:251-264.
15. **Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* **345**:60-63.
16. **Giuliano, L., E. De Domenico, M. G. Höfle, and M. M. Yakimov.** 1999. Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb. Ecol.* **37**:77-85.
17. **Glöckner, F. O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius, and K.-H. Schleifer.** 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:403-406.
18. **Goldman, J. C., and M. R. Dennett.** 1985. Susceptibility of Some Marine-Phytoplankton Species to Cell Breakage During Filtration and Post-Filtration Rinsing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* **86**:47-58.
19. **Gonzalez, J. M., and M. A. Moran.** 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4237-4242.
20. **Gonzalez, J. M., E. B. Sherr, and B. F. Sherr.** 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:583-589.
21. **Hahn, M. W., and M. G. Hofle.** 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:113-121.
22. **Hahn, M. W., and M. G. Höfle.** 1999. Flagellate predation on a bacterial model community: Interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4863-4872.
23. **Heidelberg, J. F., K. B. Heidelberg, and R. R. Colwell.** 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5488-5497.

24. **Jürgens, K., and C. Matz.** 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* **81**:413-434.
25. **Jürgens, K., J. Pernthaler, S. Schalla, and R. Amann.** 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1241-1250.
26. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
27. **Massana, R., C. Pedros-Alio, E. O. Casamayor, and J. M. Gasol.** 2001. Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnol. Oceanogr.* **46**:1181-1188.
28. **Monger, B. C., and M. R. Landry.** 1991. Prey-Size Dependency of Grazing By Free-Living Marine Flagellates. *Marine Ecology-Progress Series.* **74**:239-248.
29. **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.
30. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, H. Eilers, and R. Amann.** 2001. Growth patterns of two marine isolates: Adaptations to substrate patchiness? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4077-4083.
31. **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.
32. **Pernthaler, J., T. Posch, K. Simek, J. Vrba, R. Amann, and R. Psenner.** 1997. Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:596-601.
33. **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.

34. **Pinhassi, J., U. L. Zweifel, and A. Hagström.** 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3359-3366.
35. **Posch, T., M. Loferer-Krossbacher, G. Gao, A. Alfreider, J. Pernthaler, and R. Psenner.** 2001. Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**:55-63.
36. **Posch, T., J. Pernthaler, A. Alfreider, and R. Psenner.** 1997. Cell-specific respiratory activity of aquatic bacteria studied with the tetrazolium reduction method, cyto-clear slides and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:867-873.
37. **Rappe, M. S., S. A. Connon, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni.** 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature.* **418**:630-633.
38. **Sanders, R. W., D. A. Caron, and U. G. Berninger.** 1992. Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and freshwaters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86**:1-14.
39. **Schäfer, H., P. Servais, and G. Muyzer.** 2000. Successional changes in the genetic diversity of a marine assemblage during confinement. *Arch. Microbiol.* **173**:138-145.
40. **Sherr, B. F., E. B. Sherr, and C. Pedros Alio.** 1989. Simultaneous Measurement of Bacterioplankton Production and Protozoan Bacterivory in Estuarine Water. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **54**:209-219.
41. **Sherr, E. B., and B. F. Sherr.** 1993. Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labelled prey, p. 695-701. In P. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. Cole (ed.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Boca Raton.
42. **Sherr, E. B., B. F. Sherr, and C. T. Sigmon.** 1999. Activity of marine bacteria under incubated and in situ conditions. *Aquat. Microb. Ecol.* **20**:213-223.
43. **Simek, K., and T. H. Chrzanowski.** 1992. Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3715-3720.
44. **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.
45. **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.
46. **Simon, M., H. P. Grossart, B. Schweitzer, and H. Ploug.** 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:175-211.
47. **Sonnemann, E.** 1982. Allgemeine Lösungen multipler Testprobleme. EDV in Medizin und Biologie. **13**:120-128.
48. **Suzuki, M. T.** 1999. Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquat. Microb. Ecol.* **20**:261-272.
49. **Tansley, A. G., and R. S. Adamson.** 1925. Studies of the vegetation of the English chalk III: The chalk grasslands of Hampshire-Sussex border. *Journal of Ecology.* **13**:177-223.
50. **Thingstad, T. F.** 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* **45**:1320-1328.
51. **Wichels, A., S. S. Biel, H. R. Gelderblom, T. Brinkhoff, G. Muyzer, and C. Schütt.** 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4128-4133.
52. **Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, S. D. Archer, R. P. Kiene, R. Amann, and P. A. Burkill.** 2001. Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulfoniopropionate in an algal bloom in the North Sea. *Environ. Microbiol.* **3**:304-311.
53. **Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, H. Eilers, P. H. Burkill, and R. Amann.** 1999. Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3251-3257.

3.

**Detection of marine nanoplankton by fluorescence
in situ hybridization and tyramide signal
amplification**

Christine Beardsley, Jakob Pernthaler, Katrin Knittel, and Rudolf Amann

Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany

Manuscript to be submitted to *Aquatic microbial Ecology*

Abstract

We developed a protocol for the detection of nanoplankton by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in combination with tyramide signal amplification (TSA). The use of a UV-excitable fluorochrome allows a simultaneous identification and classification of the hybridized organisms according to their trophic modes. The protocol was first validated using pure cultures and then compared with a standard protocol for the enumeration of protists in a time series from North Sea waters. Cell counts with the new protocol were significantly higher for both, heterotrophic and phototrophic nanoplankton. This was mainly due to a superior detection of picoeukaryotes (< 3 μm).

Introduction

Flagellates play a pivotal role in marine and freshwater microbial food webs (11, 21). In environmental samples they are commonly detected by epifluorescence microscopy (5, 6). Due to the fixation hardly any morphological features of these fragile organisms remain visible and so only bulk parameters such as the total abundance of heterotrophic (HNAN) or phototrophic (mixo- and autotrophic; PNAN) nanoplankton can be determined. This prohibits more detailed analyses about important key players within the microbial food web. In some studies flagellates are identified by live counting and light microscopy (4, 24). However, only a limited amount of samples can be processed because the quantification has to be carried out immediately after sampling. Additionally, electron microscopy is often required for the discrimination of similar looking species (24).

For the cultivation-independent *in situ* identification and quantification of prokaryotes “phylogenetic staining”, i.e. *in situ* hybridization with fluorescently labeled sequence-specific 16S rDNA oligonucleotides (FISH) has been introduced more than a decade ago (3, 9). As an increasing number of eukaryotic 18S rDNA sequences from aquatic habitats have become available (10, 15, 17) this method becomes useful in protistan ecology, too (14).

In order to routinely apply FISH to protists in ecological studies some difficulties have to be overcome. For marine nano- and picoeukaryotes from purely phototrophic lineages the often weak intensity of the hybridization signals with fluorescently monolabeled probes can be significantly enhanced by the use of tyramide signal amplification (TSA) with horseradish peroxidase (HRP) labeled oligonucleotides (18).

However, in nanoplankton assemblages of mixed trophic modes the overstaining of the chlorophyll autofluorescence of auto- and mixotrophic organisms by commonly used fluorescent dyes prohibits to discriminate between hybridized and autofluorescent cells, or between hybridized heterotrophic and phototrophic organisms. On the other hand, the design of oligonucleotide probes specific for a functional subgroup, e.g. bacterivorous flagellates may be impossible. Flagellates are of polyphyletic origin and different trophic modes co-occur in closely related species (8), e.g. within the ecological important group of marine stramenopiles (5, 16).

To circumvent these problems we developed a protocol for FISH with HRP-labeled oligonucleotide probes in combination with TSA and a newly available fluorochrome that does not overlap with chlorophyll autofluorescence. We validated this new method in samples from the coastal North Sea by comparison with a standard technique for the enumeration of protists by epifluorescence microscopy (22).

Materials and Methods

Development of FISH protocol. Protistan cultures of different trophic modes were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP, U.K.) and the Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP, USA). Heterotrophic flagellates were *Paraphysomonas imperforata* (CCAP 935/13), *Developayella elegans* (CCAP 1917/1), and *Cafeteria roenbergensis* (CCAP 1900/1). Autotrophic organisms were *Dictyocha speculum* (CCMP 1381) and *Heterosigma akashiwa* (CCMP 452). A representative of a mixotrophic flagellate was *Ochromonas* sp. (CCMP 584). Defined mixtures of protists of different trophic modes were fixed with particle-free formaldehyde (final concentration 1.8% v/v) at 4°C for a minimum of 1h and filtered onto white polycarbonate membranes (ATTP, 0.8 µm pore size, 25 mm diameter; Millipore, Germany). The subsample volumes were varied to obtain convenient cell densities on the filter. Filters were cut in four sections and these were hybridized with 1 ng µl⁻¹ of the horseradish peroxidase labeled general eukaryotic probe EUK516 (2) at 35°C for 2 h. The probe NON338 (25) served as a negative control because it has at least one mismatch with known nanoeukaryotic ribosomal sequences (NCBI-BLAST, Dec. 2002, (1)). The hybridization buffer contained 0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl of pH 8.0, 20% v/v formamide, 20% v/v blocking reagent (Boehringer, Germany; 10% w/v in maleic acid buffer [100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5]), 0.1% v/v sodium dodecyl sulfate (SDS), and deionized particle-

free water (dH₂O). Filters were subsequently washed with washing buffer (dH₂O with 0.225 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, and 0.1% SDS) for 30 min at 37°C. Filters were briefly rinsed twice in dH₂O and equilibrated in TNT buffer (0.1 M Tris-HCl of pH 7.5, 0.15 M NaCl and 0.05% v/v Tween 20 [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA]) for 15 min at room temperature (RT). Moist filters were placed on a glass plate and covered with 50 µl of the tyramide solution (1x PBS, 0.0015% v/v H₂O₂, 0.1% v/v blocking reagent and 2% v/v Alexa₃₅₀ tyramide, obtained from Molecular Probes, Leiden, Netherlands) for 30 min at RT in the dark. Next, filters were briefly rinsed in TNT buffer at RT, transferred to fresh TNT buffer, and incubated for 15 min at 55°C in order to stop the enzyme activity. Filters were rinsed again twice in dH₂O, air dried in the dark, and embedded in a 1:5 mixture of the mounting fluids Vecta Shield (Vecta Laboratories, Burlingame, CA) and Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., London, U.K.) on microscopic slides. Cells were visualized by epifluorescence microscopy at 1000x magnification (Zeiss Axiophot 2 microscope, Carl Zeiss, Jena, Germany). The blue hybridization signals were detected at UV-excitation (Zeiss filter set 01, Carl Zeiss, Jena, Germany). The chlorophyll autofluorescence of phototrophic cells was detected as dark red signals at UV-excitation and even more prominent as bright orange signals at green excitation (Chroma HQ 41007 filter set, Chroma Tech. Corp., Brattleboro, VT).

Application of the protocol to environmental samples. North Sea surface water was collected at ten days during August / September 2002 near the island of Helgoland (German Bight). Samples were fixed with particle-free formaldehyde (1.8% v/v) at 4°C for a minimum of 1 h. Subsamples were taken for the determination of total nanoplankton abundances (2-20 µm cell size). Fixed samples of 8-10 ml were concentrated on Irgalan Black stained polycarbonate membranes (0.8 µm pore size, 25 mm diameter) and double-stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, staining time 3 min, 1 µg ml⁻¹) and fluorescein isothiocyanate (FITC, staining time 6 min, 33 µg ml⁻¹, modified from Sherr et al. (22)). Filters were embedded on microscopic slides in Vecta Shield / Citifluor (1:5) mounting fluid. Slides were stored at -20°C and evaluated within four weeks. Eukaryotic cells were visualized by epifluorescence microscopy at 1000x magnification (Zeiss Axiophot 2) and identified by their DAPI-stained nucleus (Zeiss filter set 01) and FITC-stained body outline and flagellum (latter not always present; Zeiss filter set 09). PNAN and HNAN was distinguished by the possession or lack of the chlorophyll autofluorescence. 50 microscopic fields per sample were evaluated. Counts were converted into numbers of heterotrophic or phototrophic cells per ml seawater. For the FISH

procedure fixed samples were processed as described above. Two-sided Wilcoxon-tests for paired samples were applied to test for differences between the two methods with respect to total counts of HNAN and PNAN and the relative proportions of PNAN (SPSS10.0, SPSS Incorp., Chicago, IL).

Results and Discussion

FISH of protists with TSA and Alexa₃₅₀. Heterotrophic and phototrophic (auto- and mixotrophic) protists from all cultures (see e.g. Fig. 1 a, b) and the environmental samples (Fig. 1 c-p) could be clearly distinguished by our protocol. Hybridization of protists with the HRP-labeled general eukaryotic probe EUK516 resulted in bright blue signals when excited by UV-light (Fig. 1, left panel). The control probe NON338 never showed a positive signal. HNAN exhibited blue fluorescence only (e.g. Fig. 1a, right), but no or only a very faint background signal at green excitation (e.g. Fig. 1b, right). PNAN appeared partly blue and red at UV-excitation (e.g. Fig. 1a, left) and exhibited a bright orange fluorescence of the cellular chlorophyll when excited by green light (Fig. 1, left panel, e.g. Fig. 1b, left). HNAN and PNAN between 2 to 12 μm cell size from North Sea samples are shown in Fig. 1c-p.

The trophic mode of eukaryotic protists is usually distinguished by the possession or lack of the red autofluorescence of chlorophyll *a* (6, 23). Here we demonstrated that the autofluorescence in phototrophic protists is not lost during the hybridization procedure (Fig. 1). A loss of the chlorophyll autofluorescence as reported by Lim et al. (13) and Massana et al. (16) is probably due to an ethanol treatment to dehydrate the cells. We found that this step is not required for FISH of planktonic protists. However, we observed a shift in the excitation optimum for the chlorophyll autofluorescence to longer wavelengths. Normally, chlorophyll emits orange-red light when excited by blue light. After hybridization we detected chlorophyll as a bright orange signal at green excitation, which might be a consequence of pigment degradation. This shift in excitation and emission wavelengths did not reduce the detectability of phototrophic organisms, as reflected by statistically indistinguishable relative proportions of PNAN in environmental samples when counted by FISH or DAPI/FITC staining (Tab. 1; average, 83% vs. 82% of total counts, respectively; $p > 0.05$).

The sulfoindocyanine Cy3 is the brightest fluorochrome commercially available and therefore most commonly used in combination with FISH of environmental flagellates

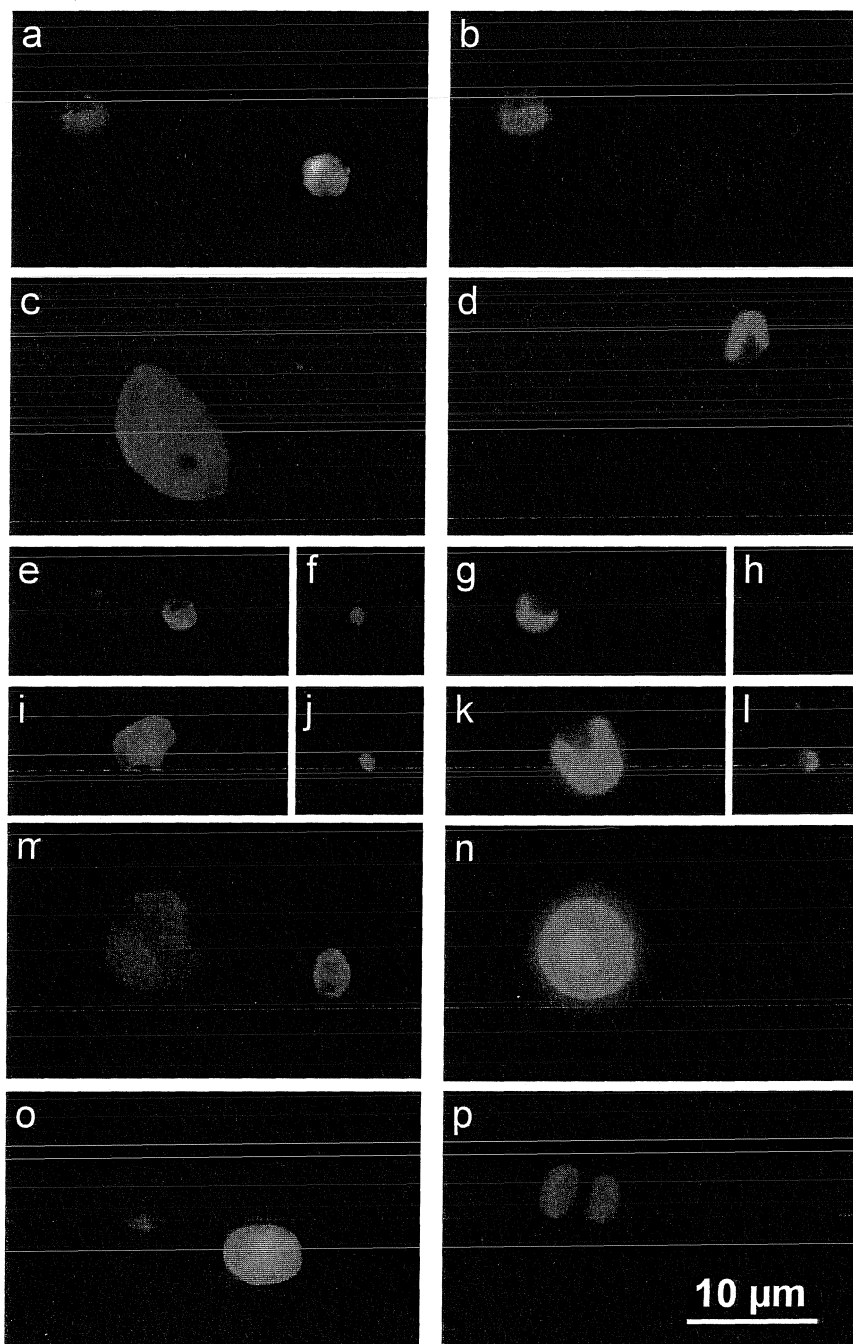


FIG. 1. Epifluorescence microscopy images of nanoplankton from culture and environmental samples. Scale bar for all images: 10 μm . a+b: Mixed culture of *Ochromonas* sp. (mixotrophic) and *Para-physomonas imperforata* (heterotrophic). c-p: Nanoplankton from North Sea samples. Left panel: Blue hybridization signal with EUK 516 at UV-excitation; sometimes red chl *a* autofluorescence visible. Right panel: Orange autofluorescence of chl *a* of phototrophic organisms at green excitation; no or only faint background signal from purely heterotrophic cells.

or bacteria with directly labeled oligonucleotide probes (16, 19). Unfortunately, the emission of Cy3 overlaps with the autofluorescence of chlorophyll *a* making a discrimination between hybridized and phototrophic or between hybridized heterotrophic and phototrophic cells impossible. The UV-excitable fluorochrome Alexa₃₅₀ is the dye with the longest possible distance in emission wavelength to the chl *a* autofluorescence within the visible light spectrum. Thus a simultaneous detection of the hybridization signals and a classification according to the trophic mode is possible. Since the Alexa₃₅₀-labeled tyramides are commercially available only in a rather expensive kit custom synthesis should be considered (12).

Comparison with standard method. During the sampling period the abundance of total nanoplankton from the North Sea ranged between $1.9 \cdot 10^3$ to $6.3 \cdot 10^3$ cells ml⁻¹ and $3.4 \cdot 10^3$ to $8.4 \cdot 10^3$ cells ml⁻¹ with the standard technique and new protocol, respectively

Tab. 1: Total nanoplankton (TNAN) abundances determined by DAPI/FITC and EUK 516 counts and relative proportion of phototrophic nanoplankton (PNAN) as percentage of TNAN.

Date	TNAN abundance [*10 ³ /ml]		Relative proportion of PNAN [% TNAN]	
	DAPI/FITC	EUK516	DAPI/FITC	EUK516
8/19	3.79	5.56	82	83
8/21	6.31	6.55	89	86
8/23	3.59	4.67	74	85
8/26	1.95	5.91	73	77
8/28	2.42	6.10	69	84
8/30	4.61	7.87	89	91
9/02	4.98	6.66	90	89
9/04	2.91	3.39	78	64
9/05	3.47	5.35	89	81
9/06	5.12	5.87	83	89

(Tab. 1). HNAN accounted for $3.8 \cdot 10^2$ to $9.2 \cdot 10^2$ cells ml⁻¹ with the standard technique and $6.3 \cdot 10^2$ to $1.3 \cdot 10^3$ with the new protocol (Fig. 2a). PNAN abundances were $1.4 \cdot 10^3$ to $5.6 \cdot 10^3$ cells ml⁻¹ and $2.2 \cdot 10^3$ to $7.1 \cdot 10^3$ cells ml⁻¹ with the standard and new protocol, respectively (Fig. 2b). No loss of cells due to the hybridization procedure was observed. On the contrary, in most samples the detection rate of nanoplankton with the new protocol was higher than the counts obtained with DAPI/FITC stained cells (Fig. 2). Statistical analysis showed that these differences were significant for both, HNAN ($p = 0.022$) and PNAN ($p = 0.013$). The higher abundances could mainly be attributed to small heterotrophic or phototrophic cells of approximately 2-3- μ m in diameter (Fig. 1e-l). Even cells smaller than 2 μ m could be identified by FISH and such cells accounted for $7.16 \cdot 10^2$ to $2.53 \cdot 10^3$ cells ml⁻¹. They were not included for the quantitative comparison because they could not be unambiguously identified by the DAPI/FITC method. Lim et al. (13) also reported higher total nanoplankton abundances with biotinylated EUK-probes due to the better detection of cells attached to particles and of small sizes. Picoeukaryotes, i.e., cells <3 μ m are an important fraction of the plankton community in the open ocean (10). Such small eukaryotes can be easily overlooked or

was higher than the counts obtained with

mistaken for bacteria when stained with general dyes as DAPI for DNA and FITC for proteins.

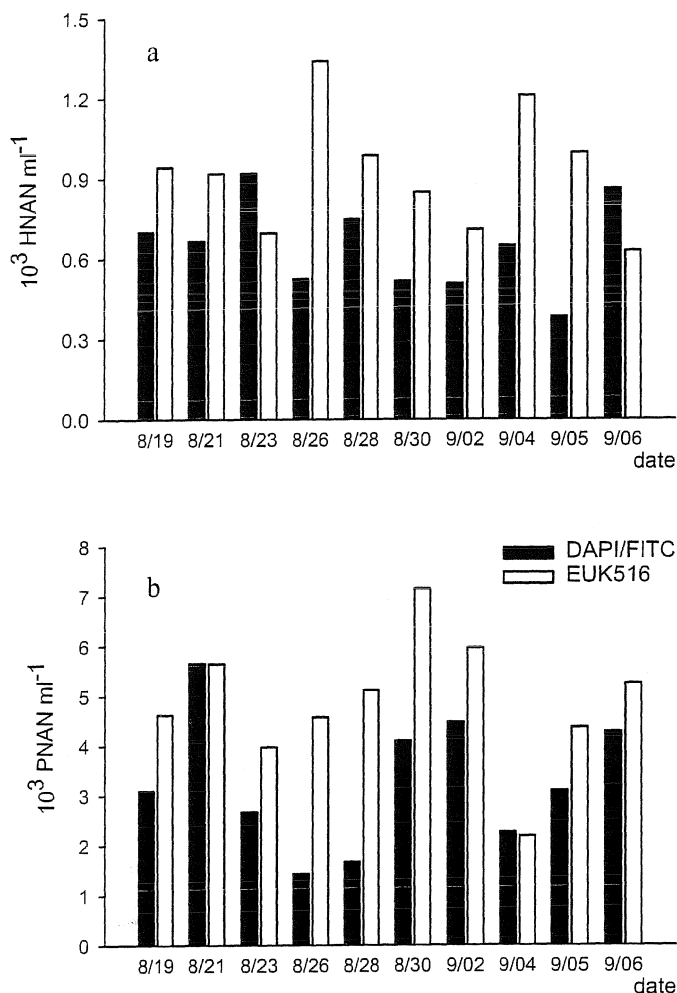


FIG. 2. Comparison of methods: DAPI/FITC (black bars) and EUK516 (white bars) cell counts with North Sea samples for HNAN (a) and PNAN (b).

probes (16, 18). So far this was of limited ecological use because no simultaneous distinction of trophic modes was possible. The design of species-specific oligonucleotide probes (7, 20) would theoretically circumvent this problem, but individual flagellate species, such as *Paraphysomonas imperforata*, may occur at very low *in situ* abundances (14). Highly specific probes may thus be an inadequate tool for a tentative community analysis in environmental samples. In contrast, probes for broader lineages may allow the detection of substantial flagellate populations. For example, Massana et al. found high abundances of uncultured stramenopiles in different marine habitats, but grazing

Although the abundances obtained with the new protocol were significantly higher than with the standard technique, they were still in the same order of magnitude. This difference alone does not justify the effort and higher costs of FISH with tyramide signal amplification. Hence we do not recommend our new protocol as a better method for the determination of total nanoeukaryotic abundances. A more challenging application of this technique in future studies could be to open the "black box" of flagellates by the use of group-specific oligonucleotide

experiments were required to indirectly classify these novel groups as heterotrophs (16). Our approach might provide a less demanding alternative to obtain the same information.

Concluding remarks. FISH with tyramide signal amplification is sensitive enough to quantitatively detect flagellates from environmental samples. The UV-excitable fluorescent dye, Alexa₃₅₀, does not overlap with the chl *a* autofluorescence and therefore allows a simultaneous classification according to the trophic mode of the organism. In combination with group specific oligonucleotide probes the new protocol might thus be a valuable direct method for the identification and quantification of potential key players with defined ecological functions within the microbial food web.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union (EVK3-2001-00194 BASICS) and the Max Planck Society.

References

1. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
2. **Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
3. **Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
4. **Auer, B., and H. Arndt.** 2001. Taxonomic composition and biomass of heterotrophic flagellates in relation to lake trophy and season. *Freshwater Biol.* **46**:959-972.
5. **Brandt, S. M., and M. A. Sleight.** 2000. The quantitative occurrence of different taxa of heterotrophic flagellates in Southampton Water, U.K. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **51**:91-102.

6. **Caron, D. A.** 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:491-498.
7. **Caron, D. A., E. L. Lim, M. R. Dennett, R. J. Gast, C. Kosman, and E. F. DeLong.** 1999. Molecular phylogenetic analysis of the heterotrophic chrysophyte genus *Paraphysomonas* (Chrysophyceae), and the design of rRNA-targeted oligonucleotide probes for two species. *J. Phycol.* **35**:824-837.
8. **Cavalier-Smith, T.** 2000. Flagellate megaevolution, p. 361-389. *In* B. S. C. Leadbeater and J. C. Green (ed.), *The Flagellates*. Taylor and Francis, London.
9. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. **243**:1360-1363.
10. **Díez, B., C. Pedrós-Alió, and R. Massana.** 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2932-2941.
11. **Fenchel, T.** 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **9**:35-42.
12. **Hopman, A. H. N., F. C. S. Ramacker, and E. J. M. Speel.** 1998. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:771-777.
13. **Lim, E. L., D. A. Caron, and E. F. DeLong.** 1996. Development and field application of a quantitative method for examining natural assemblages of protists with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1416-1423.
14. **Lim, E. L., M. R. Dennett, and D. A. Caron.** 1999. The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnol. Oceanogr.* **44**:37-51.
15. **López-García, P., F. Rodríguez-Valera, C. Pedrós-Alió, and D. Moreira.** 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*. **409**:603-607.
16. **Massana, R., L. Guillou, B. Díez, and C. Pedrós-Alió.** 2002. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4554-4558.

17. **Moon-van der Staay, S. Y., R. de Wachter, and D. Vaultot.** 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*. **409**:607-610.
18. **Not, F., N. Simon, I. C. Biegala, and D. Vaultot.** 2002. Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:157-166.
19. **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, London.
20. **Rice, J., C. D. O'Connor, M. A. Sleight, P. H. Burkill, I. G. Giles, and M. V. Zubkov.** 1997. Fluorescent oligonucleotide rDNA probes that specifically bind to a common nanoflagellate, *Paraphysomonas vestita*. *Microbiology*. **143**:1717-1727.
21. **Sanders, R. W., K. G. Porter, S. J. Bennet, and A. E. DeBiase.** 1989. Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans. *Limnol. Oceanogr.* **34**:673-687.
22. **Sherr, E. B., D. A. Caron, and B. F. Sherr.** 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy, p. 213-227. *In* P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (ed.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Boca Raton.
23. **Sieburth, J. M., V. Smetacek, and J. Lenz.** 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* **23**:1256-1263.
24. **Vørs, N.** 1992. Heterotrophic amoebae, flagellates and heliozoa from the Tvärminne area, Gulf of Finland, in 1988-1990. *Ophelia*. **36**:1-109.
25. **Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. **14**:136-143.

Danksagung

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Amann für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Molekulare Ökologie, für seine Unterstützung und Anregungen sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Gunter-Otto Kirst, der das Zweitgutachten dieser Arbeit übernimmt, sowie den weiteren Mitgliedern des Prüfungskomitees Herrn Prof. Dr. Friedrich Widdel, Herrn Dr. Jakob Pernthaler, Frau Dr. Stefanie Kühn und Martha Schattenhofer für ihre Zeit und Mühe. Jakob danke ich ebenfalls sehr für die Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für seine Unterstützung gerade in der letzten, heißen Phase.

In der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred-Wegener-Institutes für Polar- und Meeresforschung war ich während zahlreicher Forschungsaufenthalte auf der Insel Helgoland zu Gast. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Antje Wichels, Dr. Gunnar Gerdts, Dr. Karen Wiltshire und Dr. Christian Schütt, die stets für anregende Diskussionen zur Verfügung standen und mir einen angenehmen Aufenthalt auf der Insel ermöglichten.

Der gesamten Abteilung Molekulare Ökologie und vielen weiteren MitarbeiterInnen des Max-Planck-Institutes danke ich für das gute Arbeitsklima: Ich habe mich hier sehr wohl gefühlt. Insbesondere möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Katrin Knittel für die Einführung ins ARB-Programm sowie für zahlreiche anregende Diskussionen bedanken. Vielen Dank an Herrn Dr. Bernhard Fuchs für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung am Durchflußzytometer.

Für ein sehr gutes Büroklima danke ich allen meinen ehemaligen und jetzigen Bürogenossen; ganz besonders hat es mich gefreut, nach meinem Abteilungsumzug bei Euch zu landen: Katrin, Anna und Caroline! Martha Schattenhofer, Linda Keller, Mandana Mirhaj und Jeanne de la Roche danke ich für Hilfe im Labor. Olaf Gundermann, Carsten Witt und Christine Pranz sei dafür gedankt, dass sie mich bei allen Computer-assoziierten Problemen nie im Stich gelassen haben. Für jegliche Art von Unterstützung in wissenschaftlicher und moralischer Hinsicht während meiner Promotion und besonders in den letzten Wochen des Zusammenschreibens danke ich außerdem Dörte Altmann, Uschi Werner, Rebecca Ludwig, Christine Flies, Stefanie Kühn, Anna Blazejak, Katja Nauhaus, Peter Stief, Uli Franke, Marc Mussmann, Jens Langreder und Thomas Scholz.

Mein innigster Dank gilt Dr. Dr. Dr. P.H.S.: Für alles!