

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

Phylogenie und *in situ*-Identifizierung von Prokaryonten in limnischen und marinen Ökosystemen

Frank Oliver Glöckner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie
und Geowissenschaften der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Amann
2. Univ.-Prof. Dr. W. Höll
3. o.Univ.-Prof. Dr. R. Psenner, Leopold-Franzens-Universität
Innsbruck / Österreich

Die Dissertation wurde am 10.11.1998 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften
am 08.12.1998 angenommen.

Für Christiane
und
meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN.....	11
B.1. Untersuchte Ökosysteme.....	11
B.1.1. Daten.....	11
B.1.2. Probennahme	12
B.1.2.1. <i>Nevskia ramosa</i> (C.1.):	12
B.1.2.2. <i>Achromatium oxaliferum</i> (C.2.):.....	12
B.1.2.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen (C.3.):	13
B.2. Fixierungsmethoden	13
B.2.1. Verwendete Lösungen und Materialien.....	13
B.2.2. Fixierung von Zellen im Filterturm auf Polycarbonatfiltern.....	15
B.2.3. Fixierung auf Objektträgern.....	15
B.2.4. Fixierung von Zellsuspensionen	16
B.3. Medien, Bakterienanzucht und Stammhaltung.....	16
B.3.1. Medien.....	16
B.3.2. Bakterienanzucht.....	17
B.3.3. Stammhaltung.....	17
B.4. Nukleinsäureisolierung.....	17
B.4.1. Isolierung nach Massana <i>et al.</i> , 1997 und Schmidt <i>et al.</i> , 1991, modifiziert.....	17
B.4.2. Isolierung nach Zhou <i>et al.</i> , 1996	18
B.5. Amplifizierung von ribosomalen RNA-Genen (rDNA) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion.....	19
B.5.1. PCR.....	20
B.5.2. Agarosegelelektrophorese	22
B.5.3. Aufreinigung der PCR-Amplifikate.....	23
B.6. Klonieren der PCR-Amplifikate und Plasmidisolation	24
B.6.1. Klonierung der PCR-Amplifikate	24
B.6.1.1. pGEM T-Vektor von Promega	24
B.6.1.2. TA-Klonierungskit von Invitrogen	26
B.6.2. Plasmidisolation und Restriktionsanalyse	27
B.6.2.1. Koch-STET-Schnelltest	27
B.6.2.2. Plasmidisolierung mit QIAGEN.....	28
B.6.2.3. Restriktionsanalyse	29

B.7.	Nichtradioaktive Sequenzanalyse von DNA-Molekülen nach dem „Cycle-Sequencing-Protokoll“	29
B.7.1.	Sequenzierung.....	30
B.8.	Auswertung der Sequenzdaten und Sondenkonstruktion	31
B.8.1.	Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment) mit ARB_Align.....	31
B.8.2.	Rekonstruktion von Stammbäumen	31
B.8.3.	Konstruktion von 16S-rRNA gerichteten Sonden mit ARB_Probe_Design und ARB_Probe_Match.....	32
B.9.	Schmelzpunktbestimmung für Oligonukleotidsonden mittels <i>in-vitro</i>-Transkription	32
B.9.1.	Radioaktive Markierung der Sonden.....	33
B.9.2.	<i>In-vitro</i> -Transkription	34
B.10.	Herstellung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide für die <i>in situ</i>-Hybridisierung	35
B.10.1.	Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	36
B.10.2.	Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffs	36
B.10.3.	Abtrennung des unmarkierten Oligonukleotidanteils	36
B.10.4.	Abtrennung von Salzen.....	38
B.10.5.	Quantitative Bestimmung der markierten Oligonukleotide.....	39
B.11.	Ganzzellhybridisierungen mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden	40
B.11.1.	Beschichtung der Objektträger mit Gelatine.....	40
B.11.2.	Hybridisierung auf Objektträgern	40
B.11.2.1.	Simultane Doppelhybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden	43
B.11.2.2.	Hybridisierung mit Kompetitorsonden	43
B.11.3.	Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern.....	43
B.12.	Detektion und Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse	44
B.12.1.	Konventionelle Licht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskopie	44
B.12.2.	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	45
B.13.	Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Einzelzellen	46
B.13.1.	Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI nach Membranfiltration	46
B.13.2.	Kombination der DAPI-Färbung mit <i>in situ</i> -Einzelzellhybridisierung.....	47
B.13.3.	Bestimmung der sondenspezifischen Zellzahlen in aquatischen Systemen.....	48
B.13.4.	Analyse der <i>Achromatium</i> Populationen.....	49

C. ERGEBNISSE.....	50
C.1. Phylogenie und <i>in situ</i>-Identifizierung von <i>Nevskia ramosa</i>	50
C.1.1. Phasenkontrastmikroskopie der Anreicherungskultur.....	50
C.1.2. <i>In situ</i> -Analyse der Anreicherungskultur mit gruppenspezifischen Sonden	50
C.1.3. Phylogenetische Analyse einer 16S-rDNA Genbank aus der Anreicherung.....	51
C.1.4. <i>In situ</i> -Identifizierung von <i>N. ramosa</i>	52
C.1.5. Phylogenetische Stellung der Bakterien in der <i>N. ramosa</i> Anreicherung	54
C.2. Phylogenie und Diversität von <i>Achromatium oxaliferum</i>	57
C.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchung	57
C.2.2. Phylogenetische Analyse der 16S-rDNA Genbank aus physikalischen Anreicherungen von Achromatien aus dem Stechlinsee und der Fuchskuhle.....	57
C.2.3. rRNA-Sekundärstruktur.....	61
C.2.4. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	61
C.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen.....	66
C.3.1. Vergleich limnischer und mariner Freiwasserstandorte.....	66
C.3.1.1. Gesamtzellzahlen	66
C.3.1.2. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) mit den Sonden EUB338 und ARCH915... ..	66
C.3.1.3. Gruppenspezifische Sonden	67
C.3.2. Bakterielle Diversität in limnischen Ökosystemen	73
C.3.2.1. 16S-rDNA Genbanken	73
C.3.2.2. Stammbäume.....	78
C.3.2.3. Entwicklung klonspezifischer Sonden	84
C.3.2.4. FISH mit domänen-, gruppen- und klonspezifischen Sonden.....	85
D. DISKUSSION.....	88
D.1. Phylogenie und <i>in situ</i>-Identifizierung von <i>Nevskia ramosa</i>	88
D.1.1. Anreicherungskultur.....	88
D.1.2. Gruppenspezifische Sonden.....	89
D.1.3. Phylogenie	90
D.1.4. Neuentwickelte Sonden.....	91
D.2. Phylogenie und Diversität von <i>Achromatium oxaliferum</i>	94
D.2.1. Mechanische Anreicherungen.....	95
D.2.2. Phylogenie	95
D.2.3. Physiologie	97
D.2.4. Neuentwickelte Sonden.....	98
D.2.5. Lebensraum und Diversität	100

D.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen	102
D.3.1. Vergleich limnischer und mariner Freiwasserstandorte	102
D.3.1.1. Zellzahlen, allgemein und spezifisch.....	103
D.3.1.2. Vergleich der Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften in limnischen und marinen Systemen	104
D.3.1.3. Methodische Aspekte der FISH in aquatischen Ökosystemen.....	109
D.3.2. Bakterielle Diversität in limnischen Ökosystemen.....	112
D.3.2.1. Diversität und Abundanz.....	112
D.3.2.2. Entwicklung und Anwendung klonspezifischer Sonden.....	117
E. ZUSAMMENFASSUNG	119
F. LITERATURVERZEICHNIS	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin; Ampere
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BP	Bandpaßfilter
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
CFU	Koloniebildende Einheiten
CT	5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3,3'-tetramethylindolocarboyanin-N-hydroxysuccinimidester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DIG	Digoxigenin
DMS	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm, Fallbeschleunigung
G	Guanin
GAG	Genom Analytik GmbH, Universität Bremen
G+C	Mol% Guanin und Cytosin
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	destilliertes, über Ionenaustauscher gereinigtes, filtriertes Wasser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
l	Liter
LP	Langpaßfilter
m	Milli (10 ⁻³); Meter
m ³	Kubikmeter
M	Molar
μ	Mikro (10 ⁻⁶)

min	Minute
n	Nano (10^{-9})
Nd:YAG	Neodymium dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NS	Nukleinsäure
OD	optische Dichte
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Meerrettich-Peroxidase
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg, Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
ss	einzelsträngig
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	siehe CT
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TUM	Technische Universität München
U	Einheiten, Uracil
ÜN	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
W	Watt
w	Gewicht
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A. Einleitung

Die Mikrobiologie ist eine junge Wissenschaft, vergleicht man sie mit anderen Teilbereichen der Biologie, wie etwa der Botanik oder der Zoologie. In den etwas mehr als einhundert Jahren, die sie jetzt als eigenständige Teildisziplin besteht, hat sie viel erreicht. Denkt man nur an das seit Jahrzehnten zentrale Untersuchungsobjekt der Mikrobiologie – das Bakterium *Escherichia coli*. Bezüglich seiner Genetik und Physiologie ist es derzeit wohl das bestverstandene Lebewesen dieser Welt. Einen weiteren Meilenstein stellt die vor kurzem vollendete Gesamtgenomsequenzierung einiger Bakterien dar. Diese Fortschritte wurden erst durch die molekulare Revolution und dem in den letzten 50 Jahren praktizierten, direkten Kontakt zwischen Mikrobiologie und Molekularbiologie ermöglicht.

Die molekularen Techniken zeigen aber auch, daß die Mikrobiologie tatsächlich noch eine junge Wissenschaft mit teilweise sehr lückenhaftem Kenntnisstand ist. Welcher Mikrobiologe traut sich heute eine exakte Prognose zu, wieviel mehr als die ca. 5000 derzeit gültig beschriebenen Arten von Bakterien es tatsächlich auf der Erde gibt? Es gibt ja noch nicht einmal eine biologisch begründete Artdefinition für die sich mehrheitlich asexuell fortpflanzenden Mikroorganismen. Der so erfolgreiche "run for *E. coli*" war sicher nicht ganz unschuldig daran, daß wir in der Beschreibung der Naturgeschichte der Mikroorganismen nach einem guten Start zu Anfang unseres Jahrhunderts (nicht einmal) auf halbem Wege stehen geblieben sind. Deshalb kann für einen an der mikrobiellen Diversität arbeitenden Biologen, die Untersuchung einer Wasserprobe aus einer Pfütze am Wegesrand immer noch ähnlich ertragreich sein wie Humboldt's Südamerikareise oder Darwin's Weltreise mit der Beagle.

Klar ist, daß die naturgeschichtliche Phase der Botanik und Zoologie mit ihrer weitreichenden Beschreibung der in diesen Teilbereichen auftretenden Biodiversität eine wichtige Voraussetzung für unser heutiges gutes Verständnis der Makroökologie ist. Leider sind wir im Gegensatz dazu in der Mikrobiologie weit davon entfernt, die Zusammensetzung und Funktion des mikrobiellen Anteils komplexer Lebensgemeinschaften, der Mikrobiota, zu verstehen.

Woran liegt es, daß wir mit der Aufklärung der mikrobiellen Diversität noch nicht weiter sind? Neben der bisher dafür aufgewendeten Zeit – Jahrhunderte, wenn nicht Jahrtausende systematischer Forschung in der Botanik und Zoologie im Gegensatz zu gerade mal einem Jahrhundert echter Mikrobiologie – sicher auch an Problemen, die der Mikrobiologie und

ihren Untersuchungsobjekten eigen sind. Mikroorganismen sind wie der Name schon sagt sehr klein. Gerade bei den Bakterien sind die mikroskopisch sichtbaren Details eines Individuums meist nicht ausreichend für eine eindeutige Identifizierung. Deshalb war seit Robert Koch die Isolierung von Organismen in Reinkultur die Voraussetzung für eine nachfolgende Identifizierung anhand phänotypischer, physiologischer und biochemischer Merkmale. Die Kultivierung erwies sich jedoch für viele Bakterien als sehr schwierig, wenn nicht unmöglich. Aus vielen Ökosystemen läßt sich nur ein geringer Anteil der mikroskopisch sichtbaren Bakterien in Kultur bringen (Amann, 1995). Ein Grund dafür liegt vermutlich darin, daß selbst bekannte, auf den verwendeten Medien normalerweise gut kultivierbare Bakterien durch Umweltfaktoren in Stadien übergehen können, in denen sie zwar noch nicht tot, aber auch nicht mehr mit Standardverfahren kultivierbar sind ("viable, but non-culturable"; Colwell *et al.*, 1985; Roszak und Colwell, 1987; Oliver *et al.*, 1991). Ein weiterer Grund ist sicher unsere mangelnde Kenntnis der richtigen Kultivierungsbedingungen, man denke z.B. an Bakterien die natürlicherweise in komplexen Gradientensystemen auftreten. Zudem gelangen Mikrobiologen heute zunehmend zu der Einsicht, daß bakterielle Einzelzellen häufig auf symbiontische Arbeitsteilung mit anderen Organismen angewiesen sind.

Erschwerend kommt noch hinzu, daß die phänotypische Identifizierung von Mikroorganismen nur die Erstellung einer künstlichen, die Evolution der Mikroorganismen nicht widerspiegelnde Systematik ermöglichte. Unterschiedliche Labors führten unterschiedliche physiologische Testreaktionen durch und beurteilten sie verschieden. Ein nicht unbedeutender Teil der "unbekannten" mikrobiellen Diversität versteckt sich deshalb heute hinter sogenannten Homonymen, also Fällen in denen in Wirklichkeit verschiedene Arten gleich bezeichnet wurden. Ein Teil der bekannten mikrobiellen Diversität besteht hingegen nur in der Form von Synonymen, also unterschiedlichen Bezeichnungen, für ein und dieselbe Bakterienart. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß die Bakteriensystematik regelmäßig Revisionen durchlief und als frustrierendes Gebiet galt.

Es blieb Carl Woese, einem ursprünglich für General Electric arbeitenden Physiker vorbehalten, vor 25 Jahren, durch den Einstieg in die vergleichende Sequenzierung von ribosomalen RNA-Molekülen den Weg zu einer stabilen, die Evolution reflektierenden, natürlichen Systematik zu ebnen. Er griff dabei die Idee von Zuckerkanal und Pauling (1965) auf, daß sogenannte informative Makromoleküle sich als molekulare Uhren eignen. Die Zahl der Basen- oder Aminosäureaustausche, die sich an homologen Positionen homologer Makromoleküle zweier Arten angehäuft haben, sollte proportional zur Zeit der getrennten

Evolution sein. Je näher verwandt also zwei Arten sind, desto höher ist die Homologie. Geringere Verwandtschaft äußert sich in geringerer Sequenzähnlichkeit. Carl Woese erkannte als erster, daß sich ribosomale Ribonukleinsäure-(rRNA)-Moleküle hervorragend für die Technik der vergleichenden Sequenzanalyse eignen (Woese, 1987; Ludwig und Schleifer, 1994; Ludwig *et al.*, 1998). rRNA-Moleküle sind ubiquitär verbreitet und kommen in jeder Zelle in relativ hoher Kopienzahl vor. Bei den Bakterien unterscheidet man 5S-, 16S- und 23S-rRNA, die Längen von ca. 120, 1500 und 3000 Nukleotiden aufweisen. Während sich der Informationsgehalt der 5S-rRNA als zu gering für eine sichere Klassifikation erwies, enthalten 16S- und 23S-rRNA genügend unabhängig mutierende Positionen für eine zuverlässige Rekonstruktion von stammesgeschichtlichen Beziehungen. Dabei ist die stark unterschiedliche Konserviertheit verschiedener Teilbereiche der Primärstruktur von großem Vorteil. In allen Organismen vorkommende, unveränderte Nukleotide erlauben eine zuverlässige Zuordnung homologer Positionen. Unterschiedlicher Funktionsdruck läßt andere Positionen im Sinne von Zuckerkandl und Pauling (1965) als Stunden-, Minuten- und Sekundenzeiger der Evolution fungieren. Das wohl wichtigste Ergebnis der bahnbrechenden Arbeiten von Carl Woese ist die Erkenntnis, daß die Lebewesen nicht, wie ursprünglich angenommen, in zwei große Gruppen fallen, die Prokaryonten und die Eukaryonten, sondern drei gleichwertige Domänen, die *Archaea*, *Bacteria* und *Eucarya* existieren (Woese und Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Mikroorganismen bilden dabei zwei Domänen alleine und sind auch in der Dritten vertreten. Sie zeigen damit eine größere Diversität als die Höheren Pflanzen und Tiere, die nur einen kleinen Bereich der *Eucarya* umfassen (Abbildung A.1.).

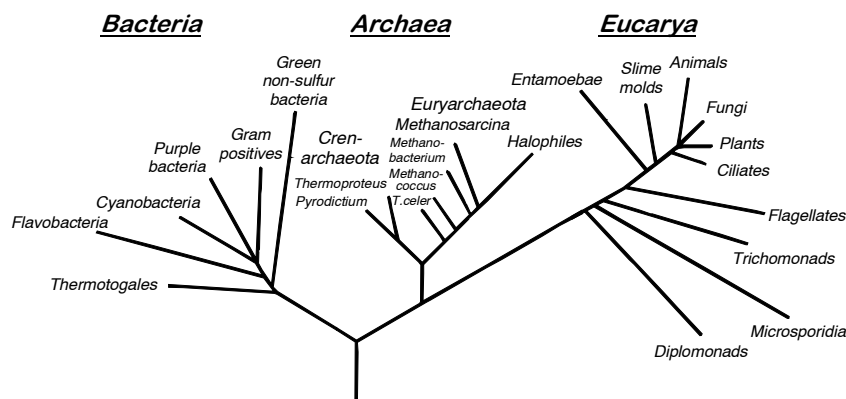


Abbildung A.1.: Allgemeiner phylogenetischer Baum mit den drei Reichen, *Archaea*, *Bacteria* und *Eucarya* (Woese, 1994).

Das rasch einsetzende Interesse an der Aufklärung der phylogenetischen Beziehungen und die Verbesserung der Sequenzieretechniken resultierte in einem exponentiellen Anstieg der verfügbaren 16S- und 23S-rRNA-Sequenzen. Derzeit (Oktober 1998) sind in den großen Datenbanken (Van De Peer *et al.*, 1996; Maidak *et al.*, 1997) bereits ca. 15.000 16S-rRNA-Sequenzen hinterlegt. Diese Datenbanken enthalten heute mehr als 70% der 16S-rRNA-Sequenzen der gültig beschriebenen Bakterienarten und viele direkt aus der Umwelt gewonnene 16S-rRNA-Sequenzen. Damit besteht ein eng geknüpft Netzwerk, in das sich neue Arten auf Grund ihrer 16S-rRNA-Sequenzen zuverlässig einordnen lassen.

Vor nunmehr 10 Jahren erkannte man in der Arbeitsgruppe von Norman Pace das Potential der vergleichenden rRNA-Analyse für eine kultivierungsunabhängige Untersuchung der Diversität und Ökologie der Mikroorganismen (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986). Dieser Ansatz berücksichtigt die Schwierigkeiten bei deren Kultivierung und beruht deshalb auf der direkten Isolierung von Nukleinsäuren aus dem zu untersuchenden Material. Die ersten Versuche basierten noch auf der Analyse von 5S-rRNA-Molekülen. Nach der Extraktion wurden die 5S-rRNA-Moleküle elektrophoretisch aufgetrennt und dann sequenziert. Der 5S-rRNA-Ansatz bringt jedoch nur in relativ wenig komplexen Proben befriedigende Ergebnisse. So z.B. für die bakteriellen Symbionten der entlang hydrothermalmer Tiefseequellen lebenden Invertebraten (Stahl, 1984), und für die Biozönosen weiterer extremer Standorte (Stahl *et al.*, 1985; Lane *et al.*, 1985). In Systemen mit einer hohen biologischen Vielfalt versagt er. Zudem ist, wie schon erwähnt, der Informationsgehalt der nur 120 Nukleotide langen 5S-rRNA zu gering für eine genaue Einordnung der erhaltenen Sequenzen. Daher wurde von der gleichen Arbeitsgruppe (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986) ein Verfahren vorgeschlagen, das auf der Isolierung, Vereinzeln und Analyse von 16S-rRNA-Molekülen beruht. Die dabei notwendigen Einzelschritte sind in Abbildung A.2. dargestellt.

Die ersten Anwendungen des im folgenden als rRNA-Ansatz bezeichneten Verfahrens erbrachten aufsehenerregende Ergebnisse. Die aus marinem Picoplankton (Giovannoni *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991; DeLong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992; Fuhrman *et al.*, 1993) bzw. den mikrobiellen Biozönosen heißer Quellen (Weller und Ward, 1989; Ward *et al.*, 1990) erhaltenen Sequenzen deuteten nicht nur eine hohe Diversität an, sondern zusätzlich stimmte keine der erhaltenen Sequenzen mit den in den Datenbanken hinterlegten überein. Zusammen mit Befunden aus DNA-DNA-Reassoziationsexperimenten (Torsvik *et al.*, 1990) weist dies darauf hin, daß bisher erst ein geringer Prozentsatz der existierenden Mikroorganismen isoliert wurde. Dieser Befund initiierte weltweit Anstrengungen, unter Verwendung klassischer und molekularbiologischer Techniken, diese bisher unbekannt Organismen zu

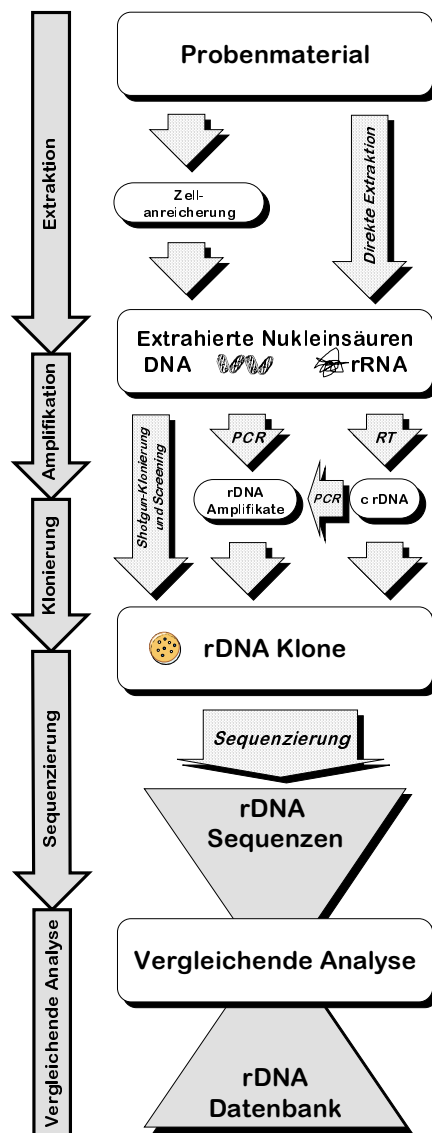


Abbildung A.2.: Kultivierungsunabhängige rRNA-Sequenzanalyse. Die Abbildung berücksichtigt bereits die erst 1988 beschriebene Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die heute zu einer wesentlichen Vereinfachung des Verfahrens führt (Saiki *et al.*, 1988).

charakterisieren. Dabei erwies sich besonders die bereits in den frühen 60er Jahren (Marmur und Lane, 1960; Hall und Spiegelman, 1961) beschriebene Technik der Nucleinsäurehybridisierung als hilfreich.

Nucleinsäuresonden sind einzelsträngige Nucleinsäuren, die eine Markierung tragen, und unter geeigneten Bedingungen spezifisch an komplementäre Nucleinsäuren (Zielsequenzen) binden (Schleifer *et al.*, 1993). Mit diesen Sonden läßt sich schnell und preiswert die Häufigkeit der Zielsequenz in einem Gemisch von Nucleinsäuren quantifizieren. Sie sind hervorragend geeignet, die Verbreitung von kultivierten, oder bisher nicht kultivierten Mikroorganismen anhand spezifischer Zielsequenzen zu verfolgen.

Die rRNA-Moleküle haben sich aus mehreren Gründen als ideale Zielmoleküle erwiesen (Stahl und Amann, 1991). Ihre hohe Kopienzahl von 10^3 bis 10^5 pro Zelle macht die auf rRNA-gerichtete Sonden basierenden Hybridisierungsverfahren besonders empfindlich. Viele Abschnitte der rRNA-Moleküle sind einzelsträngig, so daß teilweise auf eine Denaturierung des Zielmoleküls, wie sie für die DNA Hybridisierung durchzuführen ist, verzichtet werden kann. Zudem ist aus der vergleichenden Sequenzanalyse bekannt, daß es entlang der rRNA-Moleküle Bereiche unterschiedlicher evolutionärer Konserviertheit

gibt. Durch die Wahl der Zielregion kann die Spezifität von rRNA-Sonden nach den Ansprüchen des Experimentators festgelegt werden. So ist es möglich, Sonden zu entwerfen, die *Bacteria* von *Archaea* und *Eucarya* unterscheiden. Ebenso können auch gattungs-, art- und teilweise unterartsspezifische Sonden konstruiert werden (Göbel *et al.*, 1987; Giovannoni *et al.*, 1988; Stahl *et al.*, 1988; Amann *et al.*, 1992). Nukleinsäuresonden sind deshalb ein integraler Bestandteil des rRNA-Ansatzes zur Erforschung der Ökologie von Mikroorganismen.

Es gibt mehrere Techniken, rRNA-gerichtete Sonden einzusetzen. Zusätzlich zu Verfahren wie der Dot Blot-, Southern- oder Koloniehybridisierung, die auf einer Freisetzung der Zielnukleinsäuren aus dem Zellmaterial beruhen, können mit rRNA-gerichteten Sonden auch *in situ*- oder Ganzzellhybridisierungen durchgeführt werden (Abbildung A.3.). Diese Technik ermöglicht es, Organismen in ihren natürlichen Habitaten zu identifizieren. Dies ist zwar mit Antikörpersonden bei der Immunfluoreszenzmethode ebenfalls möglich (Bohlool und Schmidt, 1980), jedoch können rRNA-Sonden auch gegen bisher nicht kultivierte Organismen konstruiert werden.

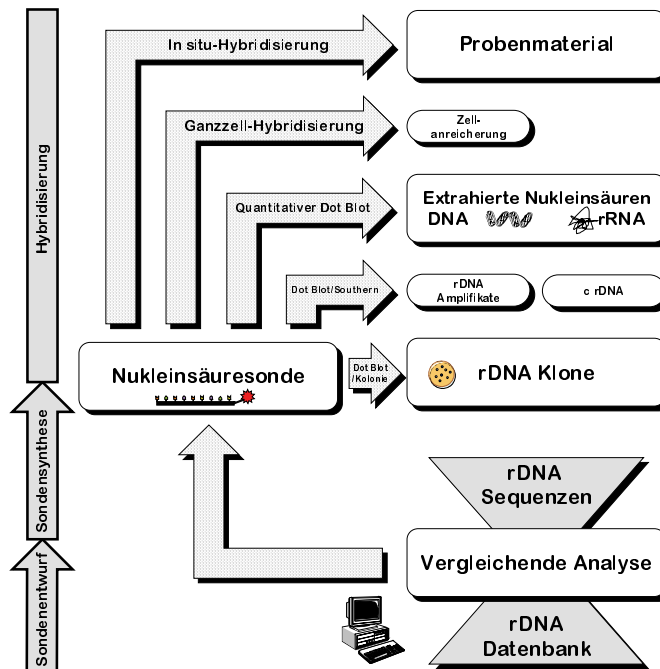


Abbildung A.3.: Hybridisierungsverfahren zur rRNA-Analyse

Die in der Abbildung A.2. und Abbildung A.3. dargestellten Einzelschritte entwickeln ihr volles Potential erst im Zusammenspiel. Das in Abbildung A.4. gezeigte zyklische Durchlaufen von Sequenzierungs- und Hybridisierungsphasen im rRNA-Ansatz ermöglicht zum einen, eine interne Fehleranalyse und damit eine Erhöhung der Genauigkeit der molekularen Methoden, zum anderen stellt es momentan die beste Möglichkeit für eine kultivierungsunabhängige Untersuchung der Diversität und Ökologie von Mikroorganismen in komplexen Ökosystemen dar (Amann *et al.*, 1995).

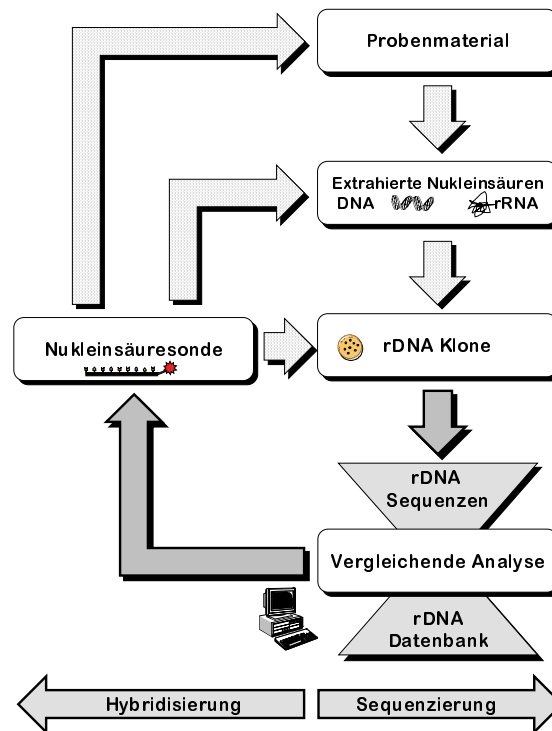


Abbildung A.4.: Der rRNA-Ansatz zur kultivierungsunabhängigen Analyse der Diversität und Ökologie von Mikroorganismen

Zunächst wurde der rRNA-Ansatz zur Erforschung der Phylogenie bekannter nicht-kultivierbarer Bakterien, wie z.B. obligater Symbionten von Protozoen verwendet. Ein Beispiel war hier die endonukleäre Symbiose der Gattung *Holospora* in bestimmten Stämmen von *Paramecium caudatum* (Amann *et al.*, 1991). Diese mikroskopisch schon zur Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckten Bakterien besiedeln in hoher Dichte den Mikro- (*H. undulata*, *H. elegans*) oder Makronukleus (*H. obtusa*), sind hoch infektiös und durchlaufen einen

Zellzyklus, der durch das Auftreten von großen, stark lichtbrechenden, spindelförmigen Zellen gekennzeichnet ist (Görtz, 1983; Görtz, 1986). Ausgehend von mit *H. obtusa* infizierten Paramecien wurden Genfragmente der 16S-rRNA amplifiziert, durch Klonierung in *E. coli* vereinzelt, und anschließend sequenziert. Eine Sequenz, die eine erhöhte Ähnlichkeit zu den Sequenzen der obligaten intrazellulären Krankheitserreger der Gattung *Rickettsia* in der alpha-Gruppe der *Proteobacteria* zeigte, konnte durch *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden definitiv den makronukleären Endosymbionten der Art *H. obtusa* zugeordnet werden (Amann *et al.*, 1991). Ähnliche Untersuchungen wurden an ebenfalls sehr schwer kultivierbaren, oder bisher nicht kultivierten magnetotaktischen Bakterien durchgeführt. Ein relativ großes Bakterium, das sich aus den obersten Sedimentschichten des Chiemsees physikalisch anreichern läßt, konnte durch den rRNA-Ansatz im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Bakterien als *Candidatus Magnetobacterium bavaricum* in das *Nitrospira*-Phylum eingeordnet werden (Spring *et al.*, 1993).

Nachdem die Methodologie erfolgreich an diesen relativ wenig komplexen Proben entwickelt und angewendet worden war, wurde sie in den folgenden Jahren vor allem für die Untersuchung nährstoffreicher komplexer Systeme, wie z.B. Belebtschlamm, eingesetzt (Amann *et al.*, 1998). Anfangs wurde mit rRNA-gerichteten Sonden für größere phylogenetische Gruppen, wie die alpha-, beta-, und gamma-Gruppe der *Proteobacteria*, die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften unterschiedlicher Belebtschlämme grob charakterisiert (Wagner *et al.*, 1993; Manz *et al.*, 1994). Danach wurden 16S-rRNA-Genbanken als Grundlage für die Analyse spezifischer Gattungen und Arten angelegt (Snaird *et al.*, 1997). Es zeigte sich eine sehr große Diversität, die mit den, aus den Sequenzdaten neu entwickelten Oligonukleotidsonden auf dem Gattungs- und Artniveau, auch *in situ* gezeigt werden konnte (Amann *et al.*, 1996).

Die Einführung und erfolgreiche Erprobung neuer Fluoreszenzfarbstoffe der Carbocyaninklasse, wie z.B. das orangerot fluoreszierende Cy3 und das im nahen IR emittierende Cy5 (Southwick *et al.*, 1990), ermöglichte ab 1995 die Untersuchung oligotropherer Gewässer mittels *in situ*-Hybridisierung. Dies war bis dahin auf Grund der geringeren Größe und des geringeren rRNA-Gehalts der dort vorkommenden Mikroorganismen schwierig (Hicks *et al.*, 1992). Durch die helleren Fluoreszenzfarbstoffe, die Einführung besserer Filtersätze und die Entwicklung eines Protokolls zur Konzentrierung und Hybridisierung von Zellen auf Polycarbonatfiltern konnten die Detektionsraten von ursprünglich ca. 10% auf in der Regel mehr als 50% der mit DAPI anfärbbaren Partikel

gesteigert werden (Glöckner *et al.*, 1996; Amann *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun mit Hilfe des rRNA-Ansatzes die mikrobiellen Lebensgemeinschaften verschiedener See- und Meerwasserproben untersucht. Anfangs standen dabei zwei morphologisch auffällige, lange nicht kultivierte bzw. noch unkultivierte, an den Grenzschichten der Gewässer lebende Bakterien im Mittelpunkt.

Nevskia ramosa ist ein 1892 von Famintzin beschriebener Bewohner der Wasser-Luft-Grenzschicht ruhiger Gewässer. Diese Biozönose wird als Neuston (Naumann, 1931) bezeichnet und unterscheidet sich durch Nährstoffakkumulation (Netter, 1950) und hohe UV-Einstrahlung (Lambert und Sommer, 1997) deutlich vom restlichen Wasserkörper. Benannt wurde *N. ramosa* nach der Neva, ein Fluß in St. Petersburg, wobei die Artbezeichnung "ramosa" (lat. verzweigt, ästig) auf die Besonderheit des Bakteriums hinweist, auf Wasseroberflächen durch unilaterale Schleimabsonderung typische verzweigte Rosetten zu bilden (Abbildung A.5.). Dieser Organismus widerstand bis vor kurzem (Stürmeyer *et al.*, 1998) erfolgreich allen Kultivierungsversuchen und wird konsequenterweise mangels eindeutiger phylogenetischer Daten in der aktuellen Ausgabe der „Prokaryotes“ im Kapitel der phylogenetisch unaufgeklärten Bakterien geführt (Hirsch, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte basierend auf einer Anreicherungskultur (Babenzien, 1989) die phylogenetische Stellung von *N. ramosa* untersucht werden.

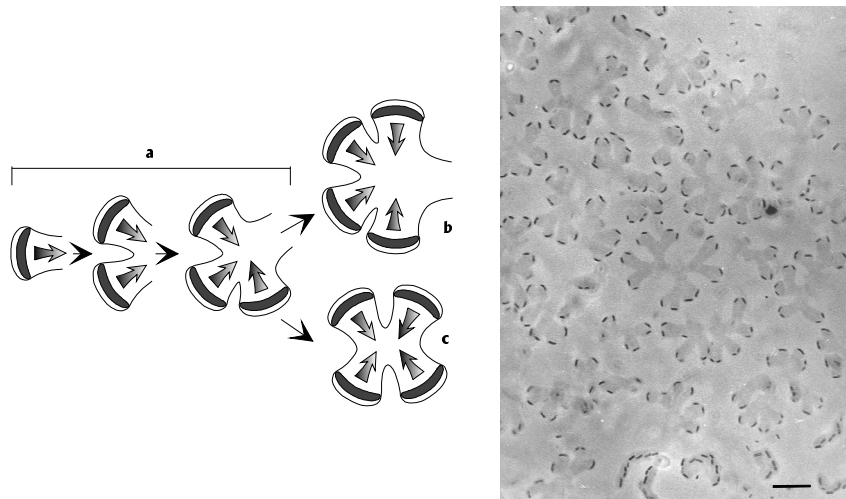


Abbildung A.5.: (Links): Schematischer Ablauf der Rosettenentstehung bei *N. ramosa*. [a] Aus ein, zwei oder drei Zellen bestehende Anfangsstadien von *N. ramosa* Rosetten. [b, c] Zwei mögliche Vorstadien, der Rosette. Die schattierten Pfeile zeigen die unilaterale Schleimabsonderung an. (Rechts) Toluidin-blau gefärbte Phasenkontrastaufnahme von *N. ramosa*. Der Balken entspricht 10 μm .

Achromatium oxaliferum wurde erstmals 1893 von Schewiakoff als ein ungewöhnlich großes an der Wasser-Sediment-Grenzschicht lebendes Bakterium beschrieben. Die Zellen sind rund, ovoid oder zylindrisch mit lichtmikroskopisch deutlich sichtbaren Schwefeltröpfchen und Kalkkristallen. Nach *Beggiatoa* und *Thiomargarita* (Schulz, pers. Mitteilung) gehört *Achromatium* mit einer Größe von bis zu 125 μm , zu den Riesen unter den Bakterien. Trotz seiner weiten Verbreitung konnte es bis heute nicht in Kultur gebracht werden. Für den sauren Weichwassersee Große Fuchskuhle wurde eine mit 8x15 μm deutlich kleinere Varietät beschrieben (Babenzien, 1991; Babenzien und Sass, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit dem rRNA-Ansatz die Diversität und phylogenetische Zugehörigkeit der verschiedenen Achromatien untersucht werden.

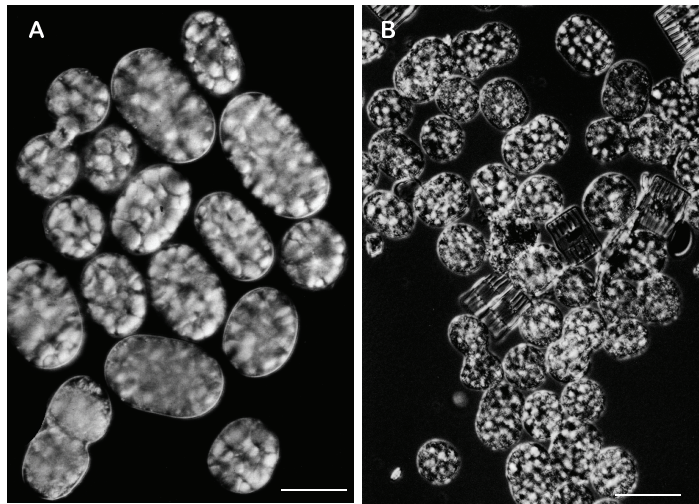


Abbildung A.6.: Interferenzkontrastaufnahmen. (A) *Achromatium oxaliferum* Zellen aus dem Sediment des Stechlinsees. (B) „A. minus“ Zellen aus dem Sediment der Fuchskuhle. In den Zellen sind Kalkkristalle und Schwefeltröpfchen sichtbar. Der Balken entspricht 25 μm .

Den Hauptteil dieser Arbeit bildete jedoch die vergleichende Untersuchung der Häufigkeit und Diversität von Prokaryonten im Freiwasser verschiedener limnischer- und mariner Ökosysteme. Zur Aufklärung der Häufigkeiten verschiedener phylogenetischer Gruppen in Seen und Meeren wurden *in situ*-Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten, rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden durchgeführt. Da bekannt ist, daß gerade auch aus "normalen" aquatischen Systemen eine Vielzahl bisher unbekannter 16S-rRNA-Gene isoliert werden kann (Giovannoni *et al.*, 1990), stand in einem zweiten Teil der Arbeit die Aufklärung der mikrobiellen Diversität durch vergleichende Sequenzanalyse von direkt aus zwei Seen gewonnenen 16S-rRNA-Genfragmenten im Vordergrund.

B. Material und Methoden

B.1. Untersuchte Ökosysteme

B.1.1. Daten

Bezeichnung	Lage	Probennahme Zeitpunkte	Trophiegrad ^a	P- konz. ^b [μg l ⁻¹]	Größe [km ²]	Tiefe (max.) [m]
Gossenköllesee	In den österreichischen Alpen nahe Innsbruck, auf 2417 m Höhe.	XII/95 ^c VI/96–V/97 IX/97 ^c	oligotroph	1-7	0,065	9,9
Lago di Cadagno	Im Piora Tal in der südlichen Schweiz, auf 1923 m Höhe.	VIII/95	mesotroph, meromiktisch	20-30	0,357	21
Großer Oestersee	In Südbayern nahe München, auf 580 m Höhe.	VII/96	mesotroph	20-25	1,78	29,7
Stechlinsee	In der Mecklenburg-Brandenburgischen Seenplatte	V/96 ^c & VII/98	oligotroph	10	4,3	68
Fuchskuhle	In der Mecklenburg-Brandenburgischen Seenplatte	V/98 ^c & VII/98	mesotroph, acidotroph	30	0,02	4,5
Baikalsee	Im südöstlichen Sibirien nahe Irkutsk, auf 456 m Höhe	VIII/95 & 96	oligotroph	2-11	3,1x10 ⁴	1741
Nordsee	Kabeltonne bei Helgoland	X/97			5,8x10 ⁵	725
Ostsee	57°18.18'N 20°04.36'E	VIII/96			3,9x10 ⁵	459
Pazifischer Ozean	Playa del Rey Pier in Venice	X/96			1,8x10 ⁷	11022
Antarktischer Ozean	68°50.57'S 06°01.08'E 58°56.52'S 03°58.44'E 49°29.40'S 11°23.58'E 50°28.62'S 08°08.82'E	I/96			1,1x10 ⁷	9219

Tabelle B.1.: Probennahmestellen und deren Charakteristika. ^aBestimmt nach Vollenweider, 1968
^bGesamtposphorkonzentration bestimmt nach Murphy und Riley, 1962 ^c Probennahme für DNA-Extraktion.

B.1.2. Probennahme

B.1.2.1. *Nevskia ramosa* (C.1.):

Ausgangspunkt für die Aufklärung der Phylogenie von *N. ramosa* und dessen Nachweis durch die *in situ*-Hybridisierung waren eine Anreicherungskultur, die Herr Dr. Babenzien aus dem Soelkensee gewonnen hatte. Durch kontinuierliches Überimpfen des Oberflächenfilms in neues steriles Seewasser, welches mit 0,1% Natriumlactat angereichert war, konnte *N. ramosa* für mehr als 30 Jahre in dieser Anreicherung erhalten werden.

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden 10-Tage alte Oberflächenfilme vorsichtig mit einer Impföse auf Gelatine beschichtete Objektträger (B.11.1.) transferiert und wie in B.2.3. beschrieben fixiert.

Für die Gesamt-DNA-Extraktion wurde der gesamte Biofilm einer 3 l Anreicherungskultur abgenommen und bei 14.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mehrmals mit H₂O_{bidest} gewaschen und sofort, wie in B.4.2. beschrieben, extrahiert.

B.1.2.2. *Achromatium oxaliferum* (C.2.):

Ausgangspunkt für dieses Projekt waren mechanische Anreicherungen von *Achromatium* Zellen aus dem Littoral des Stechlinsees und der Fuchskuhle. Dafür wurde die obere Schicht des Sediments abgenommen und zur Entfernung der großen Partikel durch ein 80 µm Netz gefiltert. Anschließend wurden die *Achromatium* Zellen im Filtrat mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in eine kleine schwarze Glasschale transferiert. Die Reinigung der Zellen von Sedimentpartikeln und Begleitorganismen, sowie die weitere Anreicherung konnte nach dem Prinzip des Goldwaschens, durch wiederholte Resuspension und Sedimentation der schweren *Achromatium* Zellen in steriltfiltrierten (0,2 µm) Seewasser erreicht werden.

Die für die DNA-Extraktion bestimmten Zellen wurden aufwendig gereinigt, mehrmals mit H₂O_{bidest} gewaschen und sofort, wie in B.4.2. beschrieben, extrahiert.

Dagegen konnte für die *in situ*-Hybridisierung auch weniger gereinigtes Material verwendet werden. Die Fixierung erfolgte wie in B.2.4. beschrieben.

B.1.2.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen

Ökosystemen (C.3.):

Die Probennahme zur Untersuchung der Struktur bakteriellen Lebensgemeinschaften im Freiwasser durch *in situ*-Hybridisierung erfolgte mittels eines Schöpfers (Schindler-Patalas, Ruttner-Schöpfer o.ä.) an den entsprechenden Probenahmestellen und Tiefen (siehe Tabelle C.8.). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der Schöpfer vorher mehrmals mit Seewasser gespült. Die Fixierung erfolgte, wie in B.2.2. beschrieben, unmittelbar nach der Probennahme.

Für die 16S-rDNA Genbanken wurden aus zwei Seen (Gossenköllesee und Fuchskuhle) Wasser mit dem Schöpfer entnommen und auf Durapore Filtern (0,2 μm , \varnothing 47 mm, Millipore, Eschborn, FRG) konzentriert. Aus jedem See wurde Wasser aus verschiedenen Tiefen gepoolt, so daß die Konzentrate eine Mischprobe des jeweiligen Sees darstellen. In der in vier Seeteile geteilten Fuchskuhle wurden das Südwestbecken und das Nordostbecken getrennt beprobt. Die Gesamt-DNA-Extraktion erfolgte wie in B.4.1. beschrieben.

B.2. Fixierungsmethoden

B.2.1. Verwendete Lösungen und Materialien

Lösungen:

- 4% Paraformaldehydlösung (Amann *et al.*, 1990)

Herstellung von 50 ml einer 4% PFA - Lösung:

2 g Paraformaldehyd wurden in 30 ml auf 60°C erhitztes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eingebracht und durch Zugabe von einigen Tropfen 1 M NaOH gelöst. Anschließend wurden 16,6 ml 3x PBS zugegeben und die Lösung mit HCl auf pH 7,2 eingestellt. Die fertige PFA-Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm , Millipore, Eschborn, FRG) und im Dunkeln bei 4°C nicht länger als 24 h aufbewahrt.

- Phosphat-gepufferte Saline (PBS)-Stammlösung (Na_xPO_4)

200 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4

pH 7,2-7,4

200 mM Na_2HPO_4 - und NaH_2PO_4 -Lösung wurden zunächst getrennt hergestellt, durch Mischung beider wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt.

- 1x PBS

130 mM NaCl

10 mM Na_xPO_4

pH 7,2

- 3x PBS

390 mM NaCl

30 mM Na_xPO_4

pH 7,4

- 0,05% Agarose in 1x PBS-Lösung

Materialien:

- Cellulosenitrat-Stützfilter 8 μm (Sartorius, Goethingen, FRG)
- Polycarbonatfilter 0,2 μm , weiß (Millipore, Eschborn, FRG)

Das Vakuumfiltrationsgerät bestand aus:

- dem Filteraufsatz
- der Glasfritte für Filter mit \varnothing 25 oder 47 mm
- dem Filterhalter
- und einer Saugflasche.

Die Absaugvorrichtung bestand aus:

- einer Membranvakuumpumpe (Vakuubrand Typ MZ 2C, $1,7 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$, Wertheim, FRG) mit Synchro-Abscheider und Emissionskondensator.
- einem Steuergerät (Vakuubrand Typ CVC 2) mit elektromagnetischem Saugleitungsventil geeignet für eine Zweipunktkontrolle der Saugleistung.
- Zur Probennahme im Feld diente eine Handvakuumpumpe (Nalgene, Rochester, USA) mit Manometer.

B.2.2. Fixierung von Zellen im Filterturm auf Polycarbonatfiltern

Diese Methode wurde angewandt, um eine Konzentrierung der Wasserproben ohne Zentrifugation zu erreichen. Die Konzentrierung ist nötig, da die Zellzahlen im Freiwasser der untersuchten Ökosysteme mit ca. 1×10^5 - 1×10^6 ml⁻¹ relativ gering waren.

Durchführung:

Zuerst wurde ein Cellulosenitrat-Stützfilter auf den Filterhalter gelegt, dieser gewährleistete, daß der Abscheidefilter durch das Vakuum nicht gewellt wurde. Die Polycarbonatfilter wurden dann so auf den Stützfilter plaziert, daß sich die Organismen nach der Filtration auf der glänzenden Seite befinden. Ein Aliquot von ca. 5 ml (1-100 ml) Umweltprobe wurden in den Filteraufsatz eingefüllt und mit einem leichten Unterdruck von 100-200 mbar durch den Polycarbonatfilter gesaugt. Die Fixierung erfolgte durch ein Übersichten der Filter im Filterturm mit 4 ml 4% PFA-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur (um Kontaminationen durch die Luft zu vermeiden, wurde der Filteraufsatz abgedeckt). Anschließend wurde die PFA-Lösung durchgesaugt. Nach dem Waschen des Filters mit 4 ml 1x PBS und 4 ml H₂O_{bidest} wurde der Filter bei RT getrocknet und bei -20°C gelagert.

Alternativ wurde das Seewasser in 50 ml Polypropylenröhrchen (Greiner-Röhrchen, Greiner, Frickenhausen, FRG) mit 1/3 (v/v) Formalin (Merck, Darmstadt, FRG) versetzt und bei 4°C für 1 h bis ü.N. fixiert. Anschließend wurden entsprechende Aliquots auf Polycarbonatfiltern, wie oben beschrieben konzentriert.

B.2.3. Fixierung auf Objektträgern

Durchführung:

Die auf den Objektträger aufgebrachten Zellen (B.1.2.1.) wurden bei 46°C luftgetrocknet, mit 4% PFA-Lösung überschichtet und 1 h bei RT in einer feuchten Kammer fixiert. Nach dem Waschen des OT mit 1x PBS erfolgte das Dehydratisieren und Nachfixieren durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 3 min in 50, 80 und 96% EtOH).

B.2.4. Fixierung von Zellsuspensionen

Vorfixierung:

Die angereicherten Zellen (B.1.2.2.) wurden vorsichtig in ein 2 ml ERG überführt und sanft mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, FRG) abzentrifugiert (9000 rpm, 5 sec). Nach dem vorsichtigen Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 0,5 ml 1x PBS vollständig resuspendiert und anschließend 1,5 ml (3 Vol) 4% PFA - Lösung dazugegeben. Die Vorfixierung erfolgte über Nacht bei 4°C.

Endfixierung:

Anschließend wurden die Zellen durch Abzentrifugieren (9000 rpm, 5 sec) und Resuspendieren in 1 ml 1x PBS gewaschen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren (9000 rpm, 5 sec) wurden die Zellen in 250 μ l eines 1 : 1 Gemisches aus 1x PBS / EtOH resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Achromatium oxaliferum:

Die so fixierten *Achromatium* Zellen wurden sofort auf gelatinebeschichtete Objektträger (B.11.1.) getropft und bei 46°C luftgetrocknet. Nach dem vollständigen Eintrocknen wurde jedes Feld mit 30 μ l Agarose-PBS-Lösung überschichtet und ü.N. bei Raumtemperatur getrocknet. Die so erhaltenen OT wurden durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 3 min in 50, 80 und 96 % EtOH) dehydratisiert und nachfixiert.

B.3. Medien, Bakterienanzucht und Stammhaltung

B.3.1. Medien

Medien wurden mit H₂O_{dest} hergestellt. Für Platten wurden 15 g/l Agar (DIFCO Bacto[®]-Agar) zugegeben. Autoklaviert wurde bei 121°C und 1,013 x 10⁵ Pa Überdruck für 20 min.

- dYT - Medium:

Caseinhydrolysat		16 g
Hefeextrakt		10 g
Glukose		2 g
NaCl		5 g
H ₂ O _{dest}	ad	1 l pH 7,4

Um dYT-Ampicillin - Medien zu erhalten, wurde dem dYT-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf < 50°C eine Ampicillinlösung (Ampicillin in 50% eiskalter Ethanolösung) bis zur Endkonzentration von 100 mg Ampicillin pro Liter Medium zugegeben.

B.3.2. Bakterienanzucht

Rekombinante *Escherichia coli* Zellen wurden nach der Transformation (B.6.1.) über Nacht bei 37°C angezogen. Zur Plasmidisolation (B.6.2.) wurden die Klone in Flüssigmedium ebenfalls bei 37°C ü.N. angezogen.

B.3.3. Stammhaltung

Alle Klone wurden auf dYT-Ampicillin Platten bei 4°C aufbewahrt und alle zwei Monate überimpft.

B.4. Nukleinsäureisolierung

B.4.1. Isolierung nach Massana et al., 1997 und Schmidt et al., 1991, modifiziert

Lösungen:

- Lyse-Puffer (pH 8,0)
 - 40 mM EDTA
 - 50 mM Tris-HCl
 - 0,75 M Sucrose
- 10% CTAB in 0,7 M NaCl
- 10% SDS
- 5 M NaCl
- Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 w/v) (Sigma, Deisenhofen, FRG)
- Proteinase K-Lösung (3 mg Proteinase K (Boehringer, Mannheim, FRG) in 400 µl Lyse-Puffer lösen)
- Lysozym 109000 U/mg (Fluka, Buchs, CH)

Durchführung:

Die Filter in 50 ml Polypropylenröhrchen (Greiner-Röhrchen, Greiner, Frickenhausen, FRG) überführen und auf Eis auftauen lassen. Es werden 4,5 ml des Lyse-Puffers zugegeben und 5-10 min geschüttelt. Anschließend Proteinase K-Lösung und 600 μ l 10% SDS zugeben und für 2 h bei 60°C inkubieren. Lysat in ein neues Röhrchen überführen und die zurückgebliebenen Filter mit 2 ml Lyse-Puffer für 10 min inkubieren. Zu den vereinigten Lösungen 1,3 ml 5 M NaCl geben und mixen. 930 μ l 10% CTAB in 0,7 M NaCl zugeben und für 20 min bei 65°C inkubieren. Danach 1 VT (ca. 10 ml) Chloroform-Isoamylalkohol zugeben, mixen und abzentrifugieren (9.000 g, 15 min, 4°C). Wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführen und nach Zugabe von 0,6 VT Isopropanol 30 min bei RT fällen. Anschließend abzentrifugieren (10.000 g, 15 min, RT) und Pellet mit 70% EtOH waschen. Pellet im Vakuum trocknen und DNA in 100 μ l PCR-Wasser (Sigma, Deisenhofen, FRG) aufnehmen.

Die so erhaltene DNA wurde anschließend mit einem kommerziellen DNA Reinigungs-Kit (QIAprep Spin Miniprep-Kit, Qiagen, Hilden, FRG) nach Herstellerangaben nochmals aufgereinigt.

B.4.2. Isolierung nach Zhou et al., 1996

Verwendete Lösungen:

- DNA-Extraktionspuffer (pH 8,0)
 - 100 mM Tris-HCl
 - 100 mM EDTA
 - 100 mM Na-Phosphat
 - 1,5 M NaCl
 - 1 % CTAB
- Proteinase K (10 mg/ml)
- Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 w/v)
- 20% SDS
- 70% Ethanol

Durchführung:

Die geernteten bzw. abzentrifugierten Zellen wurden in 675 μl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und 5 μl Proteinase K zugegeben. Das Gemisch wurde im Horizontalschüttler bei 225 U/min für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach der Zugabe von 75 μl 20% SDS wurde 2 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (alle 20 min wenden). Abzentrifugieren bei 6.000 g, 10 min, RT und den Überstand in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführen. Die Pellets wurden noch zweimal wie folgt behandelt: Zugabe von 225 μl Extraktionspuffer und 25 μl 20% SDS. Anschließend 10 sec vortexen und 10 min bei 65°C inkubieren. Danach abzentrifugieren bei 6.000 g, 10 min, RT und die Überstände vereinigen. Nach der Zugabe von 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch wurde gut gemischt, durch Zentrifugation die wässrige Phase abgetrennt und die DNA mit 0,6 VT Isopropanol 1 h bei RT gefällt. Die DNA wurde bei 16.000 g für 20 min bei RT abzentrifugiert und das Pellet mit eiskalten 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 100 μl PCR-Wasser aufgenommen.

B.5. Amplifizierung von ribosomalen RNA-Genen (rDNA) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Ehrlich *et al.*, 1989) stellt ein enzymatisches Verfahren zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Abschnitten dar. Oligonukleotid-Primer, die den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren, binden spezifisch an die komplementären Sequenzen auf den Matrizensträngen und werden im Elongationsschritt am 3'-Ende verlängert. Die Reaktion umfaßt drei Schritte:

1. Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA.
2. Annealing der Primer an die durch ihre Sequenz vorgegebenen spezifischen Bindungsstellen auf der DNA.
3. Elongation, d.h. Verlängerung der 3'-Enden der gebundenen Primer durch eine DNA-Polymerase und dadurch Bildung eines neuen Doppelstranges

Durch die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase ist es möglich, einen kontinuierlichen Prozeß auszuführen. Da die in einem Zyklus synthetisierten DNA-Kopien als Matrizen im nächsten Zyklus zur Verfügung stehen, wächst die Kopienzahl exponentiell. Bereits geringste Ausgangsmengen an DNA können dadurch zu ausreichenden Mengen für weitere Arbeitsschritte vervielfältigt werden.

B.5.1. PCR

Für alle PCR-Reaktionen wurde das neuentwickelte Kapillar-PCR-Gerät Rapidcycler™ von Idaho Technology (Idaho Falls, USA) verwendet. Hierbei wird der Reaktionsansatz nicht wie üblicherweise in ein ERG eingefüllt, sondern in längliche Glaskapillaren. Zusammen mit der Verwendung einer Lichtquelle als Wärmelieferant kommt es zu einer wesentlich effizienteren, da exakteren und schnelleren, Thermisierung der Reaktionsprobe, als bei der konventionellen Technologie. Verglichen mit einer konventionellen PCR verläuft die gesamte Reaktion bei gleicher Zyklenzahl ca. 5 mal schneller. Als Material zur Amplifikation wurde die gereinigte, hochmolekulare DNA aus B.4. verwendet.

Die benutzten Primer zur fast vollständigen Amplifikation der 16S-rDNA sind in Tabelle B.2. aufgelistet.

Lösungen:

- BSA-Lösung (10x Lösung, Rinderserumalbumin, Hirschmann, München, FRG)
- 10x Puffer mit BSA - 20 mM MgCl₂ (Hirschmann, München, FRG)
- Nukleotide (Serva, Deisenhofen, FRG)
 - 100 μM/μl dATP
 - 100 μM/μl dCTP
 - 100 μM/μl dGTP
 - 100 μM/μl dTTP
 - Herstellung einer 2 mM Nukleotidlösung
- Taq-Polymerase (Promega, Madison, USA)
- Primer: 10-15 pmol/μl (Interactiva, Ulm, FRG; Biometra, Göttingen, FRG)

Primer	Sequenz (5'-3') ^a	Bindungsstelle in <i>E.coli</i> ^b	Referenz
616V ^c	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	8-27	(Springer <i>et al.</i> , 1993)
630R ^d	CAKAAAGGAGGTGATCC	1529-1545	(Springer <i>et al.</i> , 1993)
GM3 F ^c	AGAGTTTGATCMTGGC	8-24	(Muyzer <i>et al.</i> , 1995)
GM4 R ^d	TACCTTGTTACGACTT	1492-1507	(Muyzer <i>et al.</i> , 1995)
ACH65F	AACGCGAAAGGGGCA	65-81	(Glöckner <i>et al.</i> , 1999)

Tabelle B.2.: PCR Primer für die fast vollständige Amplifikation der 16S-rDNA

^a M: A/C Y: C/T K: G/T. ^b Numerierung nach Brosius *et al.*, 1981. ^c V/F = Vorwärtsprimer (bindet an DNA-Strang, der komplementäre Sequenz zu 16S-rRNA besitzt). ^d R = Rückwärtsprimer (bindet an DNA-Strang, der gleiche Sequenz wie 16S-rRNA besitzt)

Durchführung:

• Reaktionsansatz

10x BSA	5 μ l
20 mM MgCl ₂	5 μ l
Nukleotidlösung	5 μ l
Vorwärtsprimer	1 μ l
Rückwärtsprimer	1 μ l
DNA	x μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 50 μ l
DNA Taq-Polymerase	3 Units

Der Reaktionsansatz wird mit Hilfe von Kapillarkräften in eine entsprechend große Glaskapillare aufgezogen. Letztere wird an beiden Ende zugeschmolzen und dann in die entsprechende Haltevorrichtung am Rapidcycler™ gesteckt. Ist die Abdichtung unvollständig kann dies sofort beim ersten Denaturierungsschritt am Austreten der Flüssigkeit aus der oberen Kapillarspitze erkannt werden. Die Programmierung der Reaktionszyklen zeigt Tabelle B.3..

Reaktionsphase	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94°C	20 sec	1
Denaturierung	94°C	15 sec	} 35
Annealing	44-52°C	20 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	1

Tabelle B.3.: Programmierung des Rapidcycler™

Der Slope Wert (Maß für den Geschwindigkeitsgrad der Abkühl- bzw. der Aufheizphase) betrug immer 9,0. Nach Durchlauf aller Zyklen wurden die Kapillaren an einem Ende aufgebrochen und der Reaktionsansatz in ein ERG übergeführt.

B.5.2. Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der Amplifikationseffizienz wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt.

Lösungen:

- Ladepuffer (5x) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
 - 0,05% (w/v) Bromphenolblau
 - 40% (w/v) Saccharose
 - 100 mM EDTA
 - 0,5% (w/v) Natriumlaurylsulfat
 - pH 8,0
- 100x Elektrophoresepuffer (TAE, Gebrauchslösung mit H₂O_{dest} 1:100 verdünnen)
 - 4 M Tris
 - 1 M Natriumacetat
 - 0,1 M EDTA
 - pH 8,0 mit Eisessig einstellen

- Lambda-Standard HindIII-verdaut (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)

Bande	1	2	3	4	5	6	7	8
Größe (bp)	23130	9416	6557	4361	2322	2027	564	125

Tabelle B.4: Größen der durch HindIII-Restriktion entstandenen Lambda-Banden

- „1 KB-ladder“-Standard (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)

Bande	1 ¹	2	3	4	5	6	7	8
Größe (bp)	6108	5090	4072	3054	2036	1636	1018	506

Tabelle B.5: Größen der KB-ladder Banden

- „Low-DNA-Mass-Ladder“-Standard (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Agarose (Seakem LE) (FMC Bioproducts, Biozym, Hessisch Oldendorf, FRG)
- Ethidiumbromidlösung 0,5 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen, FRG) in H₂O

¹ Oberhalb der 6108bp Bande laufen noch Banden mit 7126bp, 8144bp, 9162bp, 10180bp, 11198bp und 12216bp Größe

Durchführung:

1 g Agarose wurden in 100 ml 1× TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst (1% [w/v]) und in die Gelwanne der nach Herstellerangaben zusammengebauten Elektrophoresekammer (Gibco/BRL Apparatur, Typ H3, 11x14 cm, 100 ml Gelvolumen) gegossen. Nach dem Festwerden des Gels wurde die Kammer mit 1× TAE-Puffer aufgefüllt, der Kamm gezogen und 5 µl-Aliquots der zu untersuchenden PCR-Amplifikationsprodukte, vermischt mit 4 µl Ladepuffer in die Geltaschen einpipettiert. Zur Größenabschätzung der Amplifikate wurde zusätzlich ein Längenstandard (Lambda- oder „1 KB-ladder“-Standard) aufgetragen. Um auch die Menge der erhaltenen Amplifikate bestimmen zu können, wurde statt dessen „Low-DNA-Mass-Ladder“-Standard verwendet. Aufgetrennt wurde bei einem Strom von 150 mA ca. 1 h. Anschließend wurde das Agarosegel 15 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und dann unter UV-Beleuchtung (314 nm; UV-Transilluminator, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, Frankreich) dokumentiert (Cybertech CS1 Digital Kamera mit Image Capture Computer, Cybertech, Berlin, FRG).

B.5.3. Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Zeigte sich bei der Analyse der Amplifikate (B.5.2.) nur die gewünschte Bande bei ca. 1500 bp und keine weiteren Banden wurde der gesamte PCR-Ansatz mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden, FRG) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Wenn mehr als eine Bande bei der Analyse sichtbar waren, wurde nur diejenige Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die sich im Vergleich zu dem mitgelaufenen Standard bei ca. 1500 bp befand. Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in ein steriles 2 ml ERG überführt. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung wurden die DNA-Reinigungskits Magic Prep (Serva, Heidelberg, FRG), QIAquickGel Extraktion-Kit (Qiagen, Hilden, FRG) und Agarose Gel Extraktion-Kit (Boehringer, Mannheim, FRG) verwendet. Bei allen Kits erfolgte die Reinigung und Konzentrierung nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Reinigungseffizienz überprüft, indem 1/10 Vol. des Gesamtamplifikats mit 4 µl Auftragspuffer vermischt wurden und einer qualitativen, agarosegelelektrophoretischen Analyse (B.5.2.) unterzogen wurde.

B.6. Klonieren der PCR-Amplifikate und Plasmidisolation

B.6.1. Klonierung der PCR-Amplifikate

Verwendet wurden die TA-Vektor Klonierungskits der Firmen Promega (Promega, Madison, USA) und Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Die T-Vektor-Klonierung macht sich die Eigenheit der Taq-Polymerase zunutze, bei der PCR an die 3'-Enden des DNA-Stranges „template“-unabhängig ein Desoxyadenosin anzuhängen. Dadurch besitzen die PCR-Amplifikate, welche mit der Taq-Polymerase erzeugt werden, ein überhängendes 3'-Ende. Dies erklärt die Schwierigkeiten, die bei der blunt-end Ligation von Taq-Polymerase erzeugten PCR-Amplifikaten auftreten können.

Der T-Vektor wurde nun innerhalb seiner „multiple cloning site“ mit einem Restriktionsenzym geschnitten. An die freien 3'-Enden wurde ein Thymidinrest angehängt, was (1) eine spontane Religation verhindert und (2) die Ligation mit einem Taq-Polymerase replizierten PCR-Amplifikat fördert.

Das PCR-Amplifikat, welches beidseitig an den 3'-Enden ein Desoxyadenosin besitzt, ligiert nun spezifisch mit dem T-Vektor. Auf Grund des Fehlens der Restriktionsstelle findet die Gegenreaktion (die Restriktion) nicht statt, eine Dephosphorylierung wie bei anderen Klonierungssystemen ist demnach nicht notwendig.

B.6.1.1. pGEM T-Vektor von Promega

Materialien:

- T-Vektor Kit (Promega, Madison, USA)
 - pGEM-T-Vektor
 - T4 DNA-Ligase (1 Unit/ μ l)
 - T4 DNA-Ligase 10x Puffer
- *E. coli* Stamm JM109 hochkompetente Zellen
(Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *supE44*, Δ (*lac-proAB*), *relA1*, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI*^qZ Δ M15], λ^-)
Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert. Die restlichen Bestandteile des Kits wurden bei -20°C gelagert
- dYT_{Amp}-Agarplatten (Konzentration: 100 mg Ampicillin/l)

- X-Gal (in DMSO gelöst, Konzentration: 20 mg/ml DMSO, Promega, Madison, USA)
- IPTG (in H₂O_{bidest} gelöst; Konzentration: 200 mg/ml) (Promega, Madison, USA)
- PCR-Produkt (B.B.5.)

Das Verhältnis von Insert zu Vektor sollte 1:1 sein, wobei auch größere Schwankungen von 8:1 bis 1:8 sich nicht zu stark auf die Ligationseffizienz auswirken. 2 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden mit 4 µl Auftragspuffer vermischt und zusammen mit 1 µl Vektor DNA (vermischt mit 4 µl Auftragspuffer) nebeneinander auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Nach Durchführung einer qualitativen horizontalen Agarosegelelektrophorese (B.5.2.) konnte das Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor DNA grob geschätzt werden.

Theoretische Berechnung der Insertkonzentration:

$$\frac{\text{ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis Insert : Vektor} = \text{ng des Inserts}$$

Durchführung:

- Ligation

Das ERG mit der pGEM-T Vektor DNA wurde bei 14.000 U/min und 30 sec lang zentrifugiert. Folgender Reaktionsansatz wurde in ein 0,5 ml ERG pipettiert und ü.N. bei 15°C inkubiert:

T4 DNA-Ligase 10x Puffer	1 µl
pGEM-T Vektor	1 µl
PCR-Produkt	x µl
H ₂ O _{bidest}	ad 9 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz in einem PCR-Thermoblock (Hybaid-OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, FRG) für 10 min bei 71°C erhitzt und bis auf RT abgekühlt.

- Transformation

Das ERG mit der ligierten Insert-Vektor-DNA wurde 30 sec bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Die kompetenten Zellen wurden rasch aus dem -80°C Gefrierschrank herausgenommen, sofort auf Eis gelegt und 5 min angetaut. Nach vorsichtigem Mischen

(durch leichtes Schnippen des ERG mit den Fingern), wurden 50 μ l sehr behutsam zusammen mit 2 μ l ligierter DNA in ein 1,5 ml ERG pipettiert. Das ERG wurde wieder leicht durchmischt und 20 min auf Eis plaziert. Anschließend wurden die Zellen in einem auf exakt 42°C vorgewärmten Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und auf Eis 2 min inkubiert. Danach wurden 450 μ l vorgewärmtes, nicht ampicillinhaltiges LB-Medium hinzugegeben, etwas durchmischt und genau 1 h bei 200 U/min und 37°C geschüttelt.

- Plattierung

Auf jede ampicillinhaltige dYT-Agarplatte wurden 40 μ l der X-Gal-Lösung und 4 μ l der IPTG-Lösung ausplattiert und für eine halbe Stunde stehengelassen.

Die 500 μ l Zellsuspension wurde mit einem Drigalskispatel in Mengen von 2 x 100 μ l und 2 x 150 μ l auf die Platten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Platten für eine bessere Ausprägung der weiß/blau Selektion für weitere 24 h bei 4°C gelagert.

Weißer Kolonien (d.h. *E. coli* Kolonien mit einem inserthaltigen Plasmidvektor) wurden mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, auf eine neue Platte übertragen und ü.N. bei 37°C inkubiert (um eventuelle falsch gepickte Kolonien anhand der erneut eintretenden Blaufärbung zu detektieren). Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

B.6.1.2. TA-Klonierungskit von Invitrogen

Materialien:

- Invitrogen original TA-Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)
 - pCRTM 2.1 Vektor
 - 10x Ligationspuffer
 - T4 DNA Ligase
 - 0,5 M β -Mercaptoethanol
 - SOC-Medium
 - Kompetente Zellen (*E. coli*, INV α F['] One ShotTM Competent Cells)
- dYT_{Amp}-Agarplatten (Konzentration: 100 mg Ampicillin/l)
- X-Gal (in DMSO gelöst, Konzentration: 40 mg/ml DMSO)
- PCR-Produkt (B.6.1.1)

Durchführung:

• Ligationsansatz:

10x Ligationspuffer	1 μ l
pCR TM 2.1 Vektor (25 ng/ μ l)	2 μ l
Frisches PCR-Produkt	x μ l
H ₂ O _{bidest}	ad. 9 μ l
T4 DNA Ligase (4 Weiss Units)	1 μ l

Der Ligationsansatz wurde bei 14°C über Nacht inkubiert.

• Transformation

Der Ligationsansatz wurde abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Die bei -80°C gelagerten kompetente Zellen, wurden zum Antauen auf Eis gestellt und nach ca. 3 min wurde 2 μ l 0,5 M Mercaptoethanol dazu pipettiert und durch Umrühren kurz gemischt. Anschließend wurden 2-5 μ l des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen hinzupipettiert und durch vorsichtiges Umrühren vermischt. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis gefolgt von einer exakt 30 sec Inkubation im 42°C warmen Wasserbad. Nach einer weiteren 2 minütigen Inkubation auf Eis wurden 450 μ l SOC Medium zu dem Transformationsansatz hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C für eine Stunde in horizontaler Lage bei 200 U/min geschüttelt. Das Ausplattieren, die Inkubation und Analyse erfolgt wie in B.6.1.1. beschrieben.

B.6.2. Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse**B.6.2.1. Koch-STET-Schnelltest***Lösungen:*

• STET-Puffer

Saccharose (40%)	80 ml
EDTA (0,5 M)	40 ml
Tris/HCl pH 8,0	20 ml
Triton X-100	20 ml
H ₂ O _{dest}	ad 400 ml

• Lysozym (10 mg/ml) (Fluka, Buchs, CH)

• 70% Ethanol

Durchführung:

Weißer Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der bei 4°C gelagerten Agarplatte abgenommen und auf einer neuen dYT_{Amp} Platte etwas großflächiger (Aufteilung der Platte in 12 gleich große Zonen) ausgestrichen. Jedem Klon wurde dabei eine Nummer zugeteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Die gewachsenen Zellen wurden mit einem abgeflammt Spatel abgenommen und jeweils in einem sterilen ERG in 300 µl STET-Puffer suspendiert. Anschließend wurden 10 µl Lysozym dazugegeben und erneut 2 sec gemischt. Es folgte eine 45 sec dauernde Inkubation bei 100°C (Blockheizer, Bachofer, Reutlingen, FRG) mit darauffolgender sofortiger Eiskühlung für 5 min. Anschließend wurde 20 min bei 4°C und 15.000 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit sterilen Zahnstochern entfernt und verworfen und in das ERG 300 µl Isopropanol gegeben. Nach vorsichtigem Mischen und 15 minütiger Inkubation bei RT wurde bei 4°C abzentrifugiert (15.000 U/min, 15 min). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 500 µl 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 15.000 U/min) wurde der Überstand abgegossen und der Restalkohol in der SpeedVac (Bachofer, Reutlingen, FRG) abgedampft. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die qualitative Überprüfung erfolgte mit einer horizontalen Agarosegelelektrophorese (B.5.2.)

B.6.2.2. Plasmidisolierung mit QIAGEN

Materialien:

- QIAprep Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden, FRG)

Durchführung:

Kolonien wurden in Schraubdeckelröhrchen, gefüllt mit 5 ml flüssigen dYT-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 mg/l), angeimpft und bei 37°C ü.N. inkubiert. Die gewachsene Zellsuspension wurde für 10 min bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die erhaltenen Plasmid-DNA wurde in 50 µl PCR-Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die qualitative Überprüfung erfolgte mit einer horizontalen Agarosegelelektrophorese (B.5.2.).

B.6.2.3. Restriktionsanalyse

Materialien:

- *NotI*-Restriktionsenzym mit entsprechendem Puffer (Boehringer, Mannheim, FRG)

Durchführung:

- Reaktionsansatz

Plasmid-DNA (ca. 1 μg)	x μl
<i>NotI</i> -Puffer	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 μl
<i>NotI</i> -Enzym	2 U

Der Reaktionsansatz wurde in ein steriles ERG pipettiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4 μl Auftragspuffer zugegeben und der Gesamtansatz einer horizontalen Agarosegelelektrophorese unterworfen (B.5.2.).

B.7. Nichtradioaktive Sequenzanalyse von DNA-Molekülen nach dem „Cycle-Sequencing-Protokoll“

Die nicht-radioaktive Sequenzanalyse erfolgte nach dem „Cycle-Sequencing-Protokoll“ (bzw. linear amplification sequencing; Murray, 1989), welches eine Kombination aus der Anwendung der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und dem Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNA-Polymerase darstellt. Zwei wesentliche Merkmale unterscheiden das „Cycle-Sequencing“ von einer normalen PCR (Kretz *et al.*, 1994):

1. Der Zusatz von Didesoxynukleotidtriphosphaten
2. Die Verwendung eines einzigen Primers

Beim „Cycle-Sequencing“ kommt es durch die Verwendung eines einzigen Primers zur linearen Amplifikation des gewünschten Produktes. Das Produkt der Reaktion ist ein Gemisch aus unterschiedlich langen Kopien eines Stranges. Die Länge der DNA-Stränge ist davon abhängig, wann ein ddNTP eingebaut wurde. Über eine Polyacrylamidgelelektrophorese können die unterschiedlich langen Stränge auf eine Base genau aufgetrennt werden. Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase bietet folgende Vorteile:

1. Thermostabilität erlaubt Denaturierung der bereits gebildeten Sequenzierprodukte und damit mehrfache Wiederholungen der Reaktionszyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation).
2. Primerverlängerung bei höherer Temperatur und unter Verwendung von 7-deazadGTP führt zu weniger unspezifischen Kettenabbrüchen infolge von Sekundärstrukturen und damit zu einem geringeren Hintergrund (Innis *et al.*, 1988; Peterson, 1988).

B.7.1. Sequenzierung

Materialien:

- Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Quelle
M13 Uni F	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Vektor	GAG
GM1 F	CCAGCAGCCGCGGTAAT	518-534	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
M13 Uni R	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	Vektor	GAG

Tabelle B.6: Für die Sequenzierung verwendete Primer

Durchführung:

Die Sequenzierreaktionen für den LiCor DNA 4000 Sequenzer (MWG-Biotech, Ebersberg, FRG) wurden mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham, Braunschweig, FRG) und den IR-125 Primern (Eastman Kodak Rochester, NY, USA). Absorption: 795 nm, Emission: 833 nm durchgeführt. Die Sequenzierarbeiten wurden von Frau Sibylle Schadhauser am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Technischen Universität München ausgeführt.

Die Reaktionen für den ABI 373S (Perkin Elmer, Langen, Deutschland) Sequenzer wurden mit dem Applied Biosystems PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und der AmpliTaq-DNA-Polymerase durchgeführt. Diese Sequenzierarbeiten einschließlich des Editierens der Sequenzen wurden durch die Genom Analytik GmbH (GAG) am Umweltforschungs- und Technologiezentrum der Universität Bremen durchgeführt.

B.8. Auswertung der Sequenzdaten und Sondenkonstruktion

Sämtliche in diesem Kapitel aufgeführten Arbeiten wurden mit Hilfe des Programmpakets ARB (Strunk *et al.*) durchgeführt, das zum einen eine erweiterbare Datenbank mit zur Zeit (Oktober 1998) mehr als 10.000 Sequenzeinträgen zur Verfügung stellt, gleichzeitig aber auch alle für die Bearbeitung dieser Sequenzen notwendigen Programme integriert hat. Darüber hinaus beinhaltet ARB Elemente von PHYLIP (Felsenstein, 1981) und fastDNAmI (Maidak *et al.*, 1997), sowie diverse public domain Hilfsprogramme.

B.8.1. Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment) mit ARB_Align

Um phylogenetische Aussagen machen zu können, ist es notwendig, die erhaltenen Sequenzen in das von ARB vorgegebene Alignment bereits bekannter Sequenzen einzupassen. Hierbei werden die Basen in den Sequenzen so angeordnet, daß sich homologe Basen an den gleichen Stellen befinden. In den variablen Sequenzbereichen dienen Sekundärstrukturanalysen oder kleinere Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung bei der Bestimmung homologer Basen. Das Unterprogramm ARB_Align übernimmt diese Funktion nach dem Import der Sequenzen automatisch. Offensichtliche Unstimmigkeiten wurden manuell anhand ausgewählter nah verwandter Sequenzen korrigiert. In diesem Arbeitsschritt wurden auch Konsensussequenzen der einzelnen, aus den Sequenzierreaktionen mit den verschiedenen Primern stammenden Teilsequenzen erstellt.

B.8.2. Rekonstruktion von Stammbäumen

Die Darstellung von phylogenetischen Verwandtschaften erfolgt meist in Form von Stammbäumen. Neue Sequenzen wurden zunächst nach dem „Parsimony“-Kriterium (Fitch, 1975) in einen der bestehenden Bäume eingerechnet. Die Besonderheit dieser Methode bei ARB ist, das eine Veränderung der Topologie des Ausgangsbaumes nicht erlaubt wird (ARB_Parsimony). Neue Sequenzen werden – ohne den gesamten Baum neu zu rekonstruieren – an den Stellen integriert, wo ihre nächsten Verwandten zu finden sind. Dies liefert eine schnelle erste Einordnung der Sequenzen, ohne der Gefahr ausgesetzt zu sein, Verwandtschaftsverhältnisse in bereits etablierten und optimierten Bäumen durch Einfügen

einzelner Sequenzen fälschlicherweise zu zerstören. Diese Gefahr besteht im besonderen Maße für das Einrechnen von Teilsequenzen. Ausgehend von dieser ersten Einordnung wurden dann Sequenzen ausgewählt, mit denen Teilbäume für die genauere Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der neuen Organismen rekonstruiert wurden. Um den Einfluß hochvariabler Bereiche einzuschränken, und um die Stabilität der Bäume einschätzen zu können, wurden Filter verwendet, die in unterschiedlichem Ausmaß variable Bereiche der Sequenzen bei diesen Rekonstruktionen ausschließen. Die Berechnungen erfolgten mit Distanzmatrix- (Neighbourjoining-Methode; Saitou und Nei, 1987) nach Jukes-Cantor-Korrektur (Jukes und Cantor, 1969), Maximum Parsimony- (Fitch, 1975) und Maximum-Likelihood Verfahren (Felsenstein, 1981). Die in dieser Arbeit gezeigten Bäume sind Konsensusbäume auf der Grundlage des Maximum Likelihood-Baumes und aller weiteren verwendeten Filter und Verfahren. Unstimmigkeiten unter den Verfahren werden durch Mehrfachverzweigungen angezeigt. Näheres zu diesen Methoden findet sich bei Ludwig *et al.*, 1998.

B.8.3. Konstruktion von 16S-rRNA gerichteten Sonden mit ARB_Probe_Design und ARB_Probe_Match

Die Konstruktion von spezifischen Oligonukleotidsonden auf der Basis von 16S-rRNA Sequenzdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Funktion „Probe_Design“ aus dem ARB Programmpaket. Die Spezifität konstruierter Oligonukleotidsonden gegenüber Organismen, deren 16S-rRNA Sequenz bekannt ist, wurde durch die Funktion „Probe_Match“ in ARB überprüft.

B.9. Schmelzpunktbestimmung für Oligonukleotidsonden mittels *in-vitro*-Transkription

Die meisten 16S-rDNA Sequenzen, die durch Klonierung aus natürlichen Systeme isoliert wurden, zeigen Unterschiede zu den phylogenetisch nächstverwandten kultivierten Vertretern ihrer Gattung oder Art. Dadurch ergibt sich das Problem, die optimalen Hybridisierungsbedingungen einer neu entwickelten klonspezifischen Sonde zu ermitteln. Es hat sich gezeigt, daß Schmelzkurven, die auf der Hybridisierung von DNA-Sonden mit RNA Transkripten basieren, eine gute Annäherung an das Schmelzverhalten von DNA-Sonden mit nativer rRNA darstellen (Polz und Cavanaugh, 1997). Um diese RNA Transkripte aus den 16S-rDNA

Klonen zu erhalten, wurde eine *in-vitro*-Transkription durchgeführt. Die Sonden selbst wurden radioaktiv markiert.

B.9.1. Radioaktive Markierung der Sonden

Materialien:

- Unmarkierte Oligonukleotide (Interactiva, Ulm, FRG)
- Polynukleotidkinase mit PNK-Puffer (New England Biolabs, UK)
- $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (6000 mCi/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig, FRG)
- NAP[®]5 Columns (Sephadex[®]-G-25, Pharmacia-Biotech, Uppsala, Schweden)
- TE-Puffer

Durchführung:

Die Endmarkierung erfolgte mit der Polynukleotidkinase (PNK), die das 5' Ende des Oligonukleotids phosphoreliert.

Markierungsansatz:

Oligonukleotid	4 μl
H ₂ O	19 μl
PNK-Puffer	3 μl

Ansatz 5 min bei 70°C denaturieren und dann sofort auf Eis stellen.

Zugabe von:

$\gamma^{32}\text{P}$ ATP	3 μl
Polynukleotidkinase	1 μl

Ansatz 30 min bei 37°C inkubieren.

Während der Inkubation wurde die NAP[®]5 Columns mit TE-Puffer äquilibriert und anschließend den Markierungsansatz direkt auf die Säule auftragen. Mit 470 μl TE wurde der Rand der Säule nachgespült und die markierte Sonde mit 1 ml TE in eine 20 ml Vial eluiert.

B.9.2. In-vitro-Transkription

Materialien:

- Gereinigte Plasmid-DNA (B.6.2.2)
- SP6/T7 rRNA Transkriptionskit (Boehringer, Mannheim, FRG)
- Restriktionsenzyme *NotI* und *ApaI* mit den dazugehörigen Puffern (Boehringer, Mannheim, FRG)
- DNase aus Kit
- 2% Glutaraldehyd verdünnt in 0,05 M Na_xPO_4 -Puffer
- Bromphenolblau-Lösung (1 μl Bromphenolblau in 50 ml PCR-Wasser)
- Radioaktiv markierte Sonden (B.9.1.)

Durchführung:

Die gesamten gereinigten Plasmid-DNAs (50 μl) wurden zuerst mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert. Die Auswahl des Restriktionsenzym ist von der Orientierung des Inserts im Plasmid abhängig, welche wiederum den verwendeten Promotor bestimmt. Die Auswahl sollte so erfolgen, daß die Schnittstelle immer am 3'-Ende des 16S-rDNA Inserts liegt. Der gesamte Restriktionsansatz wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, FRG) gereinigt und in 30 μl PCR-Wasser aufgenommen. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (B.5.2.). Anschließend erfolgte die Transkription mit dem T7/SP6 Transkriptionskit nach Angaben des Herstellers. Zur Entfernung der DNA wurde der Ansatz nach der Transkription mit DNase behandelt (15 min, 37 °C) und die erhaltene RNA auf einem 4% Polyacrylamidgel überprüft. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde auf 10 ng/ μl eingestellt und zur Denaturierung 5 μl Probe mit 15 μl 2% gepuffertem Glutaraldehyd 10 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 30 μl Bromphenolblau-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 50 μl gebracht und in einer Minifold II slot blot Apparatur (Schleicher Schuell, Dassel, FRG) in Triplikaten auf eine Nylon Membran (Magna Charge, Micron Separations, Westboro, USA) geblottet. Die so präparierten Membranen wurden mit den radioaktiv markierte Sonden bei aufsteigender Formamidkonzentration (0-50% in 10% Schritten) jeweils 1,5 h bei 46°C hybridisiert und anschließend 30 min bei 48°C gewaschen. Die Hybridisierungs- und Waschpuffer waren identisch mit den für die *in situ*-Hybridisierung verwendeten Puffern (B.11.2.).

Sondensignale wurden mit einem Phosphor Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) quantifiziert und ausgewertet.

B.10. Herstellung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide für die *in situ*-Hybridisierung

Die nach dem Phosphoramidit-Verfahren (Beaucage und Caruthers, 1981) hergestellten Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg, FRG) wurden im letzten Schritt der Festphasensynthese an ihren 5'-Enden über einen Alkyl-Abstandshalter mit einer zusätzlichen, primären Aminogruppe versehen (5'-Amino-Modifizier C6: trifluoroacetylhexyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit; Glen-Research, USA). Über diese zusätzlich eingeführte Aminogruppe wurden die Oligonukleotide kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Digoxigenin markiert. Hierbei reagieren isothiocyanatgekoppelte Farbstoffe mit der Aminogruppe unter Bildung einer Thioharnstoffbindung, während bei der Umsetzung der N-Hydroxysuccinimidester eine Säureamidbindung gebildet wird.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoffe:

- FLUOS:** 5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer, Mannheim, FRG); Absorptionsmaximum bei 494 nm; Emissionsmaximum bei 518 nm; $\epsilon = 7,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- TRITC:** Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat (Molecular Probes Inc., Eugene, OR; Lambda, Graz, AUS); Absorptionsmaximum bei 537 nm; Emissionsmaximum bei 566 nm; $\epsilon = 1,07 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- TAMRA/CT:** 5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester (gemischte Isomere; Molecular Probes Inc., USA); Absorptionsmaximum bei 537 nm; Emissionsmaximum bei 566 nm; $\epsilon = 0,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- Cy3:** 5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarboyanin-N-hydroxy-succinimidester (Cy3.18, Biological Detection Systems, Pittsburgh, USA); Absorptionsmaximum bei 554 nm, Emissionsmaximum bei 570 nm; $\epsilon = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

B.10.1. Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Materialien:

- Carbonatpuffer

1 M NaHCO₃/Na₂CO₃; pH 9,0

Jeweils 1 M NaHCO₃- und Na₂CO₃-Lösungen wurden getrennt angesetzt und etwa im Verhältnis 9:1 gemischt, bis daß der angegebene pH-Wert erreicht wurde.

Durchführung:

100 µg des zu markierenden Oligonukleotids wurden mit H₂O_{bidest} auf 175 µl aufgefüllt und mit 50 µl Carbonatpuffer versetzt. Aliquots der Farbstoffe FLUOS und TRITC bzw. TAMRA wurden in Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, FRG) gelöst (5 mg/ml). Cy3 wurde nach Herstellerangaben verwendet. 25 µl dieser Fluoreszenzfarbstofflösungen wurden zu den gepufferten Oligonukleotidlösungen pipettiert, gründlich gemischt und 12 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

B.10.2. Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffs

Die Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffs erfolgte durch Größenausschlußchromatographie mit Sephadex G-25 Säulen (NAPTM-5; Pharmacia Biosystems, Freiburg, FRG).

Durchführung:

Nach Abgießen der Konservierungsflüssigkeit wurden die Säulen dreimal mit H₂O gespült, und anschließend der mit 250 µl H₂O versetzte Markierungsansatz aufgetragen. Dann wurde mit je 200 µl H₂O eluiert und dabei die Fraktionen 2-7 aufgefangen. Diese Fraktionen wurden unter Vakuum einrotiert (SpeedVac, Bachofer, Reutlingen, FRG). Alle 6 Fraktionen wurden anschließend in insgesamt 100 µl steriles H₂O_{bidest} aufgenommen.

B.10.3. Abtrennung des unmarkierten Oligonukleotidanteils

Durch das unterschiedliche Laufverhalten in der Polyacrylamidgelelektrophorese konnte der unmarkierte Oligonukleotidanteil vom markierten Oligonukleotidanteil abgetrennt werden.

- Acrylamidstammlösung (15%)

Acrylamid	14,25 g
Bisacrylamid	0,75 g
10× NN-Puffer	10 ml
H ₂ O	ad 100 ml
- 10% Ammoniumperoxodisulfat- (APS-) (Merck, Darmstadt, FRG) Lösung (w/v) in H₂O
- N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Auftragspuffer: 20% (w/v) Saccharose in H₂O, sterilfiltriert
- 10× No-Name- (NN-) Puffer

Tris	162,0 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	10,3 g
H ₂ O	ad 1 l
- TE-Puffer

10 mM Tris-HCl	
1 mM EDTA	
pH 7,2	
- Blockgellösung

Acrylamidstammlösung	5 ml
APS-Lösung	70 µl
TEMED	10 µl
- Trenngellösung

Acrylamidstammlösung	45 ml
APS-Lösung	360 µl
TEMED	36 µl

Durchführung

Das Gel wurde zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten in einer senkrecht stehenden Elektrophoreseapparatur (Hoefer SE400, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) gegossen. Zu Beginn wurde ein Gelblock als Auslaufschutz gegossen. Nach dessen Polymerisation (ca. 10 min) wurde das Trenngel gegossen und der

Auftragskamm eingesetzt. Nach einstündiger Polymerisation wurde der Kamm gezogen und in beide Pufferkammern je 250 ml 1x NN-Puffer als Laufpuffer eingefüllt. Die Geltaschen wurden durch gründliches Spülen mit 1x NN-Puffer von Gelresten befreit. Die Proben wurden nun mit je 50 μ l Auftragspuffer versetzt in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 300-400 V und 30 mA für ca. 2 h. Das Gel wurde anschließend aus der Apparatur herausgenommen, in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf eine F254-Dünnschichtplatte mit fluoreszierender Beschichtung gelegt. Unter Beleuchtung mit einer UV-Handlampe (Bachofer, Reutlingen, FRG) bei zwei verschiedenen Wellenlängen konnte eindeutig zwischen den markierten und den unmarkierten Oligonukleotiden unterschieden werden. Bei 254 nm wirft das Oligonukleotid einen Schatten auf die fluoreszierende Platte, während bei 365 nm der Farbstoff leuchtet. Zur Dokumentation und als Hilfe für den anschließenden Arbeitsschritt wurden die Banden unter UV auf die Folie eingezeichnet. Das markierte Oligonukleotid wurde reisoliert, indem seine Bande mit einer durch Ethanol sterilisierten Rasierklinge ausgeschnitten und mit einem sterilen Zahnstocher in ein ERG gegeben wurde. Die Gelstücke wurden mit einer abgeschmolzenen Pipettenspitze zerkleinert und zur Elution mit 1 ml TE-Puffer versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde zentrifugiert (3 min, 14.000 U/min, RT), der Überstand abgehoben und erneut mit 1 ml TE-Puffer versetzt. Die zweite Elutionsphase erfolgte durch 12 stündiges Schütteln bei 4°C. Nach anschließender Zentrifugation, Überstandsabnahme und Zugabe von 1 ml TE-Puffer erfolgte die dritte Elutionsphase (3 h Schütteln bei 4°C). Die Eluate wurden schließlich vereinigt.

B.10.4. Abtrennung von Salzen

Zur Abtrennung von Gelresten, störenden Salzen und zur Konzentrierung der Sonden wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie mit NensorbTM-20-Säulen (Du Pont, Bad Nauheim, FRG) durchgeführt.

Materialien:

- Triethylaminpuffer (TEA-Puffer)

Tris/HCl	0,1 M
EDTA	1 mM

nach dem Autoklavieren 0,14% Triethylamin (v/v) zugegeben und den pH mit HCl auf 7,7 einstellen

- 50% Methanol (v/v) in H₂O_{bidest}

Durchführung:

Die Säule wurde mit 2 ml Methanol vorgespült und anschließend mit 2 ml TEA-Puffer äquilibriert. Zu den vereinigten Eluat wurden 500 μ l TEA-Puffer gegeben und nach gründlichem Mischen auf die Säule aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit 2 ml TEA-Puffer wurde das markierte Oligonukleotid mit 1 ml 50%igen Methanol eluiert. Die Tropfen 3-10 enthielten meist die scharf zusammenlaufende, farbige Bande und wurden mit einem ERG abgefangen. Anschließend wurde das Methanol unter Vakuum abgezogen (SpeedVac, Bachofer, Reutlingen, FRG). Die getrockneten Niederschläge wurden in 50 μ l sterilem H₂O_{bidest} oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

B.10.5. Quantitative Bestimmung der markierten**Oligonukleotide**

Aliquots der TRITC- und Cy3-markierten Oligonukleotide wurden mit sterilem H₂O und Aliquots der Fluos-markierten Oligonukleotide mit Carbonatpuffer (pH 9,0) im Verhältnis 1:100 verdünnt und im Spektralphotometer (Beckmann Photometer DU 650, München, Deutschland bzw. Shimadzu UV-1202, Duisburg, Deutschland) vermessen. Der Quotient aus Nukleotidabsorption (OD₂₆₀) und Farbstoffabsorption (FLUOS OD₄₉₀; TRITC und Cy3 OD₅₅₀) ermöglicht eine Abschätzung der Markierungsrate. Bei vollständiger Umsetzung ist der gemessene Wert gleich dem Quotienten der beiden Extinktionskoeffizienten, was bei den verwendeten Farbstoffen und einer durchschnittlichen Länge der eingesetzten Oligonukleotide von 18 Basen bei FLUOS und TRITC Werten von ca. 2,5 bis 3 und bei Cy3 von ca. 1 entspricht.

Die Konzentration des Oligonukleotids wurde durch Bestimmung der Absorption bei OD_{260nm} nach folgender Gleichung bestimmt:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 20 \mu\text{g/ml ss DNA}_{\text{Oligonukleotid}}$$

Stammlösungen und auf 50 ng/ μ l verdünnte Arbeitslösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

B.11. Ganzzellhybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

B.11.1. Beschichtung der Objektträger mit Gelatine

Lösungen:

- Gelatine-Lösung
 - 0,1% Gelatine (Sigma, Deisenhofen, FRG)
 - 0,01% Kaliumchromsulfat
 - zum Lösen auf 60°C erhitzen

Durchführung:

Die teflonbeschichteten Objektträger (OT) (6 Aussparungen; Paul Marienfeld, Bad Mergentheim, FRG) wurden mit Haushaltsspülmittel entfettet und mit destilliertem Wasser zweimal gewaschen. Nach dem Lufttrocknen der OT wurden sie langsam in die noch warme Gelatine-Lösung eingetaucht und anschließend drei Stunden an einem staubfreien Ort bei RT getrocknet.

B.11.2. Hybridisierung auf Objektträgern

Lösungen:

- 0,5 M EDTA pH 8,0
- 10% Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung), sterilfiltriert
- 1 M Tris-HCl-Lösung, pH 8,0 mit HCl eingestellt
- 5 M NaCl-Lösung, autoklaviert
- Formamid (Merck, Darmstadt, FRG)
- Hybridisierungspuffer
 - 0,9 M NaCl
 - 20 mM Tris-HCl
 - 0,01% SDS
 - X % Formamid (FA)

Der Hybridisierungspuffer wurde je nach benötigter Stringenz durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Formamid modifiziert. Eine Abschätzung der Dissoziationstemperatur von Oligonukleotiden (Länge zwischen 10 und 50 Nukleotiden) erfolgte mit folgender Formel (modifiziert nach Lathe *et al.*, 1985 und Wahl *et al.*, 1987):

T_d bei Oligonukleotiden mit einer Länge zwischen 10 und 50 Basen:

$$T_d = 81,5 + 16,6 \lg M + 0,4(\%GC) - \frac{820}{n} - 0,5(\%FA)$$

Zeichenerklärung:

T_d	Dissoziationstemperatur in Grad Celsius
M	Molarität der Natriumionen
$\% GC$	Anteil der Guanin und Cytosin an den Gesamtbasen
n	Länge des Hybrids
$\% FA$	Formamidgehalt

• Waschpuffer

- X mM NaCl
- 20 mM Tris-HCl
- 5 mM EDTA (ab 20% FA)
- 0,01% SDS

Die benötigte Stringenz wurde im Waschpuffer durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt. Dadurch konnten große Abfallmengen an Formamid verhindert werden. Bei geringen NaCl-Konzentrationen (ab 20% Formamid im Hybridisierungspuffer) wurde die Zugabe von bis zu 5 mM EDTA im Waschpuffer nötig, da ansonsten bereits Spuren zweiwertiger Kationen die Stringenz durch ihre starke Hybridstabilisierung beeinflussen können. Die NaCl-Konzentration (Tabelle B.7.) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$0,5 \times (\%FA) = -16,6 \log [Na^+]$$

% Formamid bei der Hybridisierung	[Na ⁺] in M	μl 5 M NaCl auf 50 ml
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	0
70	0,007	+ 350 μl EDTA
75	0,005	+ 250 μl EDTA
80	0,0035	+ 175 μl EDTA

Tabelle B.7: Waschpuffer für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen bei 46°C in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers.

Durchführung:

Die Objektträger wurden wie in B.2.3. und B.2.4. beschrieben vorbereitet. Auf jedes Feld des OT wurden 9 μl Hybridisierungspuffer gemischt mit 1 μl des markierten Oligonukleotids (Konz. 50 ng/μl) pipettiert. In ein Polypropylenröhrchen (Greiner-Röhrchen, Greiner, Frickenhausen, FRG) wurde Zellstoff, der mit 2 ml Hybridisierungslösung getränkt war, eingelegt und der Objektträger darauf plaziert. Nach sorgfältigem Verschluss des Röhrchens wurde dieses bei 46°C für 1,5 h in horizontaler Lage inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger sofort mit 1 ml auf 48°C vorgewärmten Waschpuffer gespült und in ein mit Waschpuffer gleicher Temperatur gefülltes 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Nach 15 min wurde der Objektträger vorsichtig mit H₂O_{dest} abgespült und an der Luft getrocknet.

B.11.2.1. Simultane Doppelhybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden

Es wurden zwei unterschiedlich markierte Sonden (FLUOS und TRITC/CT) gleichzeitig eingesetzt. Hierbei wurden je 1 μ l der 50 ng/ μ l Arbeitslösungen zur Hybridisierungslösung zugegeben und gut vermischt.

B.11.2.2. Hybridisierung mit Kompetitorsonden

Kompetitorsonden wurden im Verhältnis 1:1 zum fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid eingesetzt. Die Zugabe und das Vermischen mit der Hybridisierungslösung erfolgte wie in B.11.2.1. beschrieben.

B.11.3. Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern

Diese Methode wurde angewandt, um die auf den Polycarbonatfiltern fixierten Organismen aus aquatischen Proben (B.2.2.) ohne weitere Zwischenschritte (wie z.B. Resuspension etc.) mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden nachzuweisen.

Lösungen:

Die verwendeten Lösungen entsprachen den bei der Hybridisierung auf Objektträgern verwendeten (B.11.2.)

- Hybridisierungspuffer-Sondengemisch

Vermischen von Hybridisierungspuffer mit Sondenarbeitslösung (50 ng/ μ l) im Verhältnis 9:1 in einem ERG

Durchführung:

Der Grundablauf entspricht dem bei der Hybridisierung auf OT beschriebenen (B.11.2.). Der Polycarbonatfilter wurde mit einer sterilen Rasierklinge je nach verwendeter Größe in 4-12 Teile geschnitten. Die so erhaltenen Filterteile wurden mit der Pinzette auf einen unbeschichteten Glasobjektträger (76 x 26 mm, geschnitten, Menzel, FRG) gelegt und mit 20 μ l Hybridisierungspuffer-Sondengemisch gleichmäßig überschichtet. Die Hybridisierung erfolgte in der feuchten Kammer bei 46°C. Gewaschen wurden die Filterteile frei schwimmend im Waschpuffer bei 48°C. Anschließend wurden die Filterteile entnommen und auf Filterpapier getrocknet.

B.12. Detektion und Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse

B.12.1. Konventionelle Licht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse und Dokumentation der Ganzzellhybridisierungsergebnisse (B.11.) standen mehrere Mikroskope ausgerüstet mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Axioskop, Axioplan, Axiophot 2, Axiovert; Carl Zeiss, Jena, FRG) zur Verfügung. Sie waren ausgestattet mit Plan-Neofluar- und Plan-Apochromat-Objektiven in den Vergrößerungen 10-, 16-, 20-, 40-, 63- und 100fach und entsprechenden Kameraeinheiten (MC100 bzw. Axiophotaufsatz). Die Auflichteinrichtung beim Axiophot 2 war mit einer 100 W Quecksilberhochdrucklampe, die der anderen Mikroskope mit einer 50 W Lampe ausgestattet. Die Leuchtintensität der 100 W Lampe war über eine AttoArc™-Steuereinheit (Zeiss, Jena, Deutschland) regelbar. Für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe standen folgende, in Tabelle B.8. aufgeführten, Filterkombinationen zur Verfügung:

Filtersatz	Anregungsfilter [nm]	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter [nm]	verwendbar für
01	BP 365/12	FT 395	LP 397	DAPI
09	BP 470/40	FT 510	LP 520	FLUOS
15	BP 546/12	FT 580	LP 590	TRITC, Cy3
16	BP 485/20	FT 510	LP 520	FLUOS
20	BP 546/12	FT 560	575-640	TRITC, Cy3
HQ-FITC	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 535/50	FLUOS
HQ-Cy3	HQ 545/50	Q 565 LP	HQ 610/75	Cy3, TRITC
Pinkel Dual	BP 495/15, BP 575/25	polychroic 400, refl. 405/495/575	Nr. 3368	FLUOS u. TRITC bzw. Cy3

Tabelle B.8: Für die Epifluoreszenzmikroskopie verwendete Filtersätze (01-09, Carl Zeiss, Jena; HQ- und Pinkel Dual Filtersätze, AHF Analysetechnik, Tübingen). BP, Bandpaß; LP, Langpaß; FT, Farbteiler; HQ, „High Quality“.

Die Dokumentation erfolgte auf Farbdia- (Kodak Ektachrome P1600x oder 100S) oder schwarzweiß Negativfilmen (Kodak T_{max}400). Darüber hinaus wurden Aufnahmen mit einer CCD Farbvideokamera (Diagnostic Instruments, Inc. Burroughs, USA) und der Bildverarbeitungssoftware Metamorph V3.51 (Metamorph Universal Imaging Corp., West Chester, USA) gemacht. Die Software wurde auch zum Alignen der Bilder und der anschließenden Überlagerung einzelner Bilder zu Mehrfarbbildern benutzt. Weiterhin kamen

die Bildbearbeitungsprogramme der ABC Graphics Suite II von Micrografx (Micrografx GmbH, Unterschleißheim, FRG) zum Einsatz.

B.12.2. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie bietet den Vorteil, Objekte ohne die störende Fluoreszenz der Bereiche ober- und unterhalb der eingestellten Fokusebene zu erfassen. Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn das zu beobachtende Präparat starke Autofluoreszenz oder eine große räumliche Ausdehnung besitzt, welche in der konventionellen Mikroskopie nicht adäquat dargestellt werden kann. Emittiertes Licht aus Brennebenen, die über oder unter der Fokusebene liegen, kann die Bildschärfe erheblich reduzieren. Diese Beschränkung kann durch die konfokale Laserscanning-Mikroskopie umgangen werden.

Das Präparat wird punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt, wobei als Lichtquellen Laserlinien verschiedener Wellenlänge genutzt werden. Das zu untersuchende Objekt wird auf diese Weise in zwei Raumrichtungen abgerastert (scanning). Die von jedem Bildpunkt ausgesandte Fluoreszenz wird über Photomultiplier verstärkt, detektiert und als Helligkeitswert digitalisiert. Dabei ist im Lichtweg ein „pinhole“ (eine kleine Lochblende) eingeschaltet, welches bewirkt, daß nur Licht aus einer definierten Brennebene, bei gleichzeitiger Ausblendung sämtlichen Streulichtes, detektiert wird. Durch wiederholtes Abrastern verschiedener Fokusebenen in X-, Y- und Z-Richtung werden optische Schnitte durch ein Präparat gelegt, die zusammen die dreidimensionale Struktur des Präparats wiedergeben. Die Bildinformation steht dabei in digitaler Form zur Verfügung. Dadurch wird eine anschließende Bildbearbeitung und die Darstellung der räumlichen Information in Form von 3D-Projektionen, X-, Y-, oder Z-Schnitten oder farbcodierten Tiefenprofilen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein inverses konfokales Laserscanning Mikroskop vom Typ LSM 410 und sein Nachfolgemodell LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland), koppelbar an einen inversen oder einen aufrechten Mikroskopstand, verwendet. Das LSM 510 wurde mit Laserlinien bei 488 nm (Argon) und 543 nm (Helium-Neon) benutzt, die Steuerung und Bildverarbeitung erfolgte über die mitgelieferte Software (Version 1.49.44). Bilder wurden über PowerPoint 97 (Microsoft GmbH, Unterhaching, Deutschland) mit einem Diabelichter (Personal LFR plus; Lasergraphics, Irvine, USA) auf Farbumkehrfilm (Kodak Ektachrome 100S) ausgegeben.

B.13. Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Einzelzellen

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid; Sigma, Deisenhofen, FRG) lagert sich spezifisch an DNA an. Seine spektralen Eigenschaften sind in Tabelle B.9. aufgelistet.

Anregung	Emissionsmaximum	Farbe bei spezifischer Bindung an DNA	Farbe bei unspezifischer Bindung
365 nm	418 nm	Blau	Gelb

Tabelle B.9.: Die spektralen Eigenschaften von DAPI

DAPI bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA, womit gleichzeitig eine Verstärkung der Fluoreszenz verbunden ist (Kapuscinski und Szer, 1979).

B.13.1. Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI nach

Membranfiltration

Materialien:

- DAPI-Arbeitslösung
 - 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- Citifluor-Vectashield-Gemisch

Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK) und Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) wurden im Verhältnis 4:1 gemischt, dadurch wurde das Ausbleichen der Präparate verzögert.

Durchführung:

Um die Gesamtzellzahl einer Wasserprobe zu bestimmen wurden ein Teil des Polycarbonatfilters mit den darauf fixierten Zellen (B.2.2.) ohne vorherige Hybridisierung auf eine Glasplatte gelegt und mit DAPI-Arbeitslösung überschichtet. Nach 5 minütiger Färbung im Dunklen wurde der Filter in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Die entsprechende Nullprobe (gleiche Fixierungsprozedur und Puffer, aber ohne Wasserprobe) wurde genauso behandelt. Das Einbetten erfolgte zu Beginn in reinem Citifluor später in Citifluor-Vectashield-Gemisch.

Mikroskopische Auswertung:

Der Polycarbonatfilter wurde bei 1000x Vergrößerung unter UV-Anregung mit Hilfe eines Zähllokulars (10x10 Teilfelder, Zeiss, Oberkochen, FRG) an einem Epifluoreszenzmikroskop (Filter 01, Axioplan, Zeiss, Oberkochen, FRG) ausgezählt. Statistisch signifikante Zählwerte erfordern das Auszählen von mindestens 20 unabhängigen Feldern. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl pro ml wurde nach Ermittlung der Mittelwerte folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Gesamtzellzahl ml}^{-1} = \frac{(\text{Zellzahl}_{\text{Probe}} - \text{Zellzahl}_{\text{Nullprobe}}) \times M}{\text{Anzahl der ausgezählten mikroskopischen Felder} \times \text{ml Probe}}$$

$$M = \text{Mikroskopfaktor} = \frac{\text{effektive Filterfläche}}{\text{Fläche des Gitternetzes im Zähllokular}}$$

Die effektive Filterfläche war abhängig von der verwendeten Filtrationsapparatur und wurde bei jedem Experiment mit Hilfe einer Schublehre bestimmt. Die Fläche des Gitternetzes im Zähllokular wurde für ein 100x Objektiv mit Eichobjekträgern bestimmt und betrug bei 1000 facher Vergrößerung je nach Bauart 100 mm² bis 144 mm².

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Zählwerten von 20 zufällig ausgewählten Zählfeldern auf einem DAPI-gefärbten Filterstück ermittelt. Alle Gesamtzellzahlen sind auf die Negativkontrolle (Zellzahl_{Nullprobe}) korrigiert.

B.13.2. Kombination der DAPI-Färbung mit in situ-Einzelzellhybridisierung

Um die Zahl der fluoreszenzmarkierten Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl stellen zu können, wurde nach der Einzelzellhybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachgefärbt.

Materialien:

- DAPI-Arbeitslösung
 - 1 µg/ml DAPI in H₂O_{bidest}
- Citifluor-Vectashield-Gemisch

Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK) und Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) wurden im Verhältnis 4:1 gemischt, dadurch wurde das Ausbleichen der Präparate verzögert.

- Citifluor-Vectashield-DAPI-Gemisch

Das Citifluor-Vectashield-Gemisch wurde zusätzlich mit DAPI (endkonz. 1 $\mu\text{g/ml}$) gemischt, um das Abwaschen der *Achromatium* Zellen bei der DAPI-Färbung zu verhindern.

Durchführung:

1. ***Nevskia ramosa* (C.1.):** In jedes Feld der hybridisierten Objektträger aus B.11.2. wurde 10 μl der DAPI-Arbeitslösung pipettiert und 5 min bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde der OT mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Einbetten erfolgte zu Beginn in reinem Citifluor später im Citifluor-Vectashield-Gemisch.
2. ***Achromatium oxaliferum* (C.2.):** Auf jedes Feld der hybridisierten Objektträger aus B.11.2. wurde ein Tropfen Citifluor-Vectashield-DAPI-Lösung gegeben und mit dem Deckglas abgedeckt.
3. **Bakterielle Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen (C.3.1.):** Die hybridisierten und getrockneten Filterteile aus B.11.3. wurden auf eine Glasplatte gelegt und mit 50 μl DAPI-Arbeitslösung überschichtet. Nach 5 minütiger Färbung im Dunklen wurde der Filter in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Das Einbetten erfolgte zu Beginn in reinem Citifluor später im Citifluor-Vectashield-Gemisch.

B.13.3. Bestimmung der sondenspezifischen Zellzahlen in aquatischen Systemen

Die mikroskopische Auswertung erfolgte analog zur Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI (B.13.1.) Zur Vermeidung von Bleicheffekten wurden die fertigen Filterteile aus B.13.2. Punkt 2 im Epifluoreszenzmikroskop zuerst mit dem Cy3 Filtersatz betrachtet und gezählt und danach erst mit dem DAPI Filtersatz. Dadurch konnte einerseits der Prozentanteil der Sonde zu DAPI ermittelt werden, andererseits war die Berechnung der Zellzahl pro ml für die einzelnen Sonden möglich. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Zählraten von 10-20 zufällig ausgewählten Zählfeldern auf einem Filterstück ermittelt. Alle Zählraten sind auf die Negativkontrolle (ein mit der NON338 Sonde hybridisiertes Filterstück) korrigiert. Für jede Sonde und Probe wurden mehr als 500 Zellen, bei DAPI mehr als 1500 Zellen gezählt. Statistische Analysen wurden mit nichtparametrischer Statistik

durchgeführt. Wenn nötig, werden der Median und der Konfidenzintervall statt dem Mittelwert und der Standardabweichung. Um die statistische Signifikanz von Unterschieden zu ermitteln wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden größtenteils mit dem Softwarepaket Office 97 von Microsoft (Microsoft GmbH, Unterhaching, FRG) durchgeführt.

B.13.4. Analyse der *Achromatium* Populationen

Die unterschiedlichen *Achromatium* sp. Populationen des Stechlinsees im August 1998 wurden bei 160x und 400x Vergrößerung ausgezählt. Alle *Achromatium* Zellen wurden zuerst auf Grund ihrer Morphologie im Phasenkontrast und der ungewöhnlichen, heterogenen DAPI-Färbung identifiziert. Anschließend wurden durch abwechselnde Betrachtung der Fluorescein- und Rhodamin-spezifischen Fluoreszenz alle roten, grünen und alle Zellen, welche grüne und rote Signale zeigten, gezählt. Insgesamt wurden 252 *Achromatium* Zellen in 15 unabhängigen Feldern bewertet.

C. Ergebnisse

C.1. Phylogenie und *in situ*-Identifizierung von

Nevskia ramosa

C.1.1. Phasenkontrastmikroskopie der Anreicherungskultur

Bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung der seit 30 Jahren überimpften Anreicherungskultur von *N. ramosa* aus dem Soelkensee (B.1.2.1.) konnten zwei häufige Morphotypen unterschieden werden: (I) ein ca. 1 μm dickes und 2-3 μm langes phasendichtes Stäbchen, welches sternenförmige Mikrokolonien bildete und (II) ein dünneres leicht gebogenes ca. 0,7x 3-4 μm großes Stäbchen. Die für *N. ramosa* beschriebenen, voll entwickelten flachen Rosetten zeigten sich nicht, aber deren Vorstadien waren erkennbar. Diese bestanden aus 2-4 verzweigten, noch über den Schleim verbundenen Zellen, (Abbildung A.5. und Abbildung C.2., A, C, E). Diese Zellen zeigten auch die typischen, schon von Famintzin für *N. ramosa* beschriebenen Einschlüsse (Famintzin, 1892).

C.1.2. *In situ*-Analyse der Anreicherungskultur mit gruppenspezifischen Sonden

Um einen ersten Einblick in die phylogenetische Zusammensetzung der Anreicherungskultur zu erhalten, wurde ein Satz bereits vorhandener Sonden angewandt (Tabelle C.1.). Es zeigte sich, daß alle im Phasenkontrast respektive mit DAPI sichtbaren Zellen in der Anreicherungskultur auch mit der bakterienspezifischen Sonde EUB338 hybridisierten. Mit den gruppenspezifischen Sonden konnten drei Populationen unterschieden werden. Die phasendichten, sternenförmigen Mikrokolonien hybridisierten sowohl mit der Sonde ALF968, spezifisch für die alpha-Gruppe der *Proteobacteria*, als auch mit der für die alpha4-Gruppe der *Proteobacteria* spezifischen, Sonde ALF4-1322. Von der zweiten Population bestehend aus dünnen, gebogenen Stäbchen hybridisierten überraschenderweise nicht alle mit einer der gruppenspezifischen Sonden. Der eine Teil dieser Population hybridisierte nur mit der Sonde ALF968, der andere Teil mit keiner der verwendeten gruppenspezifischen Sonden sondern nur mit der Sonde EUB338. Mit der Sonde NON338 wurde gezeigt, daß keine Autofluoreszenz oder unspezifische Sondenbindung vorlag.

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>	Referenz
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	0-35	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
NON338	-	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S, 338-355	0-35	(Wallner <i>et al.</i> , 1993)
ALF968	alpha-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S, 968-986	35	(Neef, 1997)
ALF4-1322	alpha4-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	TCCGCCTTCATGCTCTCG	16S, 1322 - 1339	35	(Neef, 1997)
BET42a	beta-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTCCCACCTTCGTTT	23S, 1027- 1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
GAM42a	gamma-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTCCCACATCGTTT	23S, 1027- 1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
CF319a	Cytophagen- Flavobacterium Cluster des CFB ^c Phylums	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	35	(Manz <i>et al.</i> , 1996)

Tabelle C.1.: Übersicht über die angewandten gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden. ^a*E. coli* Numerierung nach Brosius *et al.*, 1981. ^bFormamidkonzentration (FA) im *in situ*-Hybridisierungspuffer. ^cCFB, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides.

C.1.3. Phylogenetische Analyse einer 16S-rDNA Genbank aus der Anreicherung

Um die Diversität in der Anreicherung näher zu untersuchen und die 16S-rRNA Sequenz von *N. ramosa* zu erlangen, wurde der gesamte Oberflächenfilm einer 3 l Anreicherungskultur geerntet und daraus die DNA extrahiert. Die vorhandenen 16S-rDNA-Moleküle wurden mit den Universalprimern 616V und 630R (Tabelle B.2.) amplifiziert und durch Klonierung vereinzelt. Einundzwanzig Klone wurden zufällig ausgewählt, auf Vorhandensein eines Inserts der richtigen Länge geprüft und ansequenziert (400-1000 Basen). Die phylogenetische Einordnung der Partialsequenzen zeigte deren Zugehörigkeit zu zwei Gruppen der *Proteobacteria*. Die Sequenz des Klons NO22 war zu der alpha4-Gruppe der *Proteobacteria* verwandt, während die restlichen Sequenzen zwei in sich sehr eng verwandte Cluster bildeten. Cluster I bestand aus fünf Sequenzen (NO2, NO6, NO8, NO11 und NO21) und zeigte eindeutig Verwandtschaft mit der alpha-Gruppe der *Proteobacteria*. Cluster II beinhaltete 15 Sequenzen (NO1, NO4 und -5, NO7, NO9 und -10, NO12 bis -14, NO16 bis -20 und NO24) und zeigte Verwandtschaft zur 16S-rRNA tief abzweigender Vertreter der gamma-Gruppe der *Proteobacteria*. Die vergleichende Sequenzanalyse innerhalb der beiden Cluster, zeigte hohe Ähnlichkeitswerte zwischen 98,3 und 99,9%. Daraufhin wurden die Klone NO2, NO4, NO10, NO11 und NO22 für die Bestimmung der Vollsequenz ausgewählt. Die

vollständige Sequenzierung der beiden Vertreter eines Clusters, NO2 und -11 und NO4 und -10, ergab jeweils Identität. Die vergleichende Sequenzanalyse der fast vollständigen Sequenzen, zeigte eine 97,2% ige Ähnlichkeit der Sequenz NO22 zu *Blastobacter* sp., 97,6% Ähnlichkeit zwischen NO2/11 und dem nächstverwandten kultivierten Bakterium *Mycoplana bullata* und 87,9 bis 88,9% Ähnlichkeit zwischen der 16S-rRNA-Sequenz der Klone NO4/10 und Vertretern der *Xanthomonas* Gruppe (Tabelle C.3.).

C.1.4. In situ-Identifizierung von *N. ramosa*

Um eine Zuordnung der drei unterschiedlichen 16S-rRNA Sequenzen aus der Genbank zu den entsprechenden Populationen in der Anreicherungskultur zu erreichen, wurden, ausgehend von den Vollsequenzen, insgesamt fünf Sonden entwickelt (Tabelle C.2.).

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b in situ
NEV656	NO4/10	CGCCTCCCTCTACCGTTT	16S, 656-674	0-50
NEV177	NO4/10	GCTCTTGGGAGATCATGC	16S, 177-195	0-50
NAL657	NO2/11	CCACACACCTCTCTCATA	16S, 657-675	35
NAL1208	NO2/11, <i>Mycoplana bullata</i> , <i>Brevundimonas diminuta</i>	TAGCCCACCCTGTAAGGG	16S, 1208-1226	0
ALF921	NO22	CTTGTGCAGGCCCGTCA	16S, 921-939	35

Tabelle C.2.: In diesem Projekt entwickelte Oligonukleotidsonden. ^aE. coli Numerierung nach Brosius et al., 1981. ^bFormamidkonzentration (FA) in in situ-Hybridisierungspuffer.

Die Sonde ALF921, spezifisch für die NO22 Klon Sequenz, hybridisierte in der Anreicherungskultur eindeutig mit den sternenförmigen Mikrokolonien (Abbildung C.2., A, B). Die Sonden NAL657 und NAL1208, welche spezifisch für die Sequenz NO2/11 konstruiert wurden, hybridisierten mit der Population dünner gebogener Stäbchen, die zuvor mit der ALF968 Sonde hybridisiert hatte. Die zwei restlichen Sonden NEV656 und NEV177 hybridisierten beide mit der Population der dünnen gebogenen Stäbchen, die zuvor nur mit der Sonde EUB338 und keiner weiteren der angewandten gruppenspezifischen Sonden hybridisierte (Abbildung A.5. und Abbildung C.2., C, D). Da beide Sonden mit allen Zellen in der Anreicherungskultur, welche die typische Morphologie und Anordnung für *N. ramosa* aufwiesen, hybridisierten, kann die Sequenz NO4/10 mit hoher Sicherheit *N. ramosa* zugeordnet werden. Eine Doppelhybridisierung mit den Sonden NEV656 in CT (rot) und NAL657 in Fluorescein (grün) bestätigte, daß zwei morphologisch sehr ähnliche, aber genetisch unterschiedliche Organismen in der Anreicherungskultur vorhanden waren (Abbildung C.2., E, F).

Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse und der phylogenetischen Zuordnung der einzelnen Populationen in der Anreicherungskultur gibt Tabelle C.3..

Sonde	Bakterien in der Anreicherungskultur		
	sternenförmige Mikrokolonien	dünne gebogene Stäbchen	<i>Nevskia ramosa</i>
EUB338	+	+	+
NON338	-	-	-
ALF968	+	+	-
ALF4-1322	+	-	-
BET42a	-	-	-
GAM42a	-	-	-
CF319a	-	-	-
ALF921	+	-	-
NAL657	-	+	-
NAL1208	-	+	-
NEV656	-	-	+
NEV177	-	-	+
Repräsentiert durch	Klon NO22	Klon NO2/11	Klon NO4/10
Nächstverwandte			
Sequenz(en)	<i>Blastobacter</i> sp.	<i>Mycoplana bullata</i>	<i>Xanthomonas</i> Gruppe
Ähnlichkeit (%)	97,2	97,6	87,9-88,9

Tabelle C.3.: Hybridisierungsergebnisse und Verwandtschaft der Klonsequenzen in der Anreicherungskultur.

Die Spezifität der Sonden ALF921, NAL657 und NAL1208 wurden nur innerhalb der Anreicherungskultur getestet. Die Sonden ALF921 und NAL657 zeigten bei 35%, NAL1208 bei 0% Formamid spezifische Signale mit den Zielorganismen. Für diese Sonden wurden keine weiteren Tests mit anderen Organismen durchgeführt, da das Ziel dieses Projektes *N. ramosa* war.

Die Hybridisierungsbedingungen für die Sonden NEV656 und NEV177 wurden genauer ermittelt. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit keine Reinkultur von *N. ramosa* vorlag, wurde eine aufsteigende Formamidreihe von 0-80% in 10% Schritten mit der Anreicherungskultur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch optischen Vergleich der Signalstärken evaluiert. Es zeigte sich, daß beide Sonden bis zu einer Formamidkonzentration von 50% starke Signale lieferten und erst bei 80% FA ein völliger Signalverlust zu verzeichnen war. Die Spezifität gegenüber den anderen Populationen innerhalb der Anreicherungskultur war bereits bei 0% FA gegeben. Beide Sonden zeigten bei Tests mit einem Gemisch von Reinkulturen,

bestehend aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas testosteroni* und *Azospirillum brasiliense*, keine Hybridisierungssignale. Ein Probe_Match der Sonden gegen alle Sequenzen in der Sequenzdatenbank von ARB zeigte mindestens drei Unterschiede, was die phylogenetisch distinkte Stellung von *N. ramosa* widerspiegelt.

C.1.5. Phylogenetische Stellung der Bakterien in der *N. ramosa* Anreicherung

Basierend auf diesen Daten wurden zwei phylogenetische Bäume rekonstruiert. Die Abbildung C.1. (A) zeigt die Sequenz von *N. ramosa* (NO4/10) im Verhältnis zu einer Auswahl von Sequenzen der beta- und gamma-Gruppe der *Proteobacteria*. Da die Abfolge der tief abzweigenden Äste in der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* mit dem derzeitigen Datensatz nicht bestimmt werden konnte, wurde der Anfang der Äste auf einen Punkt zusammengezogen (Ludwig *et al.*, 1998). Die Abbildung C.1. (B) zeigt die Verwandtschaft der sternenförmigen Mikrokolonien (NO22) und der dünnen gebogenen Stäbchen (NO2/11) zu ausgewählten Sequenzen der alpha- und gamma-Gruppe der *Proteobacteria*. Die EMBL Datenbanknummern sind AJ001343 (NO4/10), AJ001344 (NO22) und AJ001345 (NO2/11).

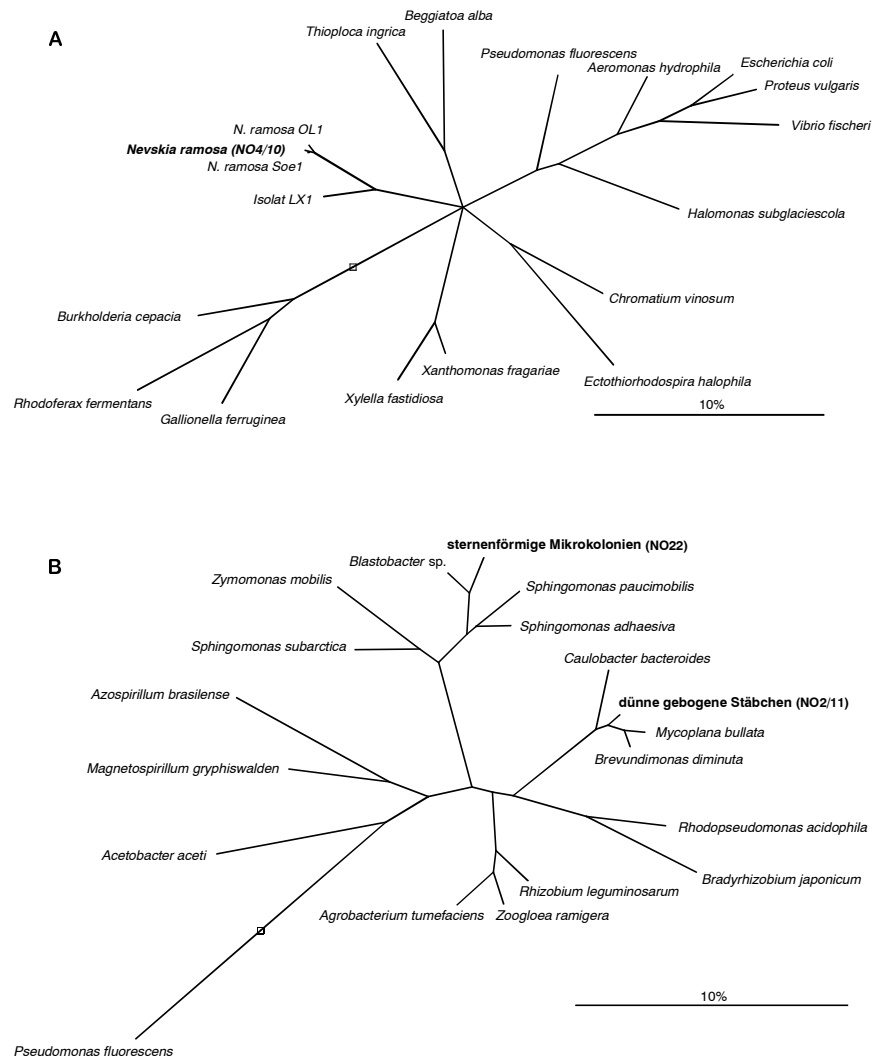
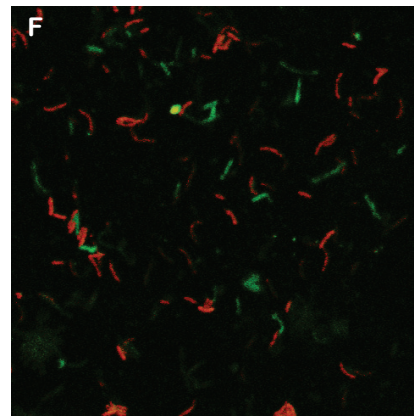
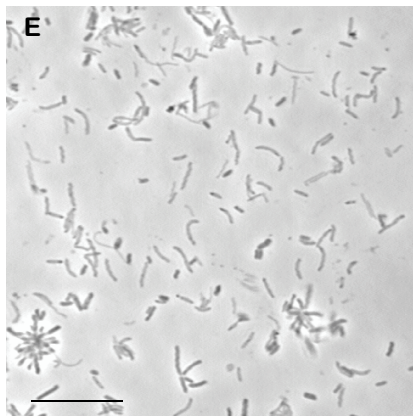
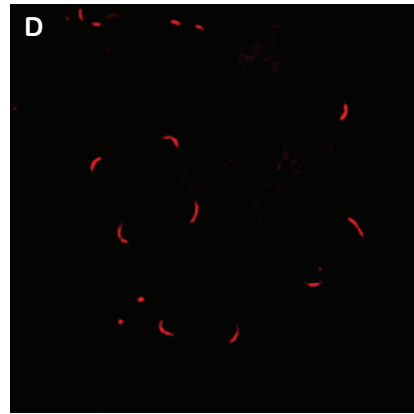
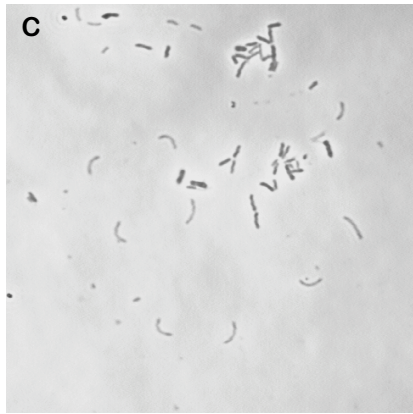
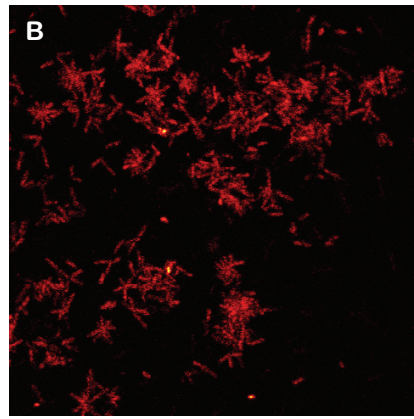
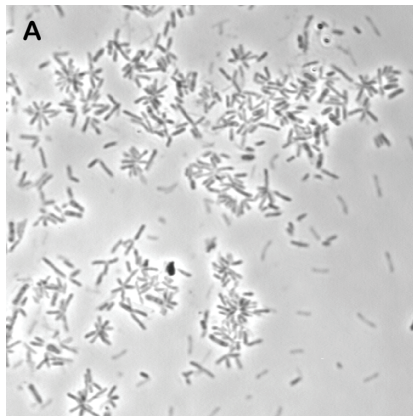


Abbildung C.1. ↑: Phylogenetische Bäume der 16S-rDNA Sequenzen aus der Anreicherungskultur. (A) Verwandtschaft von *N. ramosa* (Sequenz NO4/10) und ausgewählten Organismen der beta- und gamma-Gruppe der Proteobacteria. (B) Verwandtschaft der dünnen gebogenen Stäbchen und der sternenförmigen Mikrokolonien zu ausgewählten Bakterien der alpha-Gruppe der Proteobacteria. Der Balken gibt 10% geschätzte Sequenzunterschiede an. Das Kästchen bezeichnet die Wurzel.

Abbildung C.2.: In situ-Hybridisierung der *N. ramosa* Anreicherungskultur. Phasenkontrast (A, C, und E) und Epifluoreszenz (B, D und F). Aufnahmen zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. (A und B) Sonde ALF921-CT (rot). (C und D) Sonde NEV656-CT (rot). Die Doppelhybridisierung (E und F) mit den Sonden Nev656-CT (rot) und NAL657-F (grün) zeigt die beiden Populationen der dünnen gebogenen Stäbchen. Balken: 10 µm, gilt für alle Bilder.



C.2. Phylogenie und Diversität von *Achromatium oxaliferum*

C.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Achromatium oxaliferum kommt im Sediment vom Stechlinsee relativ häufig vor (Babenzien und Sass, 1996). Achromatien konnten während des ganzen Jahres gesehen werden, wobei an der Sedimentoberfläche Maxima mit bis zu 1×10^4 Zellen/cm³ auftraten. Die Zellzahlen nahmen mit zunehmender Sedimenttiefe ab und unterhalb von 15 mm konnten keine Achromatien mehr gefunden werden (Babenzien und Sass, 1996). In allen Schichten zeigten sich unterschiedlich große Zellen, wobei die Zellgrößen von $10 \times 30 \mu\text{m}$ bis zu $35 \times 125 \mu\text{m}$ reichten (Abbildung A.6., A).

Die *Achromatium* Zellen der Fuchskuhle unterschieden sich in Bezug auf ihre Größe und Größenverteilung deutlich von den Zellen des Stechlinsees. Die Population war morphologisch sehr homogen mit kokkoiden Zellen in der Größe von $10 \times 15 \mu\text{m}$ (Abbildung A.6., B). Die Abundanzen in den Oberflächenschichten erreichten bis zu 1×10^3 Zellen/cm³. Zellen beider Habitats zeigten die typischen intrazellulären Kalkeinlagerungen (CaCO₃) und Schwefeltröpfchen.

C.2.2. Phylogenetische Analyse der 16S-rDNA Genbank aus physikalischen Anreicherungen von Achromatien aus dem Stechlinsee und der Fuchskuhle

Aus den physikalischen Achromatien-Anreicherungen aus dem Stechlinsee und der Fuchskuhle (B.1.2.2.) wurden zwei 16S-rDNA Genbanken erstellt. Für die Genbank aus dem Sediment des Stechlinsees fanden die Universalprimer 616V und 630R Verwendung (B.5.1.). Achtzehn Klone der Genbank wurden für die Partiaalsequenzierung (400 bis 700 Basen) ausgewählt. Sieben davon zeigten Verwandtschaft mit *A. oxaliferum* Klon 5 (Rydal; Head *et al.*, 1996). Aus diesen wurden für die Klone AST01 und AST10 die Vollsequenzen bestimmt. Neun von den restlichen Klonen waren mit den verschiedensten Phyla der *Bacteria* verwandt. Interessanterweise fielen vier aus den neun Klonen in die neu beschriebene Ordnung der *Verrucomicrobiales* (Ward-Rainey *et al.*, 1995).

Für die Genbank aus der Fuchskuhle wurde als Vorwärtsprimer der für die Sequenz von *A. oxaliferum* AST01 und AST10 spezifisch entwickelte Primer ACH65F und der Universalprimer 630R verwendet. Dies sollte eine Bevorzugung der 16S-rDNA von *Achromatium* bei der Amplifizierung gegenüber der von Begleitorganismen bewirken. Tatsächlich fanden sich in den sechs Klonen, die aus der Genbank des Sediments der Fuchskuhle ansequenziert wurden nur Sequenzen, die phylogenetisch mit *Achromatium* verwandt waren. Dabei wiesen sie die größte Ähnlichkeit zu *A. oxaliferum* Klon 7 und 8 (Rydal; Head *et al.*, 1996) auf. Die beiden Klone AFK55 und AFK57 wurden zur Bestimmung der Vollsequenz ausgewählt.

Die vergleichende Sequenzanalyse der beiden Sequenzpaare AST01/AST10, sowie AFK55/AFK57 zeigte eine Ähnlichkeit von 99,8% zwischen AST01 und AST10 und 99,9% zwischen AFK55 und AFK57. Zieht man die 16S-rRNA Sekundärstruktur in Betracht, war keiner der wenigen Sequenzunterschiede in den Sequenzpaaren mit einem entsprechenden komplementären Basenaustausch auf der anderen Seite der Helix gekoppelt. Deshalb sind die Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Sequenzierfehler und/oder PCR-Artefakte (Meyerhans *et al.*, 1990; Cariello *et al.*, 1991; Weller *et al.*, 1991; Reysenbach *et al.*, 1992; Rainey *et al.*, 1994) zurückzuführen. Alle weiteren phylogenetischen Untersuchungen basieren auf den Sequenzen AST01 und AFK57. Die Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen AST01 und AFK57 beträgt 93,6%. Ein Vergleich der Vollsequenzen AST01 und AFK57 mit *A. oxaliferum* Klon 5 (Rydal) zeigte 94,0% und 92,6% Ähnlichkeit. Die nächsten kultivierten Verwandten zu *A. oxaliferum* sind *Chromatium vinosum*, *Rhabdochromatium marinum* und *Ectothiorhodospira halophila* mit Ähnlichkeitswerten zwischen 86,2% und 90,5% bezogen auf die Vollsequenzen. In Tabelle C.4. sind die Ähnlichkeitswerte für die Partialsequenzen von *A. oxaliferum* Klon 1 und 3-8 (Rydal), den Sequenzen AST01, AFK57 und ausgewählten bereits kultivierten Organismen wiedergegeben.

%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	89,2											
3	91,8	90,7										
4	90,0	86,4	89,0									
5	89,3	88,2	90,0	94,7								
6	87,6	85,0	87,9	92,2	92,2							
7	88,7	87,5	90,0	94,7	99,3	92,2						
8	89,0	87,9	90,4	95,0	99,6	92,6	99,6					
9	89,3	87,5	90,3	95,7	98,9	91,8	98,9	99,3				
10	89,0	85,4	89,7	90,4	92,2	91,5	92,2	92,6	91,8			
11	90,8	87,5	91,1	92,2	92,2	92,9	92,2	92,6	91,8	96,5		
12	89,7	86,8	90,8	92,2	93,6	90,8	93,6	94,0	93,2	96,1	96,1	

Tabelle C.4.: Ähnlichkeitswerte zwischen den Klonen AST01, AFK57 und ausgewählten Sequenzen, basierend auf 349 Basen. 1: *Ectothiorhodospira halophila*; 2: *Chromatium vinosum*; 3: *Rhabdochromatium marinum*; 4: *A. oxaliferum* Klon AST01 (Stechlinsee); 5: *A. oxaliferum* Klon 5 (Rydal); 6: *A. oxaliferum* Klon 1 (Rydal); 7: *A. oxaliferum* Klon 3 (Rydal); 8: *A. oxaliferum* Klon 4 (Rydal); 9: *A. oxaliferum* Klon 6 (Rydal); 10: *A. oxaliferum* Klon 7 (Rydal); 11: *A. oxaliferum* Klon 8 (Rydal); 12: „*A. minus*“ Klon AFK57 (Fuchskuhle).

Um die Verwandtschaft der neu erhaltenen Sequenzen AST01 und AFK57 zu ausgewählten Sequenzen der beta- und gamma-Gruppe der *Proteobacteria* zu zeigen, wurde ein phylogenetischer Baum rekonstruiert. Die Berechnung dieses Baumes erfolgte nach der Maximum-Likelihood Methode basierend auf Vollsequenzen mit anschließender Korrektur der Topologie unter Beachtung der Resultate der verschiedenen Baumberechnungsverfahren. Mehrfachabzweigungen zeigen dabei an, daß die genaue Abfolge der Äste mit dem derzeitigen Datensatz nicht ermittelt werden konnte. Alle anderen Abzweigungen verhielten sich mit den verschiedenen angewandten Rechenverfahren und Filtern stabil (Abbildung C.3.). In diesen Baum wurden dann die Partialsequenzen von *A. oxaliferum* Klon 1, 3-4 und 6-8 eingefügt, ohne die Topologie des Gesamtbaumes zu verändern (ARB_Parsimony). Zwei Cluster zeigten sich innerhalb des *Achromatium* Astes. Cluster A mit den Sequenzen von *A. oxaliferum* Klon 1, 3-6 (Rydal) und der Sequenz AST01. Cluster B mit der *A. oxaliferum* Klon 7, 8 (Rydal) und der AFK57 Sequenz (Abbildung C.4.). Verschiedene Bäume mit Voll- und Teilsequenzen (349 gültige Basen) wurden rekonstruiert, um die Stabilität der zwei Cluster zu überprüfen. In allen Fällen waren die beiden Cluster klar getrennt und zeigten lange Äste zwischen den Verzweigungen. Die EMBL Datenbank Nummern dieser Sequenzen sind AJ010593 bis AJ010596.

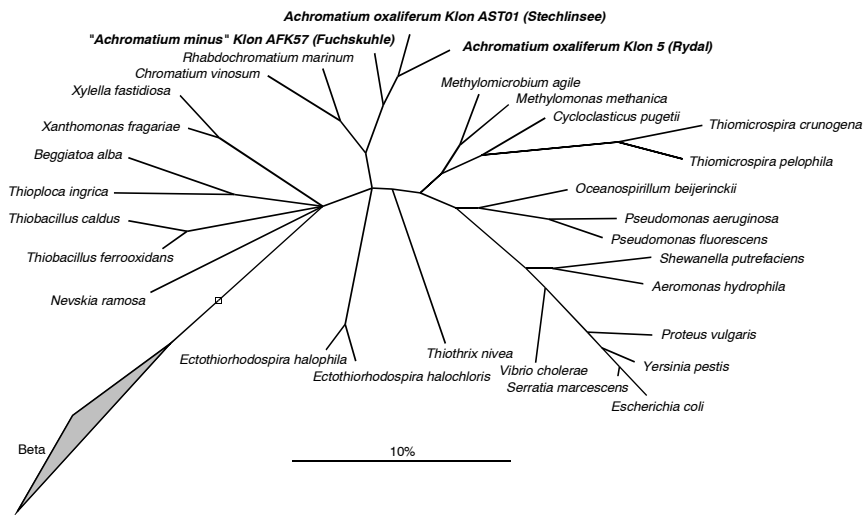


Abbildung C.3.: Rekonstruktion eines phylogenetischen Baumes basierend auf der vergleichenden Analyse der 16S-rDNA von *A. oxaliferum* Klon AST01 (Stechlinsee) und „*A. minus*“ Klon AFK57 (Fuchskuhle) und ausgewählten Sequenzen der beta- und gamma-Gruppe der Proteobacteria. Das Kästchen zeigt dabei die Wurzel und der Balken 10% geschätzte Sequenzunterschiede an.

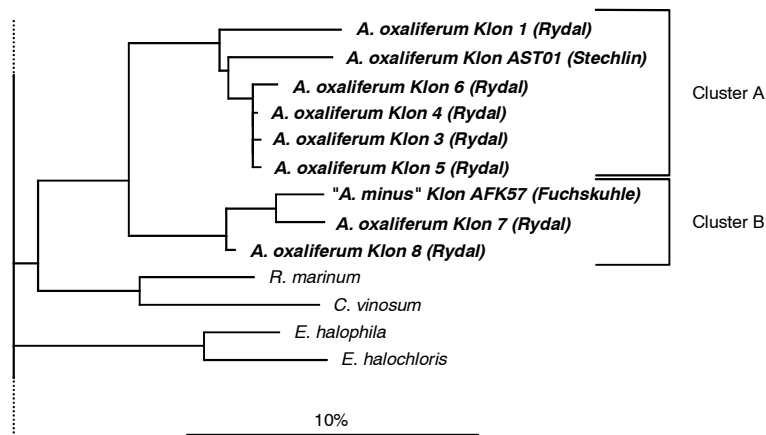


Abbildung C.4.: Auf dem Baum der Abbildung C.3. basierender phylogenetischer Baum, erweitert mit den Partiaalsequenzen von *A. oxaliferum* Klon 1, 3-4 und 6-8 (Rydal). Die Sequenzen wurden mit Hilfe von ARB_Parsimony, ohne eine Veränderung der Gesamttopologie des Baumes zuzulassen, eingefügt. Das Kästchen zeigt 10% geschätzte Sequenzunterschiede an.

C.2.3. rRNA-Sekundärstruktur

Die Sequenz von *A. oxaliferum* Klon AST01 zeigt das gleiche ungewöhnliche rRNA Sekundärstrukturmotiv in der V6 Region (Helix 37/38), wie es bereits für *A. oxaliferum* Klon 5 (Rydal) von Head und Mitarbeitern (1996) beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um eine Deletion der Helix 38, die mit der Verlängerung der Helix 37 einhergeht (Abbildung C.5., C). Beiden Sequenzen ist auch der Pentaloop in Helix 11 (Position 208-211 nach *E. coli* Numerierung; Brosius *et al.*, 1981) gemeinsam. Im Gegensatz dazu entspricht die Sekundärstruktur der Sequenz des Klons AFK57 dem derzeit gültigen Sekundärstrukturmodell (Abbildung C.5., A), ohne die Deletion der Helix 38 oder einen Pentaloop in Helix 11 aufzuweisen (Abbildung C.5., B) (Gutell *et al.*, 1994).

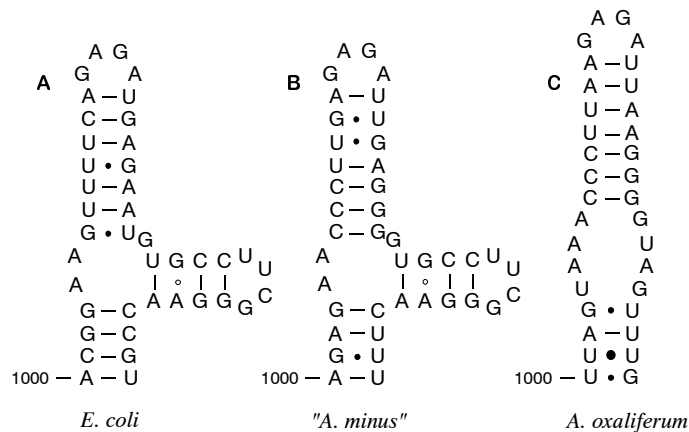


Abbildung C.5.: Sekundärstrukturmodell der V6 Region (Helix 37/38) von (A) *E. coli*, (B) „A. minus“ Klon AFK57 (Fuchskuhle) und (C) *A. oxaliferum* Klon AST01 (Stechlinsee).

C.2.4. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Da eine frühere Publikation (Head *et al.*, 1996) bei der Hybridisierung von *A. oxaliferum* unspezifische Sondenbindung an die Kalkkristalle beschrieben hatte, wurden Testhybridisierungen mit den Sonden EUB338, GAM42a und der Kontrolle für unspezifische Sondenbindung, NON338, (Tabelle C.1.) basierend auf den Standardhybridisierungsprotokollen (B.11.) durchgeführt. Es zeigten sich klare, von der schwachen Autofluoreszenz frisch fixierter *Achromatium* Zellen deutlich unterscheidbare Signale mit beiden Sonden und keine unspezifische Bindung von NON338. Eine Vorbehandlung mit 1 M HCl zum Entfernen des intrazellulären Kalks (Head *et al.*, 1996), war deshalb nicht erforderlich. Allerdings stieg

die Autofluoreszenz, bei einer Lagerung der Zellen länger als eine Woche in PBS/EtOH deutlich an. Die Zellen wurden deshalb nach der Fixierung mit Paraformaldehyd sofort wie in B.2.4. beschrieben auf Objektträger transferiert. Die DAPI-Färbung von Achromatien ergab ein ungewöhnliches Bild, da nicht die ganze Zelle angefärbt wurde, sondern sich eine granuliert Struktur in der Zelle zeigte (Abbildung D.2., rechts). Für jede der beiden Sequenzen der Klone AST01 und AFK57 wurden zwei Sonden entwickelt, um eine eindeutige *in situ*-Zuordnung zu den Populationen im Stechlinsee und in der Fuchskuhle vornehmen zu können (Tabelle C.5.).

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>
ACH62	<i>A. oxaliferum</i> Klon AST01 (Stechlinsee); hybridisiert mit <i>A. oxaliferum</i> und „ <i>A. minus</i> “	TGCCCCCTTTCGCGTTCGA	16S, 62-81	0
AST433 ^c	<i>A. oxaliferum</i> Klon AST01 (Stechlinsee)	TTCCCCC C GAAAGTGC	16S, 433-450	35
AFK433 ^d	„ <i>A. minus</i> “ Klon AFK57 (Fuchskuhle)	TTCCCCC T GAAAGTGC	16S, 433-450	35
AST192	<i>A. oxaliferum</i> Klon AST01 (Stechlinsee)	AAGA GTCCCC CA CTTTCCC	16S, 192-211	35
AFK192	„ <i>A. minus</i> “ Klon AFK57 (Fuchskuhle)	TACC GTCCCC TC CTTTCCC	16S, 192-211	35

Tabelle C.5.: In diesem Projekt entwickelte Oligonukleotidsonden. Markiert sind die Unterschiede in den Sequenzen der homologen Sonden. ^a*E. coli* Numerierung nach Brosius *et al.*, 1981. ^bFormamidkonzentration (FA) im *in situ*-Hybridisierungspuffer. ^cSonde wurde zusammen mit dem unmarkierten Kompetitor AFK433 eingesetzt. ^dSonde wurde zusammen mit dem unmarkierten Kompetitor AST433 eingesetzt.

Für die Bestimmung der Hybridisierungsbedingungen wurden Anreicherungen mit Hilfe von Formamidreihen (0-60% in 10% und 5% Schritten) am Mikroskop optisch evaluiert. Bei 35% Formamid war die Kombination aus Signalstärke und Stringenz für alle vier Sonden optimal. Die für die Sequenz des Klons AFK57 (Fuchskuhle) entwickelten Sonden AFK192 und AFK433 hybridisierten beide spezifisch mit allen Achromatien aus der Fuchskuhle. Bei der Anwendung der Sonden AST192 und AST433 auf die *Achromatium* Population der Fuchskuhle zeigten sich, wie erwartet, keine Signale. Auf Grund der relativen Kleinheit, sowie einem 16S-rRNA Sequenzunterschied von mehr als 6% zwischen *A. oxaliferum* und der *Achromatium* Population in der Fuchskuhle soll eine neue Art, „*Candidatus Achromatium minus*“, beschrieben werden (Babenzien *et al.*, 1999). Mit einem künstlichen Gemisch aus Achromatien der Fuchskuhle und des Stechlinsees konnte gezeigt werden, daß alle Sonden einerseits *in situ*-Signale zeigen und andererseits auch spezifisch sind. Die Abbildung C.7., A zeigt eine Doppelhybridisierung mit den Sonden AFK192-CT (rot) und AST192-F (Fluorescein, grün), wobei die kleineren Zellen „*A. minus*“ repräsentieren.

Bei der Anwendung der Sonden auf Anreicherungen von Achromatien vom Stechlinsee traten unerwartete Resultate auf. Bei der Doppelhybridisierung mit den Sonden AST192-F (grün) und AST433-CT (rot) zeigten sich sowohl die erwarteten gelben Zellen, (d.h. Zellen, die sowohl mit der grün markierten, als auch mit der rot markierten Sonde hybridisieren und dadurch bei der elektronischen Überlagerung des roten und grünen Kanals als gelb erscheinen) als auch unerwarteterweise rote und unhybridisierte Zellen. Ein identisches Bild (gelbe, rote und unhybridisierte Zellen) zeigte sich auch beim Einsatz der Sonden AFK192-CT zusammen mit AFK433-F auf die Achromatien aus dem Stechlinsee (Abbildung C.6., A und Abbildung C.7., B). Da bei Parallelexperimenten alle Achromatien aus dem Stechlinsee mit den Sonden EUB338 und GAM42a hybridisierten und somit ausreichende Mengen zugänglicher rRNA enthalten, sollte es mindestens drei verschiedene Genotypen von Achromatien im Stechlinsee geben. Um diesen Genotypen auf die Spur zu kommen, wurden weitere Experimente mit verschiedenen Sondenkombinationen unternommen. Zuerst wurden die Sonden AFK433-F und AST433-CT und in einem anderen Feld des Objektträgers die Sonden AST192-F und AFK192-CT kombiniert (Abbildung C.6., B). Das Ergebnis waren auf beiden Feldern grüne oder rote, aber keine unhybridisierten *Achromatium* Zellen (Abbildung C.7., C). Ausgehend von den Resultaten dieser beiden Experimente wurden neben den bereits gezeigten Genotypen AST192/AST433 und AFK192/AFK433 ein dritter Genotyp postuliert, welcher mit den Sonden AFK192 und AST433 hybridisiert. Um diesen dritten *Achromatium* Genotyp zu visualisieren wurden auf einem Feld die Sonden AFK192-CT und AST433-F gleichzeitig eingesetzt. Es zeigten sich, wie auf dem elektronisch überlagerten Bild in Abbildung C.7., D zu sehen ist, die erwarteten grünen, roten und gelben Zellen. Die grünen Zellen repräsentieren dabei den *A. oxaliferum* Klon AST01 Genotyp AST192/AST433, die roten einen *Achromatium* sp. Genotyp AFK192/AFK433 und die gelben einen dritten Genotyp *Achromatium* sp. AFK192/AST433. Zählungen in einer Anreicherung vom Stechlinsee vom August 1998 zeigten ein Verhältnis der drei Genotypen von ca. 2:1:1. Dabei hatte der Genotyp von *A. oxaliferum* Klon AST01 einen Anteil von 49% ($\pm 12\%$), der Genotyp AFK192/AFK433 einen Anteil von 28% ($\pm 9\%$) und der dritte Genotyp einen Anteil von 23% ($\pm 12\%$) an der gesamten *Achromatium* Population.

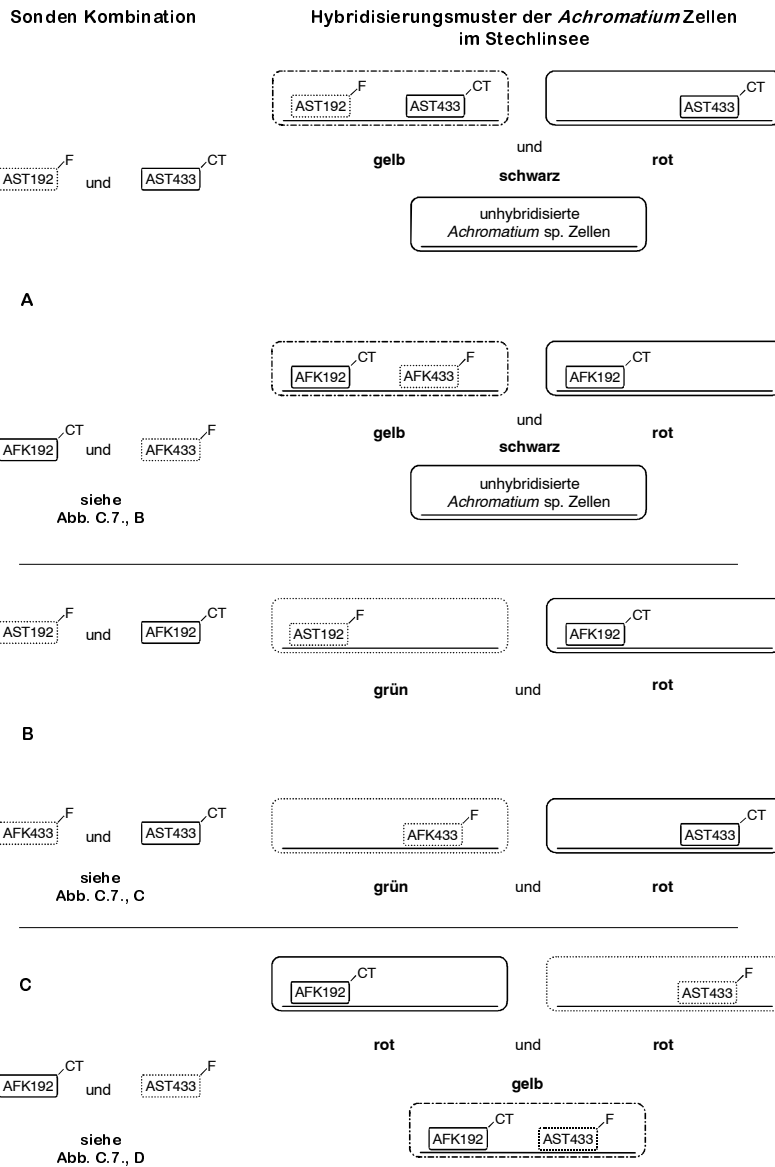
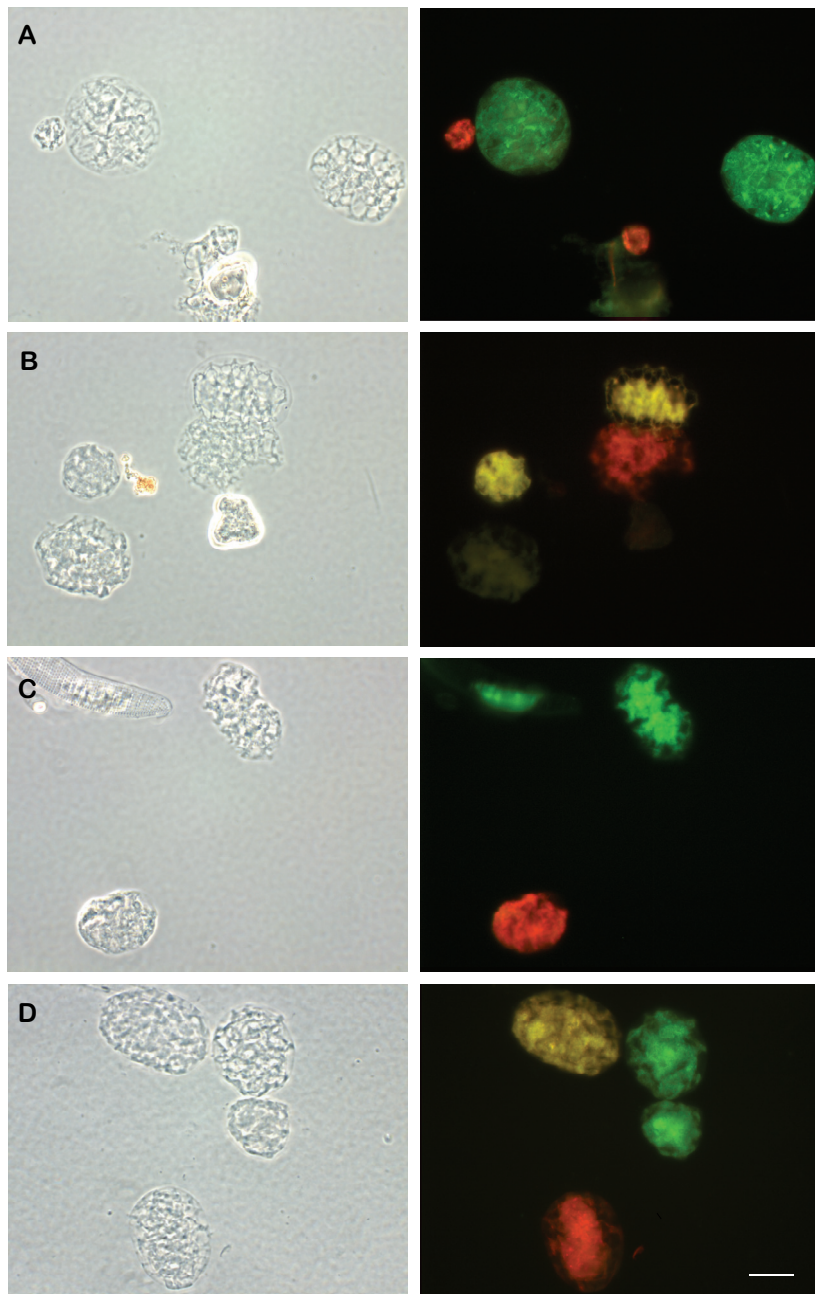


Abbildung C.6.: ↑. In situ-Genotyping von Achromatien der Stechlinseeanreicherung. Links ist die Sondenkombination und rechts das erhaltene Hybridisierungsmuster aufgetragen.

Abbildung C.7.: In situ-Hybridisierung von physikalisch angereicherten Achromatien. Identische Ausschnitte für Phasenkontrast (links) und Epifluoreszenz (rechts) werden gezeigt. (A) Doppelhybridisierung eines künstlichen Gemisches von angereicherter Stechlinsee und Fuchskuhle Achromatien mit den Sonden AFK192-CT (rot) und AST192-F (grün). (B) Doppelhybridisierung einer Stechlinseeanreicherung mit den Sonden AFK192-CT und AFK433-F. (C) Doppelhybridisierung einer Stechlinseeanreicherung mit den Sonden AST433-CT und AFK433-F. (D) Doppelhybridisierung einer Stechlinseeanreicherung mit den Sonden AFK192-CT und AST433-F. Der Balken entspricht 20 µm und gilt für alle Bilder. →



C.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen

C.3.1. Vergleich limnischer und mariner Freiwasserstandorte

C.3.1.1. Gesamtzellzahlen

Die mittels DAPI-Färbung bestimmten Gesamtzellzahlen (B.13.1) bewegten sich in der Regel zwischen 10^5 und 10^7 Zellen/ml, wobei die oligotrophen Systeme häufig im Bereich von 3×10^5 bis 9×10^5 Zellen/ml lagen und die mesotrophen Systeme zwischen $1,4 \times 10^6$ bis $7,0 \times 10^6$ Zellen/ml (Tabelle C.8.). Ausnahmen stellten das mittlere Basin des Baikalsees dar, wo in 1455 m Tiefe nur 8×10^4 Zellen/ml gezählt wurden und der an sich oligotrophe Antarktische Ozean in den Tiefen 0 und 40 m, mit Gesamtzellzahlen von $1,3 \times 10^6$ und $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml.

C.3.1.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit den Sonden EUB338 und ARCH915

Für die Bestimmung der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaften wurden die in Tabelle C.6. aufgeführten domänen- und gruppenspezifischen Sonden verwendet. Alle Sonden waren mit dem Carbocyaninfarbstoff Cy3 markiert (B.10.). Die Hybridisierung erfolgte auf Polycarbonatfiltern wie in B.11.3. beschrieben. Die Zählungen wurden wie in B.13.2. dargestellt ausgeführt.

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>	Referenz
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	0-35	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
NON338	-	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S, 338-355	0-35	(Wallner <i>et al.</i> , 1993)
ALF968	alpha-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGGTT	16S, 968-986	35	(Neef, 1997)
BET42a	beta-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
GAM42a	gamma-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
CF319a	Cytophaga-Flavobacterium Cluster des CFB ^c Phylums	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	35	(Manz <i>et al.</i> , 1996)

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>	Referenz
PLA886	<i>Planctomycetales</i>	GCCTTGCGACCATACTCCC	16S, 886-904	35	(Neef, 1997)
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCAATTCCT	16S, 915-935	20-35	(Stahl und Amann, 1991)

Tabelle C.6.: Übersicht über die angewandten domänen- und gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden. ^a*E. coli* Numerierung nach Brosius et al., 1981. ^bFormamidkonzentration (FA) im *in situ*-Hybridisierungspuffer. ^cCFB, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*.

Die Detektionsrate der für die meisten Bakterien spezifischen Sonde EUB338, lag zwischen 39% in der Nordsee und 96% bei 0 m im Antarktischen Ozean mit dem Median von 56% (k.i. 46-61%, N=26). Obwohl ebenfalls auf alle Proben angewandt, konnten mit der für die Domäne *Archaea* spezifischen Sonde ARCH915 nur im Gossenköllesee (6%), der Nordsee (3%) und dem Pazifischen Ozean (2%) sondenpositive Zellen nachgewiesen werden.

C.3.1.3. Gruppenspezifische Sonden

Zählt man die Ergebnisse aller gruppenspezifischen Sonden der jeweiligen Proben zusammen, ergibt sich, daß ca. 56% (k.i. 44-62%), der mit der Sonde EUB338 erfaßten Bakterien, einer der untersuchten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden konnten.

Vergleicht man die limnischen und marinen Freiwasserproben, so zeigten sich bei der beta-Gruppe der *Proteobacteria* signifikante Unterschiede. In den Süßwasserproben hybridisierten im Median 16% (k.i. 11-18%, N=15) der mit DAPI gefärbten Zellen mit der Sonde BET42a, was einer absoluten Zellzahl von $1,4 \times 10^5$ Zellen/ml (k.i. $9,9 \times 10^4$ - $4,2 \times 10^5$) entspricht. Im mittleren Basin des Baikalsees waren es sogar 32% der mit DAPI gefärbten Zellen. Im Gegensatz dazu, belief sich der Median der Abundanzen in den untersuchten marinen Systemen auf 0% (k.i. 0-15%, N=11). Weder in den Proben der Nordsee noch des Antarktischen Ozeans konnten beta-Proteobakterien nachgewiesen werden. In der küstennahen Probe des Pazifischen Ozeans waren es dagegen 4%. Eine Ausnahme stellte die Ostsee dar, in deren oberen, salzarmen Schichten (Salinität 7,2-8,0‰) die beta-Proteobakterien einen Anteil zwischen 15 und 29% ausmachten. In den tieferen Schichten fiel die Abundanz kontinuierlich bis hin zu 6% in einer Tiefe von 229 m (Abbildung C.8., A). Die typischen Vertreter der beta-Proteobakterien waren in allen untersuchten Systemen gerade (genannt die „Schiffchen“) oder gebogene (genannt die „Hörnchen“) Stäbchen mit einer Länge von 1,5-4,5 μm und einer Breite von 1 μm . Nur im Gossenköllesee konnten darüber hinaus auch kurze Filamente mit einer Länge von 8-13 μm beobachtet werden.

Vertreter der *Cytophaga/Flavobacterium* Gruppe, welche mit der Sonde CF319a nachgewiesen wurden, waren mit einem Median von 18% (k.i. 10-40%, N=11) in marinen Systemen dominant. Die untere Grenze stellte dabei mit 2‰ die Ostsee in 78 m Tiefe dar, die obere der Antarktische Ozean mit 72‰ (68°50.57'S 06°01.08'E, 0 m). Vertreter dieser Gruppe konnten auch in allen untersuchten Süßwasserproben nachgewiesen werden, allerdings mit einem wesentlich geringeren Median der Häufigkeiten von nur 6% (k.i. 2-12%, N=15). Der Median der absoluten Zellzahlen lag dabei bei $3,6 \times 10^5$ Zellen/ml (k.i. $1,5 \times 10^5$ - $9,4 \times 10^5$ Zellen/ml) für die marinen Proben und $7,0 \times 10^4$ Zellen/ml (k.i. $2,8 \times 10^4$ bis $1,6 \times 10^5$) für die Süßwasserproben. In den beiden Tiefenprofilen, des Großen Ostersees und des Lago di Cadagno nahmen in beiden Fällen sowohl die relativen Häufigkeiten, als auch die absoluten Zellzahlen der Cytophagen/Flavobakterien in der Tiefe zu (Abbildung C.8., B, C).

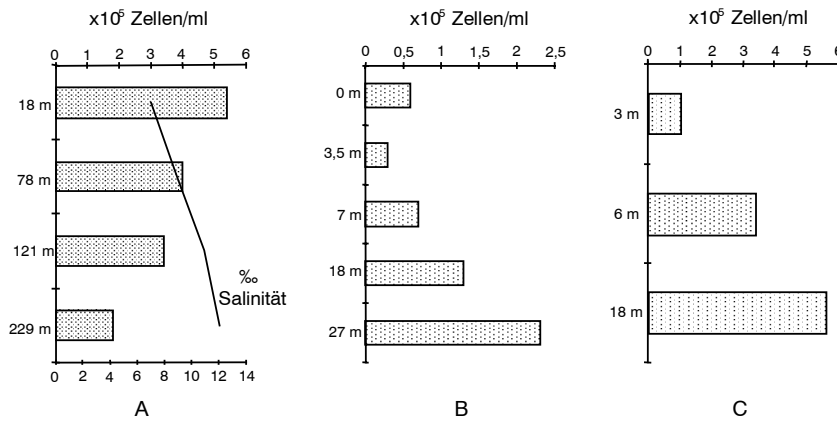


Abbildung C.8.: Absolute Zellzahlen der beta-Gruppe der Proteobacteria (A) und der Cytophaga/Flavobakterien (B, C) in verschiedenen Systemen. (A) Tiefenprofil der Ostsee; Balken: Zellzahlen, Linie: Salinität, (B) Tiefenprofil des Großen Ostersees und (C) Tiefenprofil des Lago di Cadagno.

Morphologisch vorherrschend waren bei den mit der Sonde CF319a detektierten Zellen 20-300 μm lange Filamente mit einer Breite von 0,5-1 μm . Zusätzlich dazu konnten in den Proben des Antarktischen Ozeans und des Gossenkölleesees auch kurze Stäbchen mit einer Größe von 2-3x 0,5-1 μm beobachtet werden.

Die mit der Sonde ALF968 detektierten Vertreter der alpha-Gruppe der *Proteobacteria* hatten beim Vergleich der marinen mit den limnischen Systemen signifikant höhere absolute Zellzahlen und Anteile in den marinen Proben (marin: 6%, k.i. 4-11%; $1,1 \times 10^5$ Zellen/ml, k.i. $4,2 \times 10^4$ - $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml, N=11; limnisch: 1%, k.i. 1-2%; $9,0 \times 10^3$ Zellen/ml, k.i. $3,0 \times 10^3$ - $7,0 \times 10^4$ Zellen/ml, N=15). In den Seen variierten die relativen Abundanzen zwischen 0% im

Lago di Cadagno (3 und 18 m) und 10% im Gossenköllesee. In den marinen Systemen waren es zwischen 1% der Bakterien in der Nordsee und 14% in der Ostsee (18 m), die mit der Sonde ALF968 hybridisierten. Keine einheitlichen morphologischen Kriterien konnten für die alpha-Gruppe der *Proteobacteria* gefunden werden. Sowohl Stäbchen, Vibrios und Filamente in unterschiedlichen Längen waren zu sehen.

Bei der Analyse der GAM42a-positiven Zellen war interessant, daß im Lago di Cadagno eine ungewöhnlich dichte Schicht von *Chromatium* sp. und *Amoebobacter* sp. im Metalimnion die Gesamtpopulation dominierte (13 m, 5%, $2,1 \times 10^5$ Zellen/ml). Trotz einer charakteristischen roten Autofluoreszenz dieser Zellen unterschied sich das gelb-orange Signal der Cy3 markierten Sonde GAM42a gut davon. In den marinen Proben, zeigten nur die Proben aus der Nordsee mit 6% ($4,2 \times 10^5$ Zellen/ml) und aus dem Antarktischen Ozean mit 9% ($6,3 \times 10^4$ Zellen/ml) erhöhte Abundanzen von gamma-Proteobakterien. In allen anderen Proben lag die Detektionsrate mit der Sonde GAM42a unter 4%, immer bezogen auf alle mit DAPI gefärbten Zellen. Morphologisch waren es kurze Stäbchen, ohne besondere Auffälligkeiten.

Die durch die Sonde PLA886 erfaßten *Planctomycetales* konnten in geringen Mengen (1-3%; $2,8 \times 10^4$ - $9,0 \times 10^4$ Zellen/ml) in allen Süßwasserproben detektiert werden. In den marinen Proben konnten sie nur in der Nordsee mit 1% bzw. $7,0 \times 10^4$ Zellen/ml gefunden werden. In keiner der hier untersuchten Proben waren sie zahlenmäßig abundant. Detektiert wurden große Kokken mit einem Durchmesser von über 1 μm , welche ein typisches Färbverhalten aufwiesen. Die hybridisierten Zellen zeigten starke Sondenfluoreszenz an der Zelloberfläche, und nur schwache Signale in der Mitte der Zelle. In der DAPI-Färbung zeigte sich ein umgekehrtes Bild mit einem stark gefärbten Nukleoid in der Mitte (Fuerst, 1995).

Der Anteil an autofluoreszierenden oder unspezifisch gefärbten Zellen wurde mit Hilfe der, als Negativkontrolle eingesetzten Sonde NON338 bestimmt. Mit einem Median von 5% (k.i. 2-7%) in den limnischen und nur 1% (k.i. 1-4%) in den marinen Proben war er in allen hier untersuchten Proben moderat. Kontrollen ohne Cy3-gefärbte Sonde zeigten, daß der Großteil des autofluoreszierenden Hintergrundes von chlorophyllhaltigen Zellen (z.B. Algen oder Cyanobakterien) und anorganischen Partikeln herrührte und kaum von unspezifischer Sondenbindung.

In Tabelle C.7. ist die Berechnung der Gesamtzahl aller Bakterien in aquatischen Ökosystemen und die Gesamtzahlen für die zwei dominanten phylogenetischen Gruppen gezeigt. Für die beta-Gruppe der *Proteobacteria* wurde in marinen Systemen eine Häufigkeit von 0,5% angenommen. Für die CF-Gruppe und die beta-Gruppe der *Proteobacteria* wurde vereinfachend eine Häufigkeit von 20% in marinen, respektive limnischen Systemen angenommen.

Habitat	Volumen in [cm ³]	Zellzahl/ml [x10 ⁵]	Gesamtzellzahl [x10 ²⁷]	CF-Gruppe	Beta-Gruppe
Marin				20%	0,5%
Küstengewässer	2,0x10 ²⁰	5	0,10	2,0x10 ²⁵	5,1x10 ²³
Freiwasser >200m	7,2x10 ²²	5	36	7,2x10 ²⁷	1,8x10 ²⁶
Freiwasser <200m	1,3x10 ²⁴	0,5	65	1,3x10 ²⁸	3,3x10 ²⁶
Gesamt marin	1,4x10 ²⁴		101	2,0x10 ²⁸	5,1x10 ²⁶
Limnisch				6%	20%
Seen	1,3x10 ²⁰	10	0,13	7,5x10 ²⁴	2,5x10 ²⁵
Flüsse	1,2x10 ¹⁸	10	0,0012	7,2x10 ²²	2,4x10 ²³
Grundwasser	2,3x10 ²²	3	6,9	4,1x10 ²⁶	1,4x10 ²⁷
Eis und Schnee	2,4x10 ²²	1	2,4	1,4x10 ²⁶	4,8x10 ²⁶
Gesamt limnisch	4,7x10 ²²		9,4	5,7x10 ²⁶	1,9x10 ²⁷
Gesamt Bakterien in aquatischen Systemen			111		
Gesamtzahl für die CF- und die beta-Gruppe				2,1x10²⁸	2,4x10²⁷
Anteil an Gesamt Bakterien in Prozent				18,8	2,2

Tabelle C.7.: Berechnung der bakteriellen Gesamtzahl für die dominanten phylogenetischen Gruppen in aquatischen Ökosystemen. CF-Gruppe: Cytophaga/Flavobacterium Gruppe, Beta-Gruppe: Beta-Gruppe der *Proteobacteria*. Daten aus Whitman et al., 1998, modifiziert nach Schwoerbel, 1993. Zellzahlen für Grundwasser aus Pedersen et al., 1996. Zellzahlen für Schnee und Eis geschätzt nach Alfreider et al., 1996.

Probennahmestelle	Tiefe [m]	Gesamtzellzahl [$\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$]	Sondenanteil [%] an den mit DAPI detektierten Zellen ^a							
			EUB338	ALF968	BET42a	GAM42a	CF319a	PLA886	NON338	
Gossen- köllesee	3	0,3 ($\pm 0,04$)	51 (± 4)	10 (± 3)	18 (± 2)	1 (± 1)	16 (± 2)	0	0 (± 0)	
Lago di Cadagno	6	3,2 ($\pm 0,07$)	46 (± 9)	0 (± 3)	21 (± 4)	0 (± 3)	3 (± 5)	0	7 (± 3)	
	13	4,2 ($\pm 0,7$)	61 (± 7)	2 (± 2)	17 (± 3)	5 (± 3)	8 (± 3)	1	5 (± 1)	
	18	4,7 ($\pm 0,1$)	46 (± 5)	0 (± 1)	20 (± 4)	2 (± 3)	12 (± 3)	1	6 (± 1)	
Großer Ostensee	0	3,0 ($\pm 0,3$)	46 (± 10)	3 (± 5)	14 (± 4)	1 (± 4)	2 (± 4)	3 (± 3)	3 (± 2)	
	3,5	2,8 ($\pm 0,3$)	46 (± 4)	1 (± 1)	5 (± 4)	0 (± 1)	1 (± 2)	1	2 (± 1)	
	7	3,5 ($\pm 0,4$)	49 (± 4)	2 (± 2)	3 (± 2)	0 (± 2)	2 (± 2)	1 (± 2)	5 (± 3)	
	18	2,2 ($\pm 0,4$)	59 (± 7)	1 (± 1)	16 (± 3)	1 (± 0)	6 (± 3)	2 (± 1)	0 (± 0)	
	27	3,3 ($\pm 0,5$)	61 (± 12)	3 (± 1)	11 (± 2)	0 (± 1)	7 (± 5)	1 (± 1)	1 (± 1)	
Baikalsee	0	0,6 ($\pm 0,05$)	44 (± 5)	1 (± 4)	4 (± 4)	0 (± 2)	4 (± 1)	1	12 (± 3)	
	25	0,7 ($\pm 0,04$)	55 (± 3)	1	17 (± 2)	1	10 (± 2)	2	4 (± 1)	
	1000	0,9 ($\pm 0,03$)	43 (± 3)	n.d.	15 (± 1)	4 (± 2)	n.d.	n.d.	12 (± 2)	
	1200	0,3 ($\pm 0,07$)	n.d.	1 (± 2)	n.d.	n.d.	5 (± 2)	n.d.	12 (± 2)	
	0	0,8 ($\pm 0,2$)	49 (± 10)	1	18 (± 2)	1	12 (± 3)	1	7 (± 1)	
	25	0,9 ($\pm 0,03$)	53 (± 3)	1	11 (± 2)	1	18 (± 2)	2 (± 2)	6 (± 2)	
	1255	0,3 ($\pm 0,01$)	n.d.	1 (± 1)	n.d.	n.d.	0 (± 1)	n.d.	2 (± 1)	
	1455	0,08 ($\pm 0,002$)	59 (± 4)	n.d.	32 (± 4)	0 (± 1)	n.d.	n.d.	1 (± 1)	

C. Ergebnisse

Probennahmestelle	Tiefe [m]	Gesamtzellzahl [x10 ⁶ ml ⁻¹]	Sondenanteil [%] an den mit DAPI detektierten Zellen ^a							
			EUB338	ALF968	BET42a	GAM42a	CF319a	PLA886	NON338	
Ostsee	18	3,6 (±0,4)	72 (±8)	14 (±2)	15 (±1)	3 (±2)	14 (±3)	0 (±1)	1 (±1)	
	78	1,4 (±0,2)	64 (±5)	8 (±2)	29 (±6)	0 (±1)	2 (±1)	0	4 (±1)	
	121	2,3 (±0,2)	62 (±4)	5 (±2)	15 (±2)	1	10 (±2)	0	5 (±2)	
	229	3,0 (±0,3)	66 (±7)	4 (±1)	6 (±3)	1 (±0)	12 (±1)	0	1 (±1)	
Nordsee	1	7,0 (±0,2)	39 (±3)	1	0	6 (±2)	18 (±2)	1 (±2)	1 (±2)	
Pazifischer Ozean	Playa del Rey Pier, am Ufer	3,0 (±0,03)	42 (±3)	5 (±2)	4 (±3)	4 (±2)	12 (±2)	0 (±1)	3 (±1)	
Antarktischer Ozean	68°50,57'S 06°01,08'E	1,3 (±0,09)	96 (±3)	8 (±2)	0 (±1)	7 (±2)	72 (±5)	0	1 (±1)	
	58°56,52'S 03°58,44'E	0,7 (±0,07)	85 (±4)	6 (±1)	0 (±1)	9 (±2)	40	0	1 (±1)	
	49°29,40'S 11°23,58'E	0,9 (±0,05)	57 (±10)	4 (±2)	0 (±1)	0 (±1)	19 (±3)	0	1 (±1)	
	40	1,6 (±0,1)	61 (±8)	11 (±1)	0 (±0)	1 (±1)	24 (±2)	0	1 (±0)	
	60	0,8 (±0,08)	72 (±6)	11 (±2)	0 (±0)	0 (±0)	19 (±4)	0	0 (±0)	

Tabelle C.8.: Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen in verschiedenen aquatischen Ökosystemen. ^a Detektion in Prozentanteilen von DAPI. Alle Zahlen wurden durch die Subtraktion der NON338 Werte korrigiert. In Klammern ist die Standardabweichung in Prozent angegeben. Diese wurde durch Auszählen von 10-20 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern auf einem Filterstück ermittelt.

C.3.2. Bakterielle Diversität in limnischen Ökosystemen

C.3.2.1. 16S-rDNA Genbanken

Zur Bestimmung der bakteriellen Diversität wurden insgesamt vier 16S-rDNA Genbanken aus zwei Seen angelegt. Die DNA-Isolation, Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung erfolgte wie in B.4., B.5., B.6. und B.7. beschrieben. Für Genbank I und II erfolgten die Probennahmen am Gossenköllesee im Dezember 1995 und September 1997. Die beiden Becken der Großen Fuchskuhle wurden im Mai 98 beprobt. Genbank III stammt dabei aus dem Nordostbecken und Genbank IV aus dem Südwestbecken des Sees. Die phylogenetische Analyse der bisher analysierten 26 Voll- und 51 Teilsequenzen ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

Klon-bezeichnung	Länge in Basen	Gruppe	Art	Ähnlichkeit in %	Diversitäts-gruppe
GKS59	1454	alpha-Gruppe, Rhodobacter	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	95,5	GKS A1
GKS69	1477	alpha-Gruppe, Sphingomonas subarctica et al.	<i>Sphingomonas capsulata</i>	95,7	GKS A2
GKS16	1522	beta-Gruppe	<i>Rhodofera fermentans</i>	93,9	GKS B1
GKS70	676			[96,4]	GKS B1
GKS71	644			[91,6]	GKS B2
GKS98	1524	beta-Gruppe, Bordetella et al.	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	96,2	GKS B3
GKS35	680			[98,2]	GKS B3
GKS61	630	GPHGC	<i>Streptomyces abikoensis</i>	88,1	GKS H1

Tabelle C.9.: Genbank I aus dem Gossenköllesee. Bei jedem Sequenzcluster wurde eine Sequenz ausgewählt (Vollsequenz oder ein Repräsentant) und dessen Gruppenzugehörigkeit, sowie die Ähnlichkeit zum nächsten kultivierten Verwandten angegeben (in %). [] Eckige Klammern geben, basierend auf der Teilsequenz die Ähnlichkeit zur Vollsequenz, respektive zum Repräsentanten aus der Gruppe an. GPHGC: Gram-positive Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt.

Klon-bezeichnung	Länge in Basen	Gruppe	Art	Ähnlichkeit in %	Diversitäts-gruppe
GKS215_2	1443	alpha-Gruppe,	<i>Beijerinckia indica</i>	96,5	GKS A3
GKS218_2	1445	alpha-Gruppe	<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i>	92,6	GKS A4
GKS124_2	1443	alpha-Gruppe, Sphingomonas paucimobilis et al.	<i>Blastobacter sp.</i>	97,1	GKS A5

Klon-bezeichnung	Länge in Basen	Gruppe	Art	Ähnlichkeit in %	Diversitäts-gruppe
GKS122_2	1491	beta-Gruppe	<i>Rhodoferax fermentans</i>	94,8	GKS B2
GKS77_2	646			[92,0]	GKS B1
GKS187_2	637			[99,2]	GKS B2
GKS91_2	1507	gamma-Gruppe	<i>Haemophilus ducreyi</i>	89,3	GKS G1
GKS30_2	1431	epsilon-Gruppe	<i>Helicobacter sp.</i>	75,0	GKS N1
GKS174_2	1426			[92,6]	GKS N1
GKS103_2	1469	GPHGC	<i>Streptomyces abikoensis</i>	88,2	GKS H1
GKS38_2	636			[95,4]	GKS H1
GKS79_2	636			[96,7]	GKS H1
GKS176_2	636			[95,6]	GKS H1
GKS189_2	646			[99,5]	GKS H1
GKS33_2	1463	CFB, Runella	<i>Spirosoma linguale</i>	84,5	GKS C1
GKS7_2	585			[99,5]	GKS C1
GKS15_2	599			[99,1]	GKS C1
GKS19_2	695			[99,4]	GKS C1
GKS63_2	581			[98,6]	GKS C1
GKS88_2	632			[99,4]	GKS C1
GKS111_2	675			[98,6]	GKS C1
GKS112_2	635			[98,9]	GKS C1
GKS120_2	516			[99,0]	GKS C1
GKS121_2	595			[98,6]	GKS C1
GKS142_2	357			[98,9]	GKS C1
GKS155_2	635			[99,2]	GKS C1
GKS205_2	550			[99,9]	GKS C1
GKS207_2	645			[99,2]	GKS C1
GKS208_2	430			[96,4]	GKS C1
GKS232_2	584			[98,8]	GKS C1
GKS70_2	1462	CFB, Runella	<i>Spirosoma linguale</i>	87,7	GKS C2
GKS216_2	1467	CFB, Runella	<i>Flectobacillus major</i>	93,3	GKS C3
GKS106_2	1483	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	92,2	GKS C4
GKS164_2	676			[99,7]	GKS C4
GKS217_2	1474	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	94,6	GKS C5

Tabelle C.10.: Genbank II aus dem Gossenköllesee. Bei jedem Sequenzcluster wurde eine Sequenz ausgewählt (Vollsequenz oder ein Repräsentant) und dessen Gruppenzugehörigkeit, sowie die Ähnlichkeit zum nächsten kultivierten Verwandten angegeben (in %). [] Eckige Klammern geben, basierend auf der Teilsequenz die Ähnlichkeit zur Vollsequenz, respektive zum Repräsentanten aus der Gruppe an. CFB: Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides Gruppe. GPHGC: Gram-positive Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt.

Klon- bezeichnung	Länge in Basen	Gruppe	Art	Ähnlichkeit in %	Diversitäts- gruppe
FukuNO22	1443	alpha-Gruppe, Sphingomonas subarctica et al.	<i>Sphingomonas capsulata</i>	96,1	Fuku A1
FukuNO57	600	alpha-Gruppe	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	93,1	Fuku A2
FukuNO33	1491	beta-Gruppe, Ralstonia	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	98,9	Fuku B1
FukuNO2	441			[98,4]	Fuku B1
FukuNO60	661			[99,7]	Fuku B1
FukuNO66	590			[99,5]	Fuku B1
FukuNO55	701	beta-Gruppe	<i>Rhodoferax fermentans</i>	91,5	Fuku B2
FukuNO65	661	beta-Gruppe, Bordetella et al.	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	94,2	Fuku B3
FukuNO13	1273	gamma-Gruppe	<i>Methylobacter luteus</i>	96,0	Fuku G1
FukuNO9	1510	delta-Gruppe	<i>Bdellovibrio stolpii</i>	96,1	Fuku D1
FukuNO30	1471	GPHGC	<i>Streptomyces abikoensis</i>	89,2	Fuku H1
FukuNO8	651			[99,5]	Fuku H1
FukuNO15	546			[98,5]	Fuku H1
FukuNO44	681			[99,3]	Fuku H1
FukuNO24	1488	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	91,2	Fuku C1
FukuNO3	632			[92,8]	Fuku C1
FukuNO47	651			[92,7]	Fuku C1
FukuNO50	591			[99,3]	Fuku C1
FukuNO54	651			[95,9]	Fuku C1
FukuNO21	1474	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	90,1	Fuku C2
FukuNO36	1471	CFB, Flavobakterien- Gruppe	<i>Flavobacterium aquatile</i>	95,2	Fuku C3
FukuNO63	671	CFB, Bacteroides et al.	<i>Cytophaga xylanolytica</i>	85,0	Fuku C1
FukuNO18	1235	Verrucomicrobium	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	87,2	Fuku P1
FukuNO43	449			[96,5]	Fuku P1

Tabelle C.11.: Genbank III aus dem Nordostbecken der Großen Fuchskuhle. Bei jedem Sequenzcluster wurde eine Sequenz ausgewählt (Vollsequenz oder ein Repräsentant) und dessen Gruppenzugehörigkeit, sowie die Ähnlichkeit zum nächsten kultivierten Verwandten angegeben (in %). [] Eckige Klammern geben, basierend auf der Teilsequenz die Ähnlichkeit zur Vollsequenz, respektive zum Repräsentanten aus der Gruppe an. CFB: Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides Gruppe. GPHGC: Gram-positive Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt.

Klon-bezeichnung	Länge in Basen	Gruppe	Art	Ähnlichkeit in %	Diversitäts-gruppe
FukuSW56	626	alpha-Gruppe, Sphingomonas subarctica et al.	<i>Sphingomonas capsulata</i>	96,1	Fuku A1
FukuSW35	650	beta-Gruppe, Ralstonia	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	98,9	Fuku B1
FukuSW12	589			[99,8]	Fuku B1
FukuSW21	600			[99,7]	Fuku B1
FukuSW36	650			[98,4]	Fuku B1
FukuSW5	1479			GPHGC, Microthrix	<i>Microthrix parvicella</i>
FukuSW24	651			[99,8]	Fuku H2
FukuSW23	1477	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Flexibacter sancti</i>	89,2	Fuku C5
FukuSW20	334	CFB, Haliscomenobacter et al.	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	89,3	Fuku C1
FukuSW27	1298	Verrucomicrobium	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	90,2	Fuku P1

Tabelle C.12.: Genbank IV aus dem Südwestbecken der Großen Fuchskuhle. Bei jedem Sequenzcluster wurde eine Sequenz ausgewählt (Vollsequenz oder ein Repräsentant) und dessen Gruppenzugehörigkeit, sowie die Ähnlichkeit zum nächsten kultivierten Verwandten angegeben (in %). [] Eckige Klammern geben, basierend auf der Teilsequenz die Ähnlichkeit zur Vollsequenz, respektive zum Repräsentanten aus der Gruppe an. CFB: Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides Gruppe. GPHGC: Gram-positive Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt.

Betrachtet man die Gesamtzahl der Klone in den einzelnen phylogenetischen Gruppen (Abbildung C.9.) zeigt sich mit 31 Klonen eine deutliche Dominanz der *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* Gruppe über den beta-Proteobakterien (18). Mit 12 Klonen nehmen die Gram-positiven Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt vor den alpha-Proteobakterien (8) die dritte Position ein. Die gamma- und delta-Proteobakterien, sowie die *Planctomycetales* waren nur mit wenigen Klonen in den Genbanken vertreten. Zwei Sequenzen aus dem Gossenköllesee konnten mit dem derzeitigen Datensatz keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden.

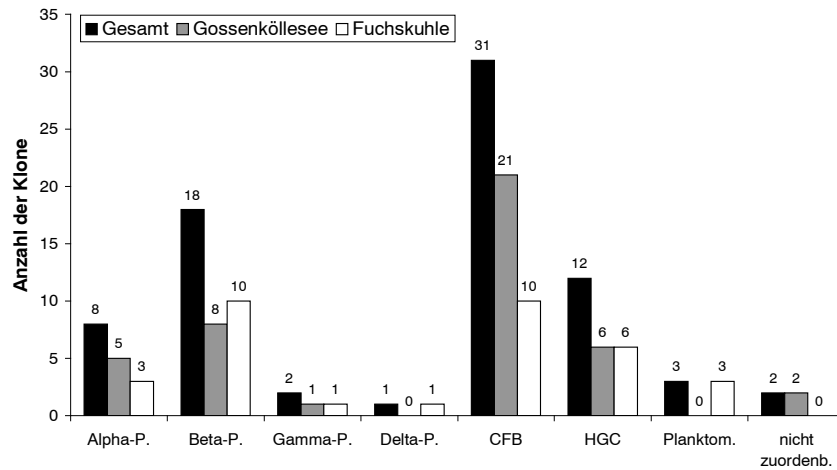


Abbildung C.9.: Verteilung der Klone aus den vier Genbanken auf die phylogenetischen Gruppen. CFB: *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* Gruppe. HGC: Gram-positive Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt.

Schätzt man durch die Bildung eines Quotienten aus der Anzahl der Diversitätsgruppen und der Anzahl der analysierten Klone die Diversität in den Genbanken ab, so zeigt das Nordostbecken der Fuchskuhle mit 13 Diversitätsgruppen aus 24 Klonen einen Wert von 0,54 und das Südwestbecken mit 6 Diversitätsgruppen und 10 Klonen einen Wert von 0,60. Die im Dezember 1995 angelegte Genbank I aus dem Gossenköllesee zeigt mit 8/32 einen Wert von 0,25 (in der Tabelle C.9. sind 26 untereinander sehr ähnliche Plastidsequenzen nicht aufgeführt). Genbank II aus dem Gossenköllesee zeigt einen Wert von 0,40 bei 14 Diversitätsgruppen und 35 Klonen. Der Mittelwert der Quotienten beider Becken der Fuchskuhle zusammen ist mit 15 Diversitätsgruppen und einer Gesamtzahl von 34 Klonen gleich 0,42. Einen Gesamtdiversitätsquotienten für den Gossenköllesee zu berechnen, erscheint nicht sinnvoll, da bei den beiden Genbanken unterschiedliche Primer zur Amplifikation der 16S-rDNA verwendet wurden.

Betrachtet man die aus den verschiedenen Genbanken erhaltenen Sequenzen, konnten unabhängig vom See in den verschiedenen phylogenetischen Gruppen oft ähnliche Sequenzen gefunden werden. Dennoch gibt es fast in allen Gruppen auch Sequenzen, die nur in einem der beiden Seen zu finden waren. Auch Vertreter der delta-Gruppe der *Proteobacteria* und die *Planctomycetales* waren nur in den Genbanken der Fuchskuhle vorhanden. Trägt man die Anzahl neuer Klone zur Anzahl der analysierten Klone auf (Abbildung C.10.), zeigt sich, daß

bei jeder der vier Genbanken davon ausgegangen werden muß, daß bei der Analyse weiterer Klone auch weitere noch nicht in den Genbanken vorhandene Sequenzen gefunden werden. Eine „Sättigung“ ist demnach noch nicht eingetreten. Bemerkenswert ist, daß nur zwei der Sequenzen einen Ähnlichkeitswert über 97,0% zu einem beschriebenen Organismus aufwiesen (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die meisten Sequenzen bewegten sich im Bereich von 87-96% Ähnlichkeit zum nächsten Verwandten in der Datenbank.

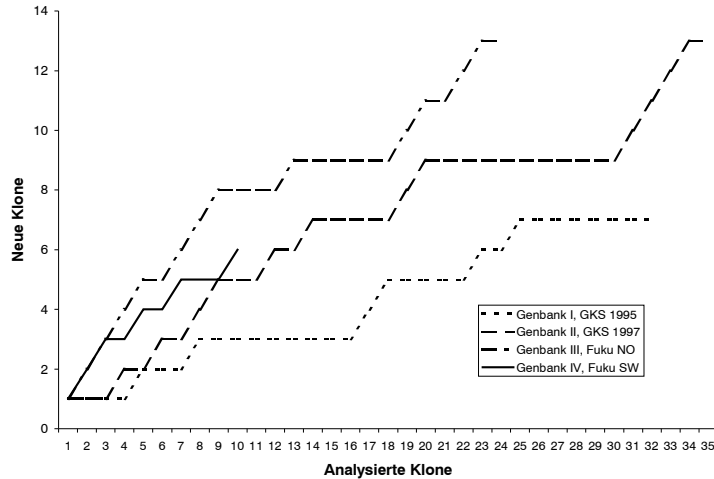


Abbildung C.10.: Analyse der „Sättigung“ der einzelnen Genbanken.

C.3.2.2. Stammbäume

Die aus den Genbanken erhaltenen Sequenzdaten wurden wie in B.8. beschrieben mit Hilfe des Programmpaketes ARB verrechnet und zur Rekonstruktion von Stammbäumen eingesetzt. Der in der Abbildung C.11. in A und B gezeigte Stammbaum basiert auf einem nach dem Maximum-Likelihood Verfahren berechneten Grundbaum, bei dem nur Sequenzen mit einer Länge von mind. 1400 Basen zugelassen wurden. Hochvariable Bereiche wurden dabei durch entsprechende Filter ausgeschlossen, wodurch dem Rechenverfahren noch ca. 1300 informative Basen zur Verfügung standen. Dieser Baum wurde mit Hilfe des Programmes ARB_Parsimony durch ausgewählte Partialsequenzen erweitert, ohne eine Veränderung der Topologie des Gesamtbaumes zuzulassen. Zusätzlich zu den in ARB vorhandenen Sequenzen wurden aus den Datenbanken (EMBL, EBI, De Wachter, RDP) weitere, aus dem Pelagial limnischer Systeme stammende 16S-rDNA Sequenzen importiert. Ziel war es dabei, eine möglichst vollständige Datenbank für die vergleichende Analyse der neu aus den Genbanken

I-IV erhaltenen Sequenzdaten zur Verfügung zu haben, um eventuell vorhandene „Süßwassercluster“ zu verifizieren. Bei sehr ähnlichen Sequenzen wird im Stammbaum nur eine, für den Cluster repräsentative Sequenz gezeigt. Die Sequenzen stammen aus folgenden Habitaten und Veröffentlichungen: ACK, Adirondack Bergseen im Bundesstaat New York, USA (Hiorns *et al.*, 1997). ARC, Toolik See in der Antarktis, USA (Bahr *et al.*, 1996). GVB, „Gas vacuolated bacteria“ im Eis und Wasser der Antarktis, USA (Gosink und Staley, 1995). BKL, Baikalsee, Rußland, diese wurden mir von Herrn Dr. Zaitchikov (Institut für Limnologie in Irkutsk, Rußland) zur Verfügung gestellt. LD, Loosdrechter See in den Niederlanden (Zwart *et al.*, 1998), GWS, Grundwasser gefülltes Bohrloch in Schweden (Pedersen *et al.*, 1996).

Die im folgenden beschriebenen Cluster wurden auf Grund ihrer im Baum gezeigten Verwandtschaft festgelegt. Dabei wird dann von einem Cluster gesprochen, wenn mindestens zwei aus verschiedenen Habitaten stammende Sequenzen einen klar abgetrennten Ast bilden. Eine auf Ähnlichkeitswerten beruhende Abgrenzung durch Definition eines Schwellenwertes war nicht möglich, da bei den Partialsequenzen z.T. nur kurze überlappende Bereiche zur Erstellung einer Ähnlichkeitsmatrix vorhanden sind.

In der beta-Gruppe der *Proteobacteria* zeigen sich vier Cluster, die jeweils von Sequenzen aus verschiedenen Süßwasserhabitaten gebildet werden. Das Cluster BETA I um *Polynucleobacter necessarius*, einem Endosymbionten von *Euplotes aedicularis*, umfaßt sowohl Sequenzen aus der Fuchskuhle (Fuku), Sequenzen der Adirondack Seen (ACK), eine Sequenz aus einem mit Grundwasser gefüllten Bohrloch in Schweden (GWS), eine Sequenz aus dem Loosdrechter See in Holland (LD) und eine Sequenz aus dem Toolik See in der Antarktis (ARC).

Im BETA II Cluster befinden sich außer *Alcaligenes xylosoxidans* nur jeweils eine Sequenz aus dem Gossenköllesee und eine Sequenz aus der Fuchskuhle.

Der Beta III Cluster beinhaltet keine Sequenzen aus den Genbanken dieser Arbeit, jedoch Sequenzen aus der Arktis, aus New York und den Niederlanden.

Eine räumlich sehr breit gefächerte Ansammlung von Sequenzen findet sich im Cluster BETA IV. Dort sind Vertreter aus der Fuchskuhle, dem Gossenköllesee, dem Baikalsee (BKL), den Adirondack Seen, dem Toolik See und aus dem Wasser/Eis der Antarktis (GVB) zu finden. *Rhodofera fermentans* ist dabei der nächstverwandte kultivierte Vertreter. Eine weitere Unterteilung in die Subcluster a, b und c ist denkbar, da die Ähnlichkeitswerte der Sequenzen

in den Subclustern bei über 95% liegen, zwischen den Subclustern jedoch nur bei ca. 87-91%. Darüberhinaus beinhaltet das Beta IV c Cluster eine Sequenz aus der Antarktis (GVB 34-P) die aus einem Bakterium stammt, das auch auf NaCl-haltigen Medien wachsen kann (Gosink und Staley, 1995).

Bei den gamma-Proteobakterien konnte nur ein kleines Cluster mit einer Sequenz aus dem Baikalsee und einer aus der Fuchskuhle um *Methylobacter luteus* gefunden werden. Darüber hinaus gab es nur eine weitere zu den gamma-Proteobakterien gehörende Sequenz, die mit 89,3% Ähnlichkeit zu *Haemophilus ducreyi* verwandt ist.

Die Gruppe der alpha-Proteobakterien zeigt eine Fülle von divergierenden Sequenzen. Phylogenetisch können drei Cluster definiert werden. Cluster ALPHA I umfaßt Sequenzen aus dem Gossenköllesee, dem Baikalsee und den Adirondack Seen, die zum kultivierbaren Bakterium *Beijerinckia indica* verwandt sind.

Der ALPHA II Cluster besteht aus Sequenzen der Fuchskuhle und dem Gossenköllesee um *Sphingomonas capsulata*.

Im Cluster ALPHA III sind Sequenzen aus dem Gossenköllesee, dem Baikalsee und eine Sequenz, die in den Neuston-Anreicherungskulturen zusammen mit *Nevskia ramosa* gefunden wurde (C.1.3.). Der kultivierte Vertreter in diesem Cluster ist *Blastobacter* sp..

Drei weitere Sequenzen wurden in den hier vorgestellten Genbanken gefunden, die jedoch kein Cluster bilden. Die Sequenzen FukuNO_57, GKS_59 und GKS_218_2 sind mit *Nitrobacter hamburgensis* (93,1% Ähnlichkeit), *Rhodobacter sphaeroides* (95,5% Ähnlichkeit) und *Roseococcus thiosulfatophilus* (92,6% Ähnlichkeit) verwandt.

In der delta-Gruppe der *Proteobacteria* wurde nur eine Sequenz aus der Fuchskuhle gefunden, die eine Ähnlichkeit von 96,1% zu *Bdellovibrio stolpii* aufweist.

Die Sequenzen der Gram-positiven Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt bilden zwei klar getrennte Cluster. HGC I beinhaltet Sequenzen aus der Fuchskuhle, dem Gossenköllesee und dem Baikalsee. Der nächstverwandte Organismus ist dabei *Streptomyces abikoensis*. Im Baum wurde diese Sequenz durch die fast identische aber längere Sequenz von *Streptomyces rimosus* ersetzt. Ob eine weitere Untergliederung in Subcluster sinnvoll ist, kann erst entschieden werden, wenn weitere Sequenzen verfügbar sind.

Der HGC II Cluster gruppiert sich um *Microthrix parvicella* mit Sequenzen aus dem Baikalsee, den Adirondack Seen und der Fuchskuhle.

In der *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* Gruppe können zwei Cluster mit globaler Ausdehnung gefunden werden. In der *Runella* Gruppe kann das Cluster CFB I mit einer Sequenz aus dem Gossenköllesee und Sequenzen aus den Adirondack Seen um *Flectobacillus major* definiert werden. Die Repräsentanten zweier Sequenzcluster um *Spirosoma linguale*, mit den meisten Klonen in der Genbank II (GKS_33_2 und GKS_70_2), scheinen zwar im Gossenköllesee stark vertreten zu sein, bilden aber derzeit keine Cluster mit Sequenzen aus anderen Habitaten.

In der *Bacteroides* Gruppe findet sich nur eine Sequenz aus der Fuchskuhle, die eine Ähnlichkeit von 85,0% zu *Cytophaga xylanolytica* aufweist.

Das gleiche gilt für die *Flavobacterium* Gruppe, in der sich ebenfalls nur eine Sequenz aus der Fuchskuhle mit einer Ähnlichkeit von 95,2% zu *Flavobacterium aquatile* befindet.

Die *Haliscomenobacter* Gruppe zeigt eine Zweiteilung: Die einzelne zu *Haliscomenobacter hydrossis* näher verwandte Sequenz GKS_217_2 (94,6% Ähnlichkeit) und das große CFB II Cluster. Dieses besteht aus Sequenzen der Fuchskuhle, dem Gossenköllesee und den Adirondack Seen. Eine weitere Unterteilung in die Subcluster a und b ist denkbar. Dabei beinhaltet das Subcluster CFB II a derzeit, außer dem aus der Fuchskuhle stammenden Isolat AH_47, noch keinen kultivierten Vertreter. Interessant ist in diesem Zusammenhang die große Ähnlichkeit (99,7%) der Sequenz FukuNO_21 mit dem Isolat AH_47. Der Subcluster CFB II b dagegen gruppiert sich um den kultivierten Vertreter *F. ferrugineum*. Die Sequenz FukuSW_23 weist zwar eine Ähnlichkeit von 89,2% mit *Flexibacter sancti* auf, steht aber phylogenetisch getrennt von allen CFB-Clustern.

Eine bemerkenswerte Anzahl von Sequenzen aus den unterschiedlichsten Habitaten ist mit der *Verrucomicrobium* Gruppe verwandt. Sowohl Sequenzen aus der Fuchskuhle, dem Loosdrechter See, als auch den Adirondack Seen finden sich um den kultivierten Vertreter *Verrucomicrobium spinosum* ein.

Zwei Sequenzen aus der Genbank II (GKS_30_2 und GKS_174_2) konnten keiner der bestehenden phylogenetischen Gruppe sicher zugeordnet werden. Das Alignment zeigt jedoch eindeutig, daß es sich um 16S-rRNA Sequenzen handelt. Phylogenetische Analysen indizieren eventuell eine Verwandtschaft mit der epsilon-Gruppe der *Proteobacteria*, allerdings liegen die Ähnlichkeitswerte mit ca. 75% zu *Helicobacter* sp. sehr niedrig.

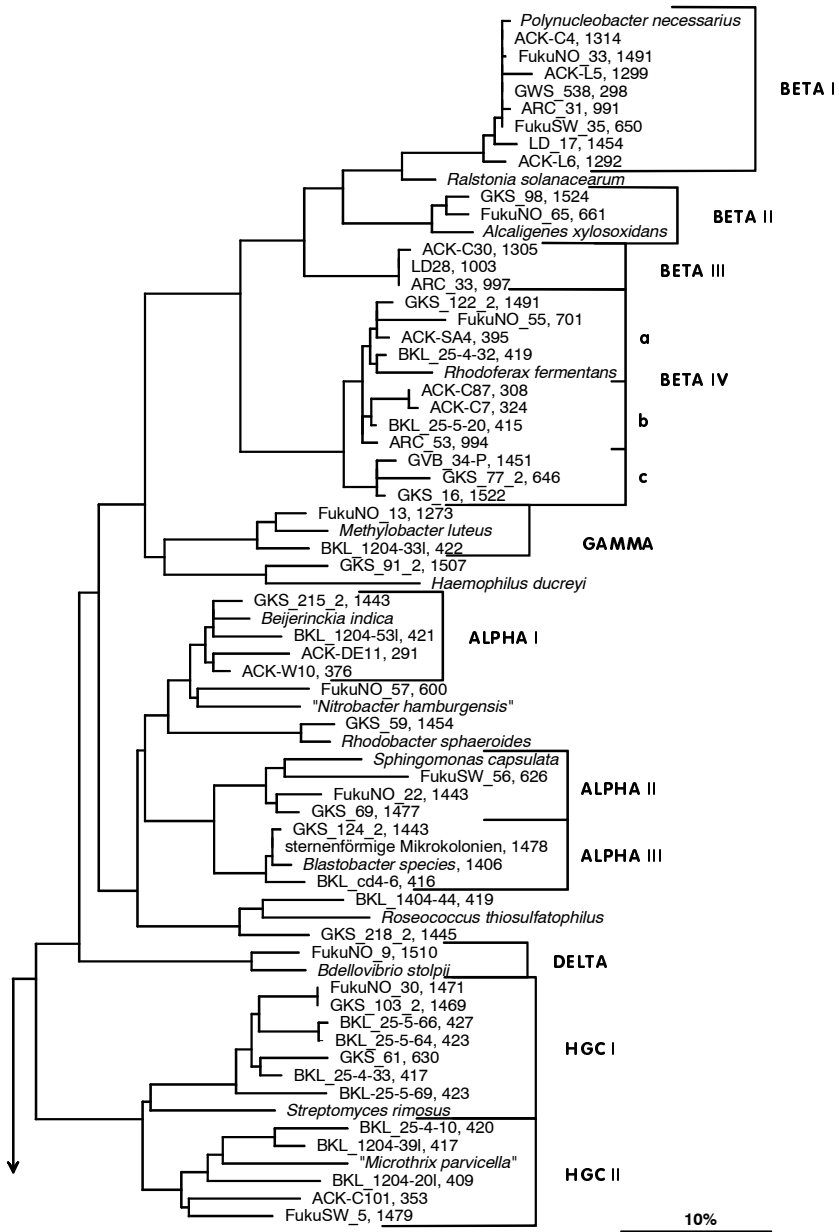


Abbildung C.11.(A): Phylogenetischer Baum, der aus den Vollsequenzen der Genbanken I-IV und ausgesuchten Vertretern der entsprechenden Gruppen rekonstruiert wurde. Der Baum wurde anschließend durch Addition von Partiaalsequenzen erweitert, ohne eine Änderung der Topologie des Grundbaumes zu erlauben. Der Balken gibt 10% Sequenzunterschiede an.

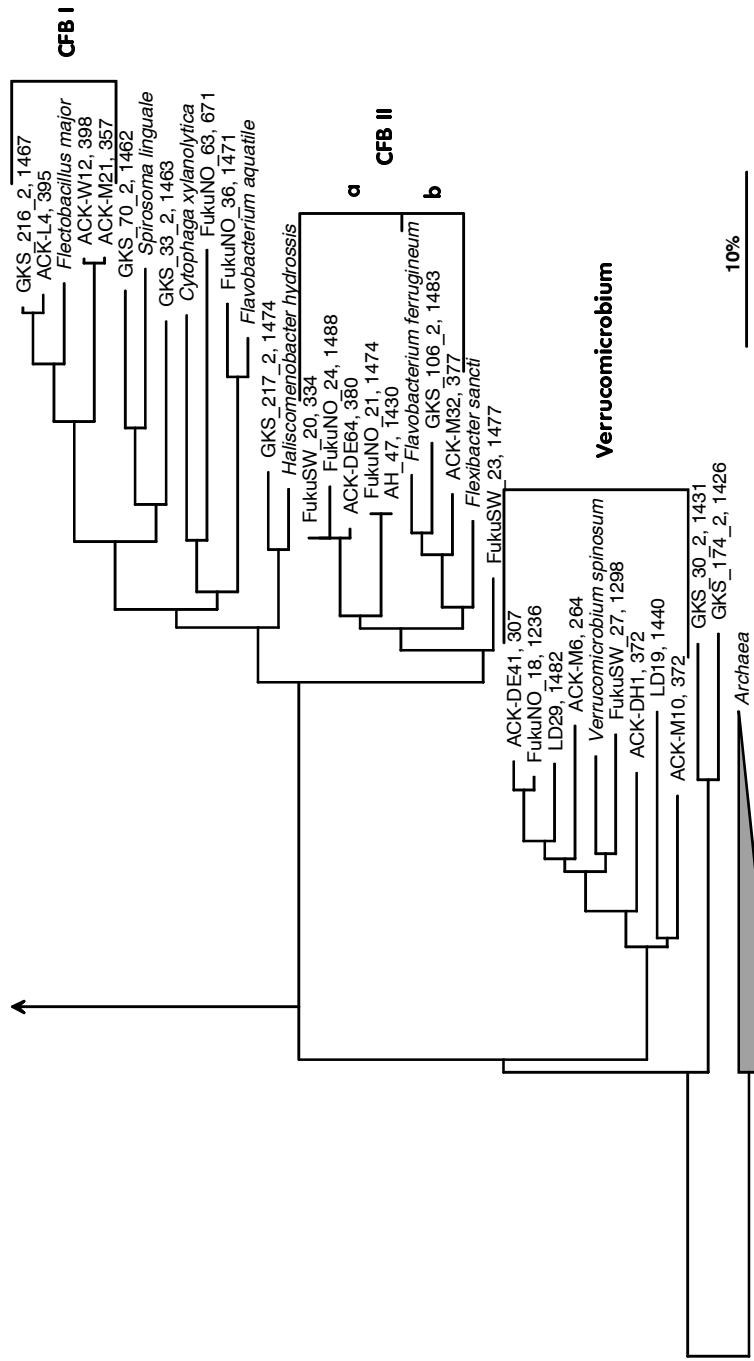


Abbildung C.II.(B): Phylogenetischer Baum, der aus den Vollsequenzen der Genbanken I-IV und ausgesuchten Vertretern der entsprechenden Gruppen rekonstruiert wurde. Der Baum wurde anschließend durch Addition von Partialsequenzen erweitert, ohne eine Änderung der Topologie des Grundbaumes zu erlauben. Der Balken gibt 10% Sequenzunterschiede an.

C.3.2.3. Entwicklung klonspezifischer Sonden

Basierend auf der Genbank I (Gossenköllesee, Dezember 1995) wurden für jeden der zwei Klone aus der alpha- (GKS59, GKS69) und beta- (GKS16, GKS98) Gruppe der *Proteobacteria* klonspezifische Sonden entwickelt. Zur Absicherung, daß bei der *in situ*-Hybridisierung nur eine Population verfolgt wird, wurden für jeden Klon jeweils zwei Sonden an unterschiedlichen Positionen der 16S-rRNA entwickelt (Tabelle C.13.).

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Zielmolekül und Zielregion ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>
GKS16-63	GKS_16, GKS_77_2, GVB_34-P	TGCTACTCTACCGTTCG	16S, 63-80	20
GKS16-442	GKS_16, GKS_77_2	GAACCGTTTCGTTCCGTA	16S, 442-460	20
GKS59-220	GKS_59	GGGCAATCCCTTCCC	16S, 220-236	30
GKS59-1434	GKS_59	CAGGTTGGCGCACCACCT	16S, 1434-1452	30
GKS69-218	GKS_69	GGGCTCATCCTTCGGCGA	16S, 218-236	35
GKS69-1451	GKS_69	GGTCAGCTGCCTCCTTTG	16S, 1451-1469	(20-)35
GKS98-646	GKS_98, GKS_35, FukuNO_65	GACATACTCTAGCTCGG	16S, 646-663	35
GKS98-1459	GKS_98	CCCCACCGTGGTAATCGC	16S, 1459-1477	(20-)35

Tabelle C.13.: Neuentwickelte klonspezifische Sonden, basierend auf den 16S-rDNA Sequenzen der Genbank I. Dickgedruckte Sonden wurden zum *in situ*-Monitoring im Gossenköllesee eingesetzt. ^a*E. coli* Numerierung nach Brosius et al., 1981. ^bFormamidkonzentration (FA) im *in situ*-Hybridisierungspuffer.

Die Überprüfung der Spezifität der Sonden mit Hilfe der, wie in C.3.2.2. beschrieben, erweiterten Datenbank ergab, daß die Sonde GKS16-63 keinen Sequenzunterschied zum Klon GKS_77_2 und zur Sequenz eines beta-Proteobakteriums aus der Antarktis aufweist. Die Sonde GKS16-442 zeigt ebenfalls keine Fehlpaarungen zum Klon GKS_77_2 und die Sonde GKS98-646 ist auch zu den Klonsequenzen GKS_35 und FukuNO_65 komplementär. Bei Testhybridisierungen, bei denen alle acht Sonden hintereinander auf verschiedene fixierte Proben aus dem Gossenköllesee eingesetzt wurden, zeigten alle Sonden gute Signale und die Sondenpaare hybridisierten jeweils mit der gleichen Population. Dennoch zeigten sich zwischen den Sondenpaaren Unterschiede in den Signalstärken. Die Sonden an den Positionen 442, 1434, 1451 und 1459 waren dabei heller als die Sonden an den Positionen 63, 220, 218 und 646. Da die Sondenpaare morphologisch äquivalente Populationen detektierten, wurde die Bestimmung der Hybridisierungsbedingungen mittels *in-vitro*-Transkription, sowie die *in situ*-Hybridisierung zur Bestimmung der saisonalen Abundanzen nur mit den signalstärkeren Sonden durchgeführt.

Die Bestimmung der Hybridisierungsbedingungen für die einzelnen Sonden erfolgte mittels *in-vitro*-Transkription wie in B.9. beschrieben. Für die Sonden GKS16-442, GKS59-1434, GKS69-1451 und GKS98-1459 wurden die Schmelztemperaturen durch slot blot-Hybridisierung bei steigender Formamidkonzentration ermittelt. Alle Sonden zeigten die typischen sigmoiden Schmelzkurven (Abbildung C.12.).

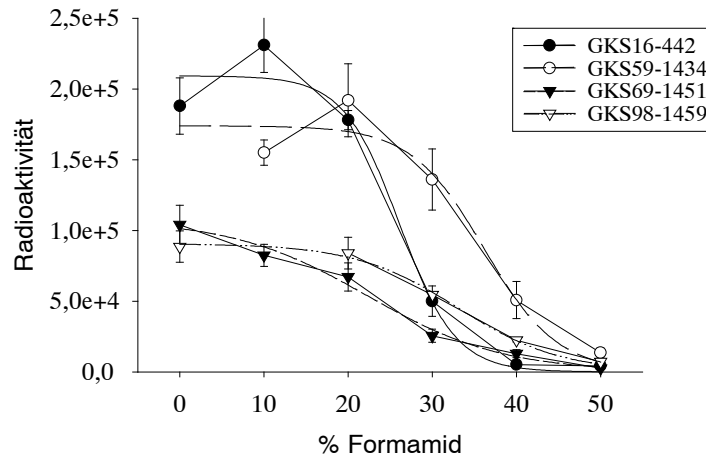


Abbildung C.12.: Hybridisierung von rRNA Transkripten aus 16S-rDNA Klonen mit den entsprechenden klon-spezifischen Sonden.

Zusätzlich wurden die Signalstärken aller Sonden in Formamidreihen (0-70%) durch *in situ*-Hybridisierung auf fixierten Proben vom Gossenköllesee optisch evaluiert. Die optimalen Hybridisierungsbedingungen für die einzelnen Sonden sind in Tabelle C.13. angegeben.

C.3.2.4. FISH mit domänen-, gruppen- und klon-spezifischen Sonden

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft wurde mit den in Tabelle C.6. angegebenen domänen- und gruppenspezifischen Sonden hybridisiert. Eine Zusammenfassung der über den ganzen Probennahmezeitraum gemittelten Detektionsraten für die einzelnen Gruppen in Prozent zu DAPI gibt Abbildung C.13.. Genauere Daten über die saisonalen Abundanzen sind in Pernthaler *et al.*, 1998 veröffentlicht.

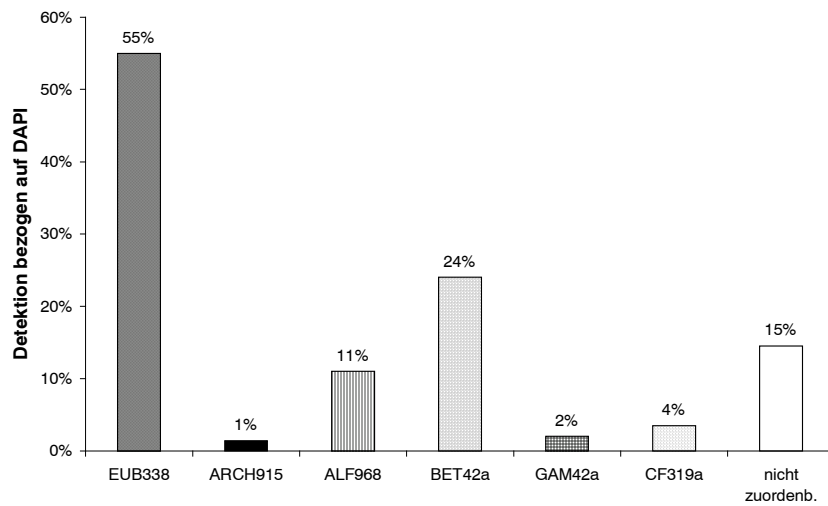


Abbildung C.13.: Mittelwerte, der für die einzelnen Sonden erhaltenen Abundanzen bezogen auf DAPI im Beprobungszeitraum vom Juli 96 bis zum Juni 97.

Die entwickelten klonspezifischen Sonden konnten zur Studie der saisonalen Abundanzen der einzelnen Populationen erfolgreich im Gossenköllesee angewandt werden (Pernthaler *et al.*, 1998). Die mit den Sonden GKS16-442, GKS69-1451 und GKS98-1459 detektierten Populationen zeigten Detektionsraten von 0-6% bezogen auf DAPI. Im Jahresmittel konnte mit den beiden Sonden GKS16-442 und GKS98-1459 ca. $\frac{1}{4}$ der mit der BET42a detektierten beta-Proteobakterien Population erfaßt werden. Alle drei Populationen zeigten ausgeprägtes saisonales Verhalten und unterschiedliche Häufigkeiten in den verschiedenen Tiefen. Mit der Sonde GKS59-1434 konnten nur sporadisch Zellen gefunden werden, deren Abundanz meist unter 1% bezogen auf DAPI lag. Eine Zusammenfassung gibt Abbildung C.14., Details sind in (Pernthaler *et al.*, 1998) veröffentlicht.

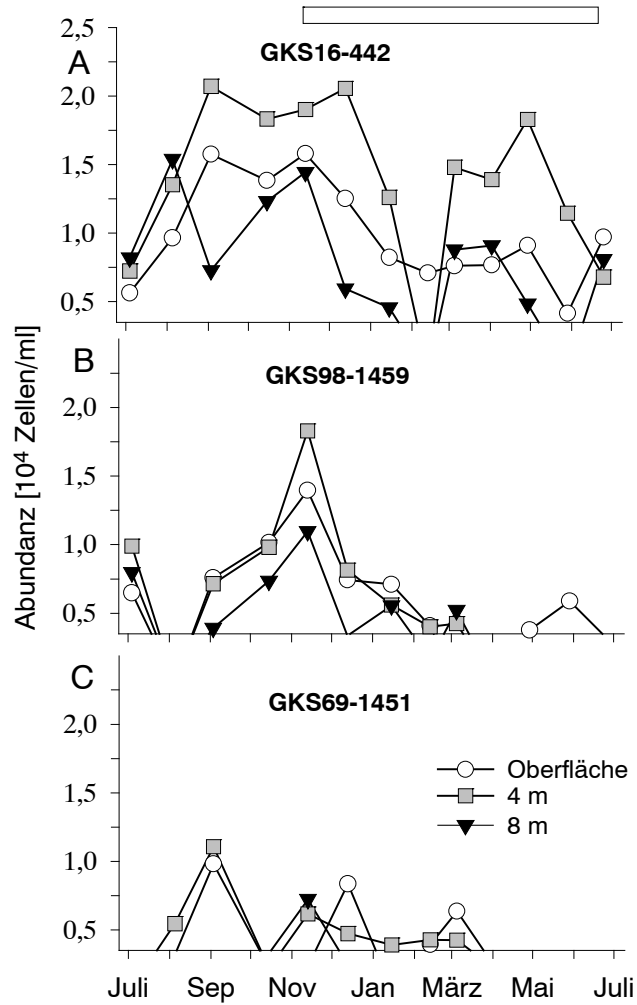


Abbildung C.14.: Saisonale Abundanz der mit der Sonde (A) GKS16-442 (beta-Proteobakterium), (B) GKS98-1459 (beta-Proteobakterium) und (C) GKS69-1451 (alpha-Proteobakterium) hybridisierenden Populationen. Das Rechteck zeigt eine geschlossene Eisdecke auf dem See an.

D. Diskussion

D.1. Phylogenie und *in situ*-Identifizierung von

Nevskia ramosa

Nevskia ramosa wurde erstmals im Jahre 1892 von Famintzin, als ein stäbchenförmiges, leicht gebogenes Bakterium mit kugelförmigen Einschlüssen beschrieben. Ein typisches Merkmal ist das Ausbilden von flachen Rosetten auf der Oberfläche von ruhigen Süßwasserseen. Ihre Entstehung beruht auf einer unilateralen Schleimabsonderung an der konkaven Seite nach der Zweiteilung des Bakteriums. Bei einem Durchmesser von 0,4 bis 1,0 μm wurden Längen zwischen 1,0 und 5,8 μm angegeben (Hirsch, 1991), in der Originalpublikation sprach Famintzin sogar von einer Größe von $2 \times 6\text{-}12 \mu\text{m}$. Bedingt durch das Fehlen einer Reinkultur, basierte die Identifizierung von *N. ramosa*, in den letzten hundert Jahren nur auf mikroskopischen Beobachtungen. Obwohl es immer wieder an verschiedenen Orten gefunden wurde (Henrici und Johnson, 1935; Babenzien, 1989; Hirsch, 1991), galt es zu Beginn dieser Arbeit als unkultivierbar und seine phylogenetische Zuordnung war unklar. Ziel dieses Projekts war es, mit Hilfe des kultivierungsunabhängigen rRNA-Ansatzes (Amann *et al.*, 1995) die Phylogenie von *N. ramosa* aufzuklären und spezifische Oligonukleotidsonden für seine eindeutige *in situ*-Identifizierung zu entwickeln.

D.1.1. Anreicherungskultur

Als Ausgangsmaterial wurde eine Anreicherungskultur verwendet, bei der davon ausgegangen wurde, daß sie zwei Populationen beinhaltet. Einerseits einen sternenförmige Mikrokolonien bildenden Kontaminanten, andererseits dünne gebogene Stäbchen, wie sie typisch für *N. ramosa* sind (Famintzin, 1892; Babenzien, 1989; Hirsch, 1991). Auffallend war, daß nicht alle, der für *N. ramosa* gehaltenen Zellen, die unilaterale Schleimabsonderung zeigten und sich einige auch außerhalb der für *N. ramosa* typischen Rosettenform aufhielten. Die Arbeitshypothese dazu war, daß es sich um unterschiedliche Wachstumsstadien von *N. ramosa* handelt (Babenzien, 1989).

D.1.2. Gruppenspezifische Sonden

Um einen ersten Eindruck von der Zusammensetzung der Anreicherungskultur zu bekommen, wurden generelle Sonden, wie die für die meisten Bakterien spezifische Sonde EUB338 und gruppenspezifische Sonden, eingesetzt. Dabei wurde klar, daß sich hinter den morphologisch kaum unterscheidbaren dünnen gebogenen Stäbchen zwei genetisch unterschiedliche Populationen verbargen. Dies ist nicht weiter ungewöhnlich, wenn man die geringe morphologische Bandbreite bei Bakterien bedenkt. Diese anfängliche Untersuchung der Kultur mit gruppenspezifischen Sonden enthüllte aber nicht nur genetische Heterogenität hinter morphologischer Homogenität, sie erlaubte auch Voraussagen über die phylogenetische Zugehörigkeit der verschiedenen Populationen. Bei retrospektiver Betrachtung, der aus der Genbank erhaltenen phylogenetischen Daten zeigt sich, daß das sternförmige, Mikrokolonien bildende, phasendichte Stäbchen in Übereinstimmung mit den Hybridisierungsergebnissen tatsächlich ein Vertreter der alpha4-Gruppe der *Proteobacteria* ist. Auch der Vertreter des Clusters I (NO2/11) konnte durch die Genbank in seiner Zugehörigkeit zu der alpha-Gruppe der *Proteobacteria* bestätigt werden. Der Vertreter des Clusters II (NO4/10), von dem wir jetzt als *N. ramosa* sprechen können, zweigt tief in der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* ab. Interessanterweise hybridisierte diese Population in der Anreicherungskultur nur mit der Sonde EUB338, aber nicht mit der für die gamma-Gruppe der *Proteobacteria* spezifischen Sonde GAM42a. Da diese Sonde auf die 23S-rRNA gerichtet ist, ist es nicht möglich einen Probe_Match auf die jetzt bekannte 16S-rRNA Sequenz von *N. ramosa* durchzuführen, um eventuelle Fehlpaarungen zu erkennen. Erst kürzlich jedoch wurde von Buchholz-Cleven und Mitarbeitern (1997) für das tief abzweigende gamma-Proteobakterium *Xanthomonas* sp. ebenfalls das Fehlen der GAM42a-Bindungsstelle beschrieben. Diese Ergebnisse sind in Zukunft bei der Anwendung der Sonde GAM42a zu beachten. Derzeit ist zwar noch kein Fall bekannt geworden, bei der diese Sonde Organismen außerhalb der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* erfaßt, jedoch scheinen nicht alle Vertreter der tief abzweigenden gamma-Proteobakterien mit ihr zu hybridisieren. Da die Datensätze heutzutage rapide zunehmen, sollte die Spezifität aller Sonden regelmäßig überprüft werden.

D.1.3. Phylogenie

Die vergleichende 16S-rRNA-Analyse der Sequenz von *N. ramosa* zeigt eine Ähnlichkeit von nur 87,9 bis 88,9% zu den nächsten kultivierten Verwandten in der *Xanthomonas* Gruppe. Im Laufe dieser Arbeit konnte *N. ramosa* durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Cypionka an der Universität Oldenburg in Reinkultur gebracht werden. Dabei stammte eines der Isolate (Soe1, DSMZ 11499^T) aus der gleichen Anreicherungskultur, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Ein anderes Isolat konnte aus einem Graben bei Oldenburg isoliert werden (OL1, DSMZ 11500; Stürmeyer *et al.*, 1998). Der Vergleich der beiden Isolate mit der Sequenz von NO4/10 zeigte eine Ähnlichkeit von 99,8% zwischen NO4/10 und Soe1 und 98,6% zwischen NO4/10 und OL1. Die 16S-rRNA-Daten widersprechen nicht der Einordnung aller drei Sequenzen bzw. Kulturen zu einer Art, *N. ramosa*. Die Tatsache, daß überhaupt Unterschiede, wenn auch nur geringe von 0,2% (\approx 3 Nukleotiden) zwischen der klonierten Sequenz und der Sequenz der Reinkultur Soe1 existieren, kann an PCR (Meyerhans *et al.*, 1990; Cariello *et al.*, 1991; Weller *et al.*, 1991; Reysenbach *et al.*, 1992; Rainey *et al.*, 1994) und Sequenzierfehlern, oder bei Vorhandensein von mehreren rRNA Operons, an Sequenzheterogenitäten zwischen den Operons liegen (Ogasawara *et al.*, 1994; Fleischmann *et al.*, 1995; Nübel *et al.*, 1996).

Nach der Publikation der Ergebnisse (Glöckner *et al.*, 1998; Stürmeyer *et al.*, 1998) wurde mir durch eine Arbeitsgruppe in Canada die Sequenz des Isolats LX1 übersandt. Dieses weist eine Ähnlichkeit von 93,2% zu *N. ramosa* (NO4/10) auf und gruppiert sich phylogenetisch stabil mit *N. ramosa*. Dieses Isolat ist somit zur Zeit der zu *N. ramosa* nächstverwandte Organismus. Die 16S-rRNA-Daten legen eine Einordnung als eine neue Art der Gattung *Nevskia* nahe. Im Sinne des polyphasischen Ansatzes zur Bakterientaxonomie sind hierzu jedoch weitere Untersuchungen wie z.B. eine DNA-DNA Hybridisierung der vorhandenen Reinkulturen notwendig. Leider ist die dazugehörige Arbeit unveröffentlicht und die einzige mir derzeit bekannte Information ist, daß das Isolat aus einem Toluoldämpfe abbauenden Kompostbiofilter stammt. Das Isolat LX1 repräsentiert, zusammen mit den Stämmen Soe1 und OL1 im Moment die einzigen Vertreter in einem tief abzweigenden Ast der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* (Abbildung C.1., A). Die Reinkulturen sind auch deshalb sehr wichtig, da es bedingt durch die geringen Ähnlichkeiten zu anderen kultivierten Organismen praktisch unmöglich ist, Aussagen über ihre Physiologie aus der phylogenetischen Stellung abzuleiten. Die separate Stellung von *N. ramosa* kann die spezielle Adaption an seinen besonderen Standort – das Neuston – widerspiegeln. Dieser ist von starken schädigenden

Einflüssen wie z.B. hoher UV-Strahlung, aber auch von einer erhöhten Nährstoffkonzentration geprägt (Lambert und Sommer, 1997; Stürmeyer *et al.*, 1998). Aus der Taxonomie kann eines mit Sicherheit gesagt werden: *N. ramosa* ist weder mit den *Caulobacteriales* (Henrici und Johnson, 1935), welche zu der alpha-Gruppe der *Proteobacteria* gehören, noch zu den beta-Proteobakterien, wie *Gallionella* sp. (Krassilnikov, 1959) verwandt. Auch eine enge Verwandtschaft mit den *Beggiatoales* (Prévot, 1961), oder der Gattung *Thiobacterium* (Skerman, 1959) kann ausgeschlossen werden.

Für die beiden anderen Bakterien der Anreicherungskultur ergibt sich ein anderes Bild. Die Sequenz für die phasendichten, sternförmige Mikrokolonien bildenden Stäbchen (NO22) hat eine Ähnlichkeit von 97,2% mit der 16S-rRNA des Bakteriums *Blastobacter* sp. und die 16S-rRNA Sequenz von *Mycoplana bullata* ist zu 97,6% ähnlich mit der Sequenz für das zweite dünne Stäbchen (NO2/11). *Blastobacter* paßt gut in diese Anreicherungskultur, da es einerseits im Neuston beheimatet und andererseits bekannt für seine sternförmigen Mikrokolonien (Hirsch, 1991) ist. Über das natürliche Habitat von *M. bullata* verwandten Organismen ist dagegen fast nichts bekannt. Offensichtlich konnte es sich in unserer Anreicherungskultur gut vermehren, ob es allerdings auch ein typischer Vertreter in den natürlichen Neuston-Gemeinschaften ist, muß in weiteren Studien mit Hilfe der hier entwickelten Sonden herausgefunden werden. Weiterhin ist unklar, ob es sich bei den beiden Populationen um neue Arten der entsprechenden Gattungen handelt. Dies kann erst nach der Kultivierung der beiden Organismen und einer DNA-DNA Hybridisierung mit den nächstverwandten Arten geklärt werden.

D.1.4. Neuentwickelte Sonden

Die Sondentechnologie hat auch Ihre Gefahren und es gibt viele Möglichkeiten bei der Hybridisierung mit neu entwickelten Sonden falsch-positive, oder falsch-negative Resultate zu erzielen (Amann *et al.*, 1995). Um diese so weit wie möglich auszuschließen, wurden pro Zielsequenz zwei Sonden entwickelt. Nur für NO22, dessen Morphologie sich gut von den anderen Populationen der Anreicherungskultur unterscheiden ließ, wurde nur eine Sonde entwickelt. Unter stringenten Bedingungen hybridisierten alle fünf Sonden (ALF921, NAL656, NAL1208, NEV177 und NEV656) mit nur einer der drei Population in der Anreicherungskultur. Dabei zeigten sich zwischen den zwei Sondenpaaren leichte Helligkeitsunterschiede. Beim Vergleich der Sondenpaare NAL657 und NAL1208, sowie NEV177 und NEV656 zeigten die Sonden in der Bindungsregion 650-680 hellere Signale. Da

die jeweiligen Sondenpaare mit den gleichen Zellen inkubiert wurden, kann es sich nicht um unterschiedliche Penetration, oder Anzahl von Zielmolekülen handeln, sondern höchstwahrscheinlich um Unterschiede in den *in situ*-Zugänglichkeiten der Sondenbindungsregionen (Amann *et al.*, 1995). Auch in anderen Studien (Snaird *et al.*, 1997) hat sich die Region zwischen den Positionen 650 und 680 als sehr gut zugänglich für 16S-rRNA gerichtete Sonden erwiesen. Da es sich bei dieser Region, wie auch bei der Region der Sonde NEV177 um Positionen mit mittlerer Konserviertheit handelt, kann mit den derzeit vorhandenen *N. ramosa* Sequenzen nicht entschieden werden, ob die Sonden art- oder gattungsspezifisch sind. Zur Sequenz von Isolat LX1 zeigen jedoch beide Sonden drei Unterschiede und sollten deshalb nicht mit diesem Isolat hybridisieren. Die Anwendung der beiden Sonden auf die Reinkulturen Soe1 und OL1 verlief erwartungsgemäß erfolgreich (Glöckner *et al.*, 1998; Stürmeyer *et al.*, 1998).

Die hier vorgestellten Sonden NEV177 und NEV656 wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau Ottenjann am ICBM der Universität Oldenburg auf Anreicherungs- und Reinkulturen von *N. ramosa* ähnlichen Bakterien aus verschiedenen Gewässern angewandt. Dabei konnte gezeigt werden, daß *N. ramosa* tatsächlich ein weitverbreiteter Organismus der Wasser-Luft-Grenzschicht in Gewässern ist. Darüber hinaus konnten in dieser Diplomarbeit weitere rosettenbildende Organismen des Neustons, die der gamma- und alpha-Gruppe der *Proteobacteria* angehörten, angereichert und isoliert werden (Ottenjann, 1998). Zum Teil wichen die mit Sonden und durch weitere molekularbiologische Methoden mit hoher Sicherheit *N. ramosa* zugeordneten Anreicherungen und Reinkulturen erheblich von der typischen Dichotomie ab. Dies belegt erneut, daß selbst bei Bakterien mit relativ auffälligen phänotypischen Merkmalen die Untersuchung, stabiler genotypischer Charakteristika die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Identifizierung steigern kann. Abbildung D.1. zeigt zwei Anreicherungskulturen, die mit den Sonden NEV656 und NEV177 hybridisierten. Die Anreicherungskultur Nr. 5 stammte dabei aus einer Regentonne in Oldenburg und die Anreicherung Nr. 16 aus einem Wassergraben im Vehnemoor in der Nähe von Oldenburg.

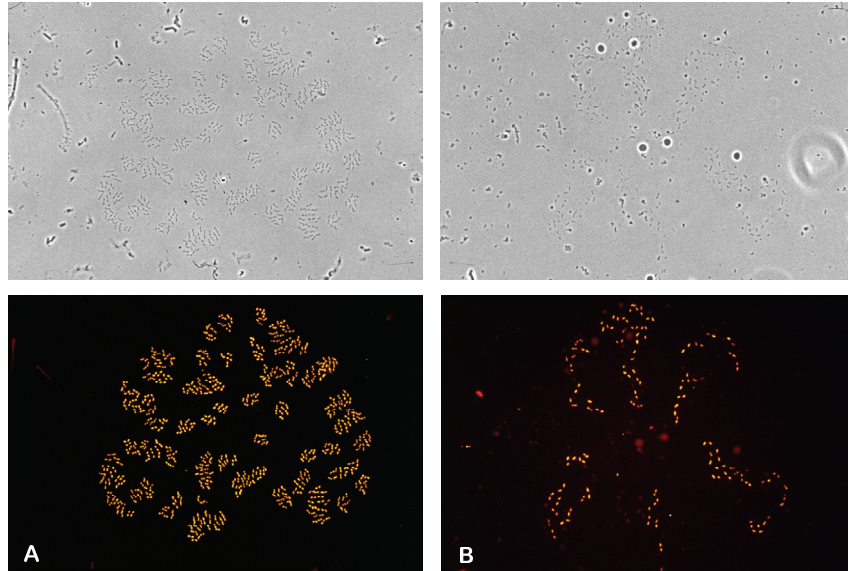


Abbildung D.1.: In situ-Hybridisierung zweier Anreicherungskulturen. Phasenkontrast- (oben) und Epifluoreszenzaufnahme (unten) für jeweils den gleichen Ausschnitt. (A) Anreicherungskultur 16 mit Sonde NEV656-CT (rot) (B) Anreicherungskultur 5 mit Sonde NEV656 in CT (rot). Mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Cypionka und Frau Ottenjann.

D.2. Phylogenie und Diversität von *Achromatium oxaliferum*

Ähnlich wie *Nevskia ramosa* ist *A. oxaliferum* ein sehr „altes“ Bakterium. Gefunden wurde es zum ersten Mal 1891 von Lauterborn, seine Beschreibung erfolgte zwei Jahre später durch Schewiakoff (1893). Seit dieser Zeit gab es immer wieder Berichte über Achromatien. Fundorte waren dabei die verschiedensten Sedimente des Süßwassers und des Meeres und neue Aspekte dieses ungewöhnlichen farblosen Schwefelbakteriums traten zu Tage (Bersa, 1920; Skuja, 1948; Lackey und Lackey, 1961; Starr und Skerman, 1965; De Boer *et al.*, 1971; La Riviere und Schmidt, 1989; La Riviere und Schmidt, 1991). Sein Lebensraum ist die Wasser-Sediment-Grenzschicht, die durch das gleichzeitige Vorhandensein von Schwefelwasserstoff- und Sauerstoffgradienten geprägt ist. Was macht dieses Bakterium so einzigartig? Vor allen Dingen seine Größe. Die Zellen des Süßwasserbakteriums *A. oxaliferum* werden als rund, eiförmig oder zylindrisch mit einer minimalen Länge von 5 μm und einer maximalen Länge von 125 μm beschrieben (La Riviere und Schmidt, 1991). Auffallend sind insbesondere die Unmengen an Kalkeinlagerungen und Schwefeltröpfchen, die die Zellen praktisch vollständig ausfüllen. Im Unterschied zu *N. ramosa* war es bis heute nicht möglich, eine Reinkultur des Bakteriums zu erlangen. Wichtige Ergebnisse konnten jedoch durch Studien an physikalisch angereicherten Achromatien erzielt werden. Durch vergleichende 16S-rRNA-Sequenzanalyse konnte *A. oxaliferum* einem tief abzweigenden Ast der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* zugeordnet werden (Head *et al.*, 1996). Zudem gibt es Hinweise, daß *Achromatium* fähig ist, reduzierte Schwefelverbindungen zu Sulfat zu oxidieren (Gray *et al.*, 1997).

Eine Fundstelle für Achromatien in Deutschland ist die Mecklenburgisch-Brandenburgische Seenplatte. Dort wurde im Sediment des Stechlinsees seit Jahren die typische *Achromatium oxaliferum* Population gefunden und studiert. (Babenzien, 1991; Babenzien und Sass, 1996). Bei der Untersuchung der verschiedenen Seen zeigte sich überraschenderweise im sauren Weichwassersee Große Fuchskuhle eine morphologisch homogene und wesentlich kleinere *Achromatium* Population. Ziel dieses Projektes war es, eine mögliche phylogenetische Diversität zwischen den beiden Achromatien Populationen der beiden Seen zu ermitteln und die *in situ*-Populationsstruktur mit Hilfe von Achromatien-spezifischen 16S-rRNA Oligonukleotidsonden aufzuklären.

D.2.1. Mechanische Anreicherungen

Auch für die hier dargestellten Studien dienten als Ausgangspunkt von Herrn Babenzien freundlicherweise zur Verfügung gestellte, physikalische Anreicherungen von Achromatien aus dem Stechlinsee und der Fuchskuhle (De Boer *et al.*, 1971; La Riviere und Schmidt, 1989; La Riviere und Schmidt, 1991; Babenzien und Sass, 1996; Head *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997). *Achromatium* ist mit maximal 1×10^4 Zellen/cm³ Sediment weniger zahlenmäßig als vom Biovolumen her ein wichtiger Bewohner dieser Sedimente. Dies wird deutlich, wenn man bedenkt, daß eine typische *Achromatium* Zelle ein Volumen von ca. 10^5 „normalen“ Zellen aufweist (Babenzien und Sass, 1996). In oberflächennahen Wattenmeersedimenten wurden ca. $4,5 \times 10^9$ Zellen/cm³ gezählt, was einem Biovolumenanteil (VT) der „normalen“ Zellen von $4,5 \times 10^9$ entspricht (Llobet-Brossa *et al.*, 1998). Berechnet man den Biovolumenanteil, den *Achromatium* darin beanspruchen würde (1×10^4 Zellen/cm³ \times 1×10^5 = 1×10^9 VT) käme man auf einen Anteil von ca. 20%. Gray und Mitarbeiter (1997) sprechen im Rydal See sogar von 90%. Ein Teil davon ist bedingt durch die großen Kalkkristalle sicherlich Totvolumen, aber selbst wenn man die Zahlen halbiert, bleibt für *Achromatium* immer noch ein Biovolumenanteil von beeindruckenden 10-45%. Die *in situ*-Hybridisierung mit den gruppenspezifischen Sonden zeigte für die Achromatien beider Seen eine Zugehörigkeit zur gamma-Gruppe der *Proteobacteria* und bestätigte damit die Resultate von Head und Mitarbeitern (1996). Eine Vorbehandlung mit 1 M HCl, oder die Abänderung der Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers, wie ebenfalls bei Head und Mitarbeitern (1996) beschrieben, war nicht nötig, da unspezifische Sondenbindung am Kalk, oder Autofluoreszenz bei frisch fixierten Achromatien kein Problem darstellte. In der konfokalen Laserscanning-Aufnahme einer hybridisierten *A. oxaliferum* Zelle aus dem Stechlinsee (Abbildung D.2., links) sind die Kalkeinlagerungen gut zu erkennen.

D.2.2. Phylogenie

Vorstudien von Frau Nina Springer in den Jahren 1993/94 hatten gezeigt, daß die Reinheit physikalischer Achromatienanreicherungen nicht für eine direkte Sequenzierung ausreicht. Trotz Reinigung enthielt das Ausgangsmaterial außer *Achromatium* noch zahlreiche Kontaminanten (Springer und Ludwig, unveröffentlicht). Deshalb wurden in dieser Arbeit die Anreicherungen als Ausgangsmaterial für zwei 16S-rDNA Genbanken verwendet. Die Genbank aus dem Stechlinsee, bei der 16S-rRNA-Universalprimer für die PCR verwendet wurden, zeigte neben den gewünschten Achromatien Sequenzen zusätzliche, mit

verschiedenen Phyla verwandte Sequenzen. Der Hauptteil davon (45%) fiel in die Ordnung der *Verrucomicrobiales*. Diese scheinen in den verschiedensten Habitaten einschließlich der Süßwasserseen weit verbreitet zu sein (Liesack und Stackebrandt, 1992; Zwart *et al.*, 1998). Für die der zweiten *Achromatium* Genbank vorgeschaltete PCR aus der Fuchskuhlen-Anreicherung wurde erfolgreich ein für die Sequenz AST01 entwickelter Vorwärtsprimer (ACH65F) verwendet (Tabelle B.2.). Dieser war komplementär zu der Sequenz der Sonde ACH62 und wurde zur Angleichung der Schmelztemperatur an den Primer 630R am 3'-Ende um drei Basen gekürzt (Tabelle C.5.). Diese Region wurde ausgewählt, da die Sonde ACH62 bei 0% FA mit Achromatien der Fuchskuhle hybridisierte. Wie erwartet zeigten die sechs ansequenzierten Klone nur mit der 16S-rRNA von *Achromatium* verwandte Sequenzen.

Phylogenetisch bilden die drei Vollsequenzen *A. oxaliferum* Klon 5 (Rydal), *A. oxaliferum* Klon AST01 (Stechlinsee) und „*A. minus*“ Klon AFK57 (Fuchskuhle) mit nur 86,2 bis 90,5% Ähnlichkeit zu den nächstkultivierten Organismen einen eigenen Cluster in einem tief abzweigenden Ast der gamma-Gruppe der *Proteobacteria*. Alle Baumberechnungsverfahren gruppieren die Sequenzen zusammen mit *Rhabdochromatium* sp. und *Chromatium* sp. (Abbildung C.3.). Wie durch die Mehrfachabzweigungen angezeigt, kann die Abfolge der tief abzweigenden Äste in der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* mit dem derzeitigen Datensatz nicht aufgelöst werden. Nach dem Einrechnen der schon von Head und Mitarbeitern (1996) publizierten Sequenzen in diesen Baum zeigten sich zwei distinkte Cluster (Abbildung C.4.). Cluster A, im folgenden auch *A. oxaliferum* Cluster genannt, zeigt in allen vorhandenen Sequenzen das ungewöhnliche Sekundärstrukturmotiv in der V6 Region und den Pentaloop in Helix 11. Auf Grund der Unvollständigkeit der restlichen Sequenzen kann im Moment noch nicht entschieden werden, ob es sich um ein generelles Charakteristikum aller Sequenzen im *A. oxaliferum* Cluster handelt. Die mir freundlicherweise von Herrn Head zur Verfügung gestellte, noch nicht publizierte Vollsequenz von *A. oxaliferum* Klon 1 zeigt jedoch ebenfalls diese Besonderheiten. Die Sequenzen in Cluster B sind mit Ähnlichkeitswerten von größer 96% zu „*A. minus*“ Klon AFK57 verwandt (Abbildung C.4.) und phylogenetisch klar von Cluster A getrennt. Unterstützt wird dies auch dadurch, daß keine der Vollsequenzen von „*A. minus*“ Klon AFK57 und *A. oxaliferum* Klon 7, 8 (Rydal) die ungewöhnliche Sekundärstruktur aufweist. Die beiden letztgenannten Vollsequenzen wurden mir ebenfalls von Herrn Head zur Verfügung gestellt. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß nur die Sequenz des Klons AFK57 nicht den Pentaloop in Helix 11 aufweist, wie er in allen anderen Achromatien Sequenzen zu finden ist. Trotz der Unterschiede in den Sequenzen gruppieren alle Rechenverfahren Cluster A und B immer zusammen und weisen

somit auf eine Monophylie der Gattung *Achromatium* hin.

Bemerkenswerterweise gibt es innerhalb der *Chromatium-Rhabdochromatium-Achromatium* Gruppe eine erhebliche Größenvarianz bei einer Tendenz zum „Riesenwuchs“. Zum Beispiel ist *Chromatium minutissimum* mit einer Größe von 1,0-1,2x 2,0 μm ein fast normal großes Bakterium, während *C. okenii* schon 5x 20 μm erreichen kann (Pfennig und Trüper, 1991). *Rhabdochromatium marinum* ist ein großes, langes Stäbchen mit 1,5-1,7x 16-32 μm (Dilling *et al.*, 1995), aber auch von kleinen Arten wie *R. minus* wurde berichtet (Winogradsky, 1888). Bei den Achromatien zeigen *A. oxaliferum* mit Längen von bis zu 125 μm das obere Ende der Skala an und „*A. minus*“ vertritt mit 10x 15 μm die kleinere Art. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dies die morphologische Konsequenz aus der intrazellulären Einlagerung von Schwefel und Kalk.

D.2.3. Physiologie

Selbst wenn man alle möglichen Fallstricke, die sich aus der Extrapolation der Physiologie aus der Phylogenie ergeben, in Betracht zieht (Teske *et al.*, 1994), bleibt es verlockend, aus der stabilen monophyletischen Verwandtschaft von *Achromatium* sp. mit den bereits kultivierten Arten von *Chromatium* sp. und *Rhabdochromatium marinum* Schlüsse auf die Physiologie zu ziehen. Die Gattungen *Chromatium* und *Rhabdochromatium* sind phototrophe Organismen, die organische Verbindungen und CO_2 als C-Quelle nutzen können, Schwefelverbindungen oxidieren und den Schwefel intrazellulär ablagern. An physikalischen Anreicherungen von Achromatien konnte ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Beteiligung der Achromatien an der Oxidation von Schwefelverbindungen gezeigt werden (Gray *et al.*, 1997). Ob allerdings *Achromatium* sp. CO_2 fixieren kann ist noch unklar. Versuche von Herrn Babenzien die entsprechende Aktivität des Enzyms Ribulosebisphosphatcarboxylase nachzuweisen, verliefen bisher negativ. Ob und in wie weit das eingelagerte CaCO_3 für den C-Haushalt der Zelle als Puffer, oder Akkumulator dienen kann, bleibt zu erforschen. Zu bemerken ist noch, daß die starke Tendenz von *Achromatium* Zellen Autofluoreszenz zu zeigen, ein Hinweis auf rudimentäre, von einem ehemals phototrophen Vorfahren übriggebliebene Pigmente sein kann. Hier wäre es möglich mit molekularbiologischen Verfahren nach den entsprechenden Genen (z.B. *Puf*-Gene) zu fahnden. Reinkulturen statt Anreicherungskulturen könnten dabei die Beantwortung der offenen Fragen beschleunigen.

D.2.4. Neuentwickelte Sonden

Um sicherzustellen, daß keine falsch-positiven oder falsch-negativen Resultate erhalten werden, wurden für jede der beiden Sequenzen *A. oxaliferum* Klon AST01 und „*A. minus*“ Klon AFK57 jeweils zwei spezifische Sonden entwickelt. Mit Blick auf die weiteren für Achromatien publizierten 16S-rRNA-Sequenzen (Head *et al.*, 1996) kann die Sonde AST433 als generelle Sonde für den Cluster A und AFK433 als Sonde für den Cluster B eingesetzt werden. Eine Ausnahme bildet nur *A. oxaliferum* Klon 1 (Rydal), der drei Fehlpaarungen zu der Sonde AST433 aufweist und auch phylogenetisch innerhalb des Clusters A etwas abseits liegt (Abbildung C.4.). Im Gegensatz dazu können die Sonden AST192 und AFK192 als klonspezifische Sonden eingesetzt werden. Eine Ausnahme bildet dabei die Sonde AST192, da sie auch die Sequenz von *A. oxaliferum* Klon 6 (Rydal) erfaßt. Es sollte daher möglich sein, mit dem hier entwickelten SONDENSATZ die Zusammensetzung von Achromatien Populationen in anderen Habitaten aufzuklären. Nicht unerwähnt sollte bleiben, daß die Sonden AFK433 und AST433 sich nur in einer Base in der Mitte der Sequenz unterscheiden (Tabelle C.5.). Wie bereits früher beschrieben war es mit Hilfe von Kompetitorsonden möglich einen Unterschied von nur einer Base sicher zu diskriminieren (Manz *et al.*, 1992).

Während der epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der hybridisierten und DAPI-gefärbten *Achromatium* Zellen zeigte sich ein eher ungewohntes Bild. Die DAPI-Färbung zeigte ein sehr heterogenes fast granuläres Muster (Abbildung D.2., rechts). Zuerst wurde angenommen, daß die vielen kleinen DAPI-gefärbten Partikel die Begleitflora auf der Zelloberfläche von *Achromatium* sp. darstellen. Allerdings waren diese Zellen weder im Phasenkontrast sichtbar, noch mit einer der gruppenspezifischen Sonden hybridisierbar. Ein Hinweis darauf, daß es sich wohl eher um diskrete DNA-Ansammlungen in der Zelle handeln könnte, liefert schon Schewiakoff in seiner ersten Publikation zu *A. oxaliferum* (Schewiakoff, 1893). Er beschreibt mehr oder weniger zahlreiche kleine runde Körperchen an den Knotenpunkten des Wabengerüsts (Kalkgerüsts), welche sich mit Hämatoxylin matt bläulich bis rotviolett färben. Im weiteren spricht er von diesen Gebilden als Chromatinkörnchen, die sich zerteilen können und zu dieser Zeit auch in verschiedenen pflanzlichen und tierischen Zellen nachgewiesen wurden (Schewiakoff, 1893). Ob Schewiakoff und seine Kollegen damals bereits DNA gesehen haben, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden. Bekannt ist jedoch, daß Hämatoxylin heute noch in der Medizin eingesetzt wird, um dem Zellkern eine blaue Farbe zu verleihen. Warum die DNA von *Achromatium* diese Form annimmt, respektive, ob es sich tatsächlich um Kernäquivalente handelt, konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht

abschließend geklärt werden.

Vergleicht man durch *in situ*-Hybridisierung die Struktur der Achromatienanreicherungen beider Seen miteinander, wird klar, daß der Stechlinsee, im Gegensatz zur genetisch homogenen Population der Fuchskuhle, eine beträchtliche genetische Diversität in seiner Achromatien Gemeinschaft aufweist. In der untersuchten Probe konnte eine 2:1:1 Mischung aus *A. oxaliferum* Klon AST01, *Achromatium* sp. Genotyp AFK192/AFK433 und einem dritten Genotypen *Achromatium* sp. AFK192/AST433 nachgewiesen werden. Über die 16S-rRNA Sequenz der beiden *Achromatium* sp. Genotypen ist im Moment außer, daß sie die Signaturen für die entsprechenden Sonden besitzen, praktisch nichts bekannt und über ihre Entstehung kann nur spekuliert werden. Die, aus dem Stechlinsee angelegte Genbank zeigte ebenfalls nur den mit 49% Abundanz dominanten Genotyp von *A. oxaliferum* Klon AST01 und keine weitere Diversität. Der *Achromatium* sp. AFK192/AFK433 Genotyp könnte auf Grund der gleichen Sondenbindungsstellen nahe mit dem „*A. minus*“ Klon AFK57 verwandt sein. Für den *Achromatium* sp. AFK192/AST433 Genotyp kann gesagt werden, daß fünf Basenaustausche, drei davon mit den entsprechenden Veränderungen auf der anderen Seite der Helix, nötig sind um die Sequenz von *A. oxaliferum* Klon AST01 zwischen den *E. coli* Positionen 192 und 211 in die Zielsequenz für die Sonde AFK192 zu verändern. Nur ein Basenaustausch an *E. coli* Position 441 ist dagegen nötig, um die 16S-rRNA von „*A. minus*“ Klon AFK57 in die Zielsequenz der Sonde AST433 zu verwandeln (Tabelle C.5.). Diese Base ist laut dem derzeit gültigen Sekundärstrukturmodell der 16S-rRNA nicht in eine Basenpaarung involviert (Gutell *et al.*, 1994) und kann ohne die Notwendigkeit eines zweiten Basenaustausches problemlos von A nach G mutieren. Das legt die Vermutung nahe, daß der dritte unbekannte *Achromatium* sp. Genotyp aus der 16S-rRNA von „*A. minus*“ entstanden ist. Durch gerichteten Einsatz modifizierter Formen der Sonden AFK192 und AST433 könnte man in Zukunft versuchen, ein ca. 250 Nukleotide langes Fragment der 16S-rRNA dieser Population zu erhalten. Dieses könnte wiederum für ein gerichtetes „Ganzzellfischen“ (Stoffels *et al.*, unveröffentlicht) dienen.

Die Möglichkeit, daß in einer Achromatien Gemeinschaft eines Standortes genetisch distinkte Populationen existieren wurde erstmals von Head *et al.* (1996) eingeführt. In seiner Arbeit erhielt er aus dem Sediment des Rydalsees unterschiedliche 16S-rRNA Sequenzen, die jedoch alle mit *A. oxaliferum* verwandt waren. Mit den Ergebnissen dieser Studie konnte nun durch den Einsatz der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden, daß tatsächlich verschiedene *Achromatium* Genotypen in einem Sediment coexistieren.

D.2.5. Lebensraum und Diversität

Aus ökologischer Sicht stellt sich jetzt unweigerlich die Frage nach den Parametern, die in der Fuchskuhle zu einer phylogenetisch einheitlichen Population von „*A. minus*“ und im Stechlinsee zu einer Koexistenz von verschiedenen *Achromatium* sp. Genotypen führen. Die hervorstechenden Unterschiede zwischen den beiden Seen sind der Trophiegrad, die Leitfähigkeit und der pH (Casper, 1985; Babenzien, 1991). Bei der Untersuchung verschiedener Seen mit unterschiedlichem Trophiegrad hat sich gezeigt, daß unabhängig vom Trophiegrad „*A. minus*“ nur in der Fuchskuhle gefunden werden konnte (Babenzien, 1991). Deshalb liegt der Schluß nahe, daß es der niedrige pH Wert in Kombination mit der geringen Leitfähigkeit ist, der es verhindert, daß sich in der Fuchskuhle eine diverse Achromatien Gemeinschaft ausbildet. Vielleicht trifft die allgemeine ökologische Regel zu, daß an extremen Standorten eine geringere Diversität zu erwarten ist. Ob die verschiedenen *Achromatium* Populationen wirklich in den gleichen Nischen zusammenleben, oder sich z.B. auf verschiedene Schichten im Sediment verteilen, kann an Hand der hier verwendeten Mischproben nicht entschieden werden. Bei einer zukünftigen Probennahme sollte darauf geachtet werden, daß eine eventuelle Stratifikation der Organismen innerhalb des Sediments erhalten bleibt.

Im Stechlinsee gibt es eine große Bandbreite von verschieden großen *Achromatium* Zellen. Es war jedoch nicht möglich eine bestimmte Größe mit Hilfe der Sonden einer bestimmten Art zuzuordnen. Für alle drei Genotypen konnten große und kleine Zellen gefunden werden. In den hier untersuchten aquatischen Systemen ist die Größe der Organismen vom Wachstumszustand und Habitat abhängig und nicht von der phylogenetischen Heterogenität.

Mit den in diesem Projekt entwickelten Sonden wäre es hochinteressant, die Zusammensetzung der Achromatien Populationen anderer Ökosysteme auf Gemeinsamkeiten oder Unterschiede hin zu untersuchen. Anbieten würden sich dabei die von Herrn Head gut untersuchten Seen in England.

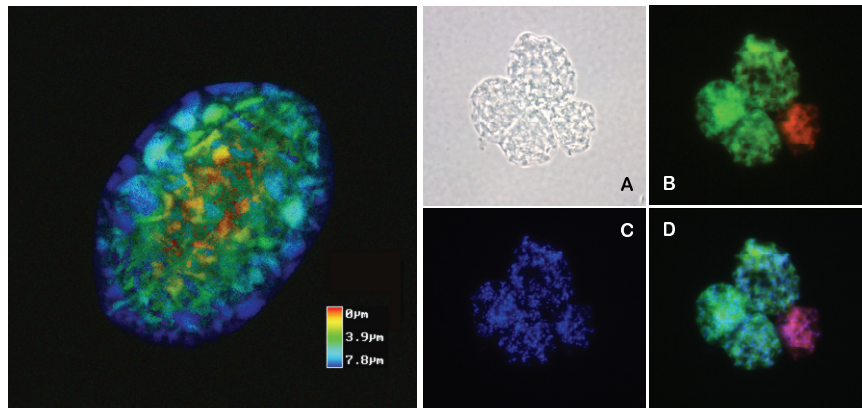


Abbildung D.2.: (Links) In situ-Hybridisierung mit der Sonde ACH62-CT auf einer Sedimentprobe des Stechlinsees. Das Bild zeigt einen Z-Schnitt durch eine *Achromatium oxaliferum* Zelle, wobei die unterschiedlichen Farben die Schnittebenen angeben. Die Aufnahme wurde mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop gemacht. (Rechts) Phasenkontrast, in situ-Hybridisierung und DAPI-Färbung von *Achromatium oxaliferum* aus dem Stechlinsee. (A) Phasenkontrast, (B) Doppelhybridisierung mit AST192-F (grün) und AFK192-CT (rot), (C) DAPI-Färbung und (D) elektronische Überlagerung von B und C.

D.3. Prokaryontische Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen

Wasser – süß oder salzig – ist der Ursprung des Lebens. 70% unserer Erde sind von Wasser bedeckt. Zwei meiner Meinung nach sehr gute Gründe sich mit aquatischen Ökosystemen zu beschäftigen. Wasser ist etwas besonderes, man denke an die Dipoleigenschaft, die Dichteanomalie, oder einfach an einen heißen Sommertag, den man mit einem schönen kühlen Bad im nächsten See beschließt. Meere sind gewaltig, faszinierend, schön und riesig, wie klein wirken dagegen die in den Gewässern lebenden Mikroorganismen. Aber: Jeder Milliliter eines natürlichen Gewässers beherbergt 10^4 bis 10^6 von Ihnen! Bakterien sind ebenfalls faszinierend, geradezu gewaltig in ihren Möglichkeiten praktisch jedes Habitat zu besiedeln, schön, wenn man sie im Dunkeln unter dem Mikroskop fluoreszieren sieht und manchmal riesig, wenn man an *Achromatium oxaliferum* oder *Thiomargarita namibiensis* denkt. Die Synthese der Faszinationen wird in den nächsten beiden Studien versucht.

Die erste Studie basiert auf der Methode der *in situ*-Hybridisierung mit domänen- und gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden und vergleicht die Zusammensetzung des Bakterioplanktons ausgewählter limnischer und mariner Standorte miteinander.

Die zweite Studie hatte, basierend auf 16S-rDNA Genbanken, die Diversität in limnischen Ökosystemen zum Ziel. Mit Hilfe klonspezifischer Sonden konnten dabei die Sukzessionen bestimmter Populationen in einem See über das Jahr hin verfolgt werden.

D.3.1. Vergleich limnischer und mariner Freiwasserstandorte

Schon im Jahre 1965 stellte MacLeod die Frage: „Existieren spezifische marine Bakterien?“ In seinem Übersichtsartikel faßte er die durch die Kultivierung von Bakterien erhaltenen Ergebnisse zusammen und suchte nach Unterschieden zwischen den an marinen Standorten und den im Süßwasser gefundenen Bakterien (MacLeod, 1965). Mit den klassischen Methoden konnten allerdings keine systematischen Unterschiede in den Populationen entdeckt werden (MacLeod, 1965; Rheinheimer, 1991). Einzig der Versuch terrestrische Isolate in Meerwasser zum Wachsen zu bringen, schlug meist fehl (Zobell und Upham, 1944; Pramer *et al.*, 1963). Dies bewog MacLeod zu der Feststellung, daß der einzige Unterschied zwischen marinen Bakterien und Bakterien anderer Habitate die Fähigkeit ist, im Meer zu überleben und zu wachsen (MacLeod, 1965). Ein Problem dabei ist sicherlich, daß nur ca. 0,1% der im Mikroskop sichtbaren Bakterien, kultiviert werden kann (Jannasch und Jones,

1959; Roszak und Colwell, 1987). Darüber hinaus spiegelt die Häufigkeit bestimmter kultivierbarer Bakterien nicht unbedingt die natürliche Abundanz im Ökosystem wieder (Wagner *et al.*, 1993). Eines der Ziele der modernen Molekularbiologie ist, dieses Problem mit Hilfe kultivierungsunabhängiger Methoden zu lösen. Tatsächlich wurden in Genbanken viele neue 16S-rDNA Sequenzen von noch nicht kultivierten Arten in allen untersuchten Ökosystemen gefunden (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Mullins *et al.*, 1995; Bahr *et al.*, 1996; Hiorns *et al.*, 1997; Methé *et al.*, 1998). Dabei zeigten sich durchaus Unterschiede zwischen den 16S-rRNA-Sequenzen von Bakterien aus marinen und limnischen Ökosystemen wie z.B. bei *Caulobacter* sp. (Stahl *et al.*, 1992), oder beim SAR11 Cluster (Giovannoni *et al.*, 1990; Bahr *et al.*, 1996).

Ziel dieser Studie war es, die *in situ*-Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaften limnischer und mariner aquatischer Ökosysteme mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) aufzuklären und zu vergleichen.

D.3.1.1. Zellzahlen, allgemein und spezifisch

Zellen sind die Basiseinheiten der Biologie. FISH kann die Gesamtzellzahlen, wie sie bei aquatischen Proben routinemäßig mit DAPI und Membranfiltern bestimmt werden (Porter und Feig, 1980), durch absolute Zellzahlen definierter phylogenetischer Gruppen unterstützen. Verschiedenste Proben wurden verwendet, um den Vergleich mariner und limnischer Ökosysteme zu ermöglichen. Wie erwartet, lagen die Gesamtzellzahlen im Bereich von 10^5 - 10^7 Zellen/ml, wie es für oligotrophe- und mesotrophe aquatische Systeme beschrieben ist (Kepner und Pratt, 1994).

Durch die neuen stärkeren Farbstoffe wie Cy3 und die Möglichkeit direkt auf Polycarbonatfiltern zu hybridisieren, konnten die FISH-Detektionsraten so weit gesteigert werden (>50%), daß eine Hybridisierung von Proben aus oligotrophen- und mesotrophen aquatischen Systemen sinnvoll wurde (Glöckner *et al.*, 1996; Amann *et al.*, 1997). Alle untersuchten Proben zeigten helle Hybridisierungssignale und einen deutlichen Unterschied zwischen Sondersignal und Hintergrund. Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie ist, daß in der Tat in fast allen Proben mehr als 50% der Zellen detektiert werden konnten. In zwei Proben aus der Antarktis (Tabelle C.8.) waren es sogar fast 100% der mit DAPI gefärbten Partikel, die mit der EUB338 erfaßt wurden. Dies erschien ungewöhnlich und bei genauerer mikroskopischer Untersuchung stellte sich dann heraus, daß zur Probennahmezeit eine Blüte der Alge *Phaeocystis* sp. herrschte, in deren Matrix gut detektierbare Bakterien der

Cytophaga/Flavobacterium Gruppe wuchsen.

In allen Proben waren *Bacteria* wesentlich häufiger als *Archaea*. Fundstellen für letztere waren sowohl marine (Nordsee, Ostsee), als auch limnische Systeme (Gossenköllesee). Berichte über die weite Verbreitung von *Archaea* in aquatischen Systemen können zwar bestätigt werden (DeLong, 1992; Ovreas *et al.*, 1997), jedoch scheinen sie zumindest zahlenmäßig weit weniger wichtig zu sein als die Eubakterien. Das sie in keiner der Proben aus dem Antarktischen Ozean zu finden waren, wie es ursprünglich von DeLong und Mitarbeitern (1994) gezeigt werden konnte, könnte mit starken zeitlichen und räumlichen Schwankungen der Populationen erklärt werden, aber auch mit noch vorhandenen methodischen Problemen der FISH.

D.3.1.2. Vergleich der Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften in limnischen und marinen Systemen

Die deutlichsten Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften zeigten sich für die beta-Gruppe der *Proteobacteria*. Diese war im Süßwasser dominant, jedoch in den marinen Proben nur gering vertreten, oder nicht detektierbar. Am besten zu sehen war dies bei den oligotrophen Proben, die keinen, oder nur geringen terrestrischen oder anthropogenen Einfluß aufwiesen. Beispielsweise in den Tiefenwasserproben des Baikalsees mit einer relativen beta-Proteobakterienhäufigkeit von 15-32% und dem Antarktischen Ozean, wo keine beta-Proteobakterien nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse unterstützen Diversitätsdaten aus 16S-rDNA Genbanken verschiedener mariner und limnischer Ökosysteme. Genbanken aus limnischen Systemen beinhalteten dabei hauptsächlich Klone, die mit der beta-Gruppe der *Proteobacteria* verwandt waren (Bahr *et al.*, 1996; Hiorns *et al.*, 1997; Methé *et al.*, 1998), wohingegen keine beta-Proteobakterien in marinen Systemen (Giovannoni *et al.*, 1990; Britschgi und Giovannoni, 1991; Schmidt *et al.*, 1991; Fuhrman *et al.*, 1993; Benlloch *et al.*, 1995; Mullins *et al.*, 1995; Gonzalez und Moran, 1997), oder marinen Aggregaten (Rath *et al.*, 1998) gefunden wurden. Ausnahmen stellen ein Bericht von Suzuki und Mitarbeitern (1997) dar, in dem beta-Proteobakterien an der Küste von Oregon gefunden wurden und Berichte von Ammoniumoxidierern in der Gruppe der beta-Proteobakterien, die in marinen Systemen wiederholt mittels PCR nachgewiesen werden konnten (Voytek und Ward, 1995; Hovanec und Delong, 1996). Daß es die beta-Gruppe der *Proteobacteria* mit geringen Häufigkeiten in stark terrestrisch beeinflussten marinen Systemen, oder als Spezialisten in bestimmten Nischen im Meer gibt, ist damit sehr wahrscheinlich. Warum jedoch kann sich eine ganze Gruppe der Proteobakterien nicht besser

im größten Ökosystem der Erde etablieren? Noch dazu, da sie ständig durch die Flüsse neu eingetragen wird? Ein Hinweis auf diese Fragen können die Ergebnisse aus der Ostsee geben. Die Ostsee ist ein heterogenes System, mit einem eher limnischen Charakter in den oberen Wasserschichten (7‰ Salinität) und einem, durch die Nordsee beeinflussten, mehr marinen Charakter (12‰ Salinität) in der Tiefe. Das ganze wird durch eine Chemokline, die zur Zeit unserer Probennahme zwischen 78 m (8‰ Salinität) und 121 m (11‰ Salinität) verlief, getrennt. In den oberen, salzarmen Schichten waren die beta-Proteobakterien mit relativen Abundanzen von 15-29% stark vertreten und nahmen im salzhaltigen Tiefenwasser bis auf 6% ab. Die hohen Abundanzen in den oberen Schichten sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf starke terrestrische Einflüsse zurückzuführen, die zusammen mit dem niedrigen Salzgehalt, ein Überleben dieser Gruppe ermöglichen. Das salzige Tiefenwasser hingegen verhindert ein weiteres Wachstum dieser Gruppe, wodurch die Zellzahlen zurückgehen (Abbildung C.8., A). Bereits 1972 verwiesen Baumann und Mitarbeiter darauf, daß Bakterien aus Boden und Süßwasser oftmals nicht im Salzwasser überleben können und daß die Abhängigkeit von Na-Ionen ein Unterscheidungsmerkmal zwischen Süß- und Salzwasserbakterien sein könnte (Baumann *et al.*, 1972). Eine neuere Studie konnte die bakterizide Wirkung von Salzwasser mit einer Salinität von größer 10‰ anhand von Süßwasserbakterien aus dem Brackwasser des St. Lawrence Flusses zeigen (Painchaud *et al.*, 1995). Die Aufklärung der Mechanismen, die diese Bakterien an geringe Salzkonzentrationen bindet, ist sicherlich lohnend. Evolutionär gesehen stellt sich jedoch die wesentlich tiefgreifendere Frage, wo die Evolution der beta-Gruppe der *Proteobacteria* stattgefunden hat, respektive ob sie sich vorwiegend in terrestrisch/limnischen Systemen abspielte.

Von Cytophagen/Flavobakterien wurden bis jetzt nur relativ wenige 16S-rDNA Sequenzen in den Genbanken gefunden (Fuhrman *et al.*, 1993; Benlloch *et al.*, 1995; Hiorns *et al.*, 1997). Die *in situ*-Hybridisierungsdaten zeigen jedoch, daß die Vertreter dieser Gruppe in allen hier untersuchten Ökosystemen vorkommen und eine signifikante Dominanz im Bakterioplankton mariner Standorte einnehmen. Dies wiederum stimmt gut mit klassischen Kultivierungsstudien überein, bei denen *Cytophaga* sp. und *Flavobacterium* sp. häufig isoliert werden konnten (Zobell und Upham, 1944; Shewan und McMeekin, 1983; Morita, 1992; Gosink und Staley, 1995; Bahr *et al.*, 1996; Pinhassi *et al.*, 1997). Daß die *Cytophaga/Flavobacterium* Gruppe in den 16S-rDNA Genbanken kaum auftritt, lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an den verwendeten Primern. Eine Überprüfung dieser Hypothese anhand der Veröffentlichungen der letzten Jahre ergab, daß speziell der "Universalprimer" 630R und seine Varianten, welche von den Gruppen um Giovannoni und an der TU München (Giovannoni *et al.*, 1990; Gordon und

Giovanoni, 1996; Snaird *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1997) verwendet wurden, die Gruppe der Cytophagen/Flavobakterien diskriminiert. Der ebenfalls viel verwendete Primer 68F (Britschgi und Giovanoni, 1991; Schmidt *et al.*, 1991; Mullins *et al.*, 1995; 5'-TNANACATGCAAGTCGAKCG-3' *E. coli* Position 48-68) hat laut ARB-Datenbank Fehlpaarungen zu Vertretern der Cytophagen/Flavobakterien. Einen weiteren Anhaltspunkt zu möglichen, primerbasierenden Verschiebungen der Analyse natürlicher 16S-rDNA-Diversität in Genbanken gibt die Veröffentlichung von Marchesi und Mitarbeiter (1998). Zusammenfassend ist zu sagen, daß auch die modernen molekularbiologischen Methoden nicht unbedingt die tatsächliche Biodiversität der Ökosysteme wiedergeben. Nur in der Kombination verschiedenster Methoden können solche Verschiebungen erkannt und eventuell mit optimierten Verfahren verhindert werden.

Ökologisch ist die *Cytophaga/Flavobacterium* Gruppe fähig, ein breites Spektrum von Substraten aerob abzubauen. Dies beginnt bei verschiedenen Proteinen, reicht über Kohlenhydrate, Pestizide und Insektizide bis hin zu komplexen Makromolekülen (Bernardet *et al.*, 1996). In den genommenen Tiefenprofilen stiegen die mit der CF319a Sonde detektierten absoluten Zellzahlen mit der Tiefe an (Abbildung C.8., B, C). Dies gibt einen Hinweis darauf, daß sie tatsächlich die sich in der Tiefe anhäufenden, schwerer abbaubaren, Makromoleküle bevorzugen, während die leicht abbaubaren Monomere bereits in den Oberflächenschichten von Bakterien anderer Gruppen genutzt wurden. Die mit Hilfe der FISH für spezifische Gruppen ermittelten absoluten Zellzahlen müssen in Zukunft in Relation gebracht werden mit Nährstoffverfügbarkeit, Fraßdruck oder virale Zellyse.

Im Gegensatz zu der *Cytophaga/Flavobacterium* Gruppe wurden Sequenzen der alpha- und gamma-Gruppe der *Proteobacteria* häufig in Genbanken aus marinen aquatischen Ökosystemen gefunden (Giovanoni *et al.*, 1990; Fuhrman *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 1995; Gonzalez und Moran, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). Die hier gezeigten Daten bestätigen eine weite Verbreitung von alpha-Proteobakterien, wobei die Zellzahlen in marinen Systemen ($1,1 \times 10^5$ Zellen/ml) signifikant höher sind, als in limnischen ($9,0 \times 10^3$ Zellen/ml). Trotz der z.T. recht hohen Zahlen in den marinen Systemen, waren sie zahlenmäßig immer weniger wichtig als die Vertreter der Cytophagen/Flavobakterien.

Generelle ökophysiologische Kriterien für die alpha-Gruppe der *Proteobacteria* zu finden ist schwer. Ein gut untersuchter Repräsentant ist das Ultramikrobakterium *Sphingomonas* sp. RB2256, welches aus der Resurrection Bay in Alaska isoliert wurde (Schut *et al.*, 1993). Es besitzt hochaffine Nährstoffaufnahme-systeme und eine erstaunliche Widerstandsfähigkeit

gegenüber Schadstoffen (Eguchi *et al.*, 1996). Um allerdings herauszufinden, welche Gruppen der alpha-Proteobakterien in den aquatischen Systemen abundant sind, müssen Sonden gegen kleinere, besser definierte Gruppen, wie z.B. Gattungen, entwickelt und eingesetzt werden.

Die klassische Kultivierung weist den gamma-Gruppe *Proteobacteria* einen hohen Stellenwert in den aquatischen Systemen zu (Zobell und Upham, 1944; MacLeod, 1965; Baumann *et al.*, 1972). In dieser Studie lag deren relative Abundanz mit wenigen Ausnahmen generell unter 4%. Dies kann bedeuten, daß sie, zumindest den Zahlen nach, nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation des Bakterioplanktons ausmachen. Das bei der Kultivierung aus wäßrigen Proben häufig zugunsten der gamma-Proteobakterien selektiert wird, konnte mit der FISH Technik gezeigt werden (Wagner *et al.*, 1993). Viele Vertreter dieser Gruppe sind zudem copiotrophe Organismen, die an hohe Nährstoffkonzentrationen angepaßt sind (Zavarzin *et al.*, 1991).

Die letzte hier untersuchte Gruppe waren die *Planctomycetales*. In den hier betrachteten Systemen waren sie in den marinen Proben nur einmal (Nordsee), jedoch häufig in den Süßwasserproben anzutreffen. Eine Erklärung dafür kann die am Detektionslimit dieser Methode liegende geringe relative Häufigkeit von meist kleiner 1% sein. Planctomyceten sind typische und weitverbreitete Bewohner von marinen und limnischen Ökosystemen (Hirsch und Rheinheimer, 1968; Zwart *et al.*, 1998) und konnten auch in rRNA Genbanken von marinen Makroaggregaten gefunden werden (DeLong *et al.*, 1993; Rath *et al.*, 1998). Die Fähigkeit, aquatischer Planktomyceten N-acetylglucosamin als C- und N-Quelle zu verwenden, könnte ihnen eine Schlüsselrolle im Chitinabbau zuweisen (Schlesner, 1994; Zarda *et al.*, 1997). Da Chitin das vorwiegende strukturelle Polysaccharid im Exoskelett von Zooplanktern ist, wären höhere Abundanzen nach einer Zooplanktonblüte zu erwarten.

Die Abbildung D.3 zeigt repräsentativ für alle untersuchten Proben zwei Probennahmestellen (Baikalsee und Antarktischer Ozean), welche meiner Meinung nach die typische Verteilung der Gruppen in unbeeinflußten limnischen und marinen Ökosystemen widerspiegeln.

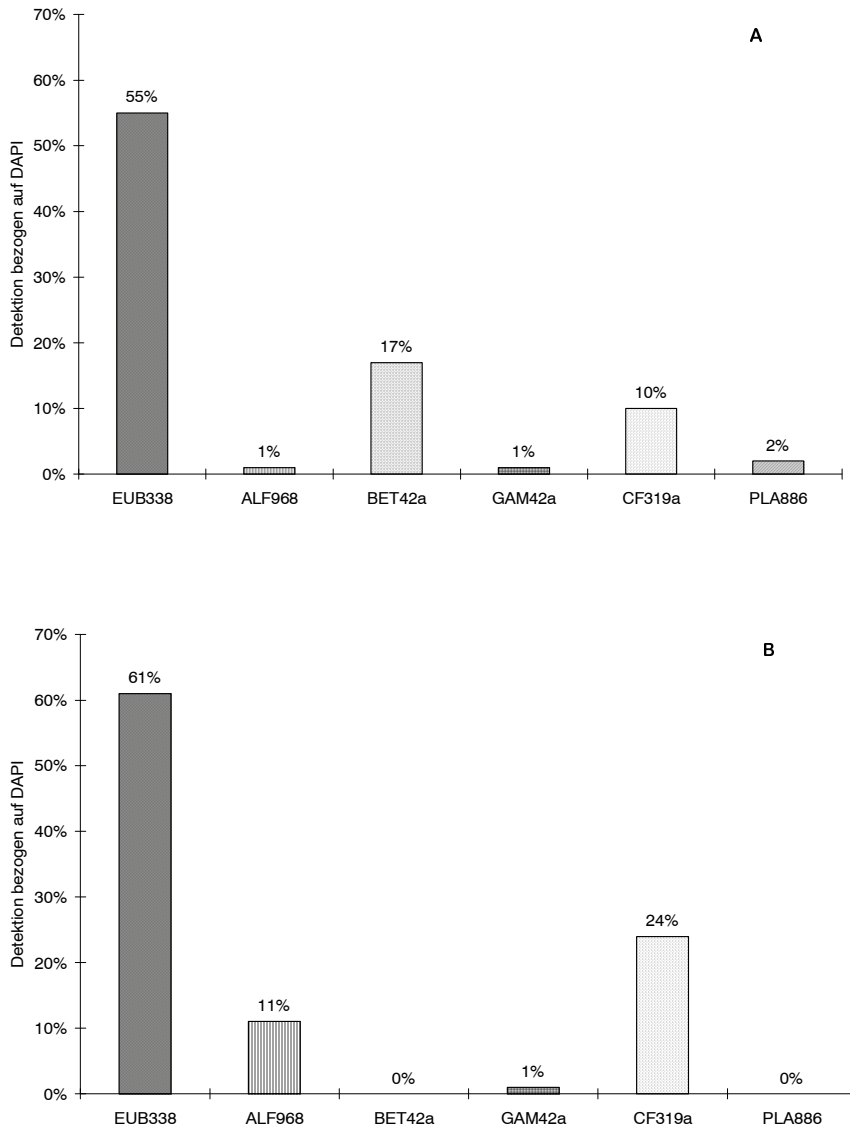


Abbildung D.3.: Detektionsraten und Gruppenverteilung zweier Habitate. (A) Südliches Basin des Baikalsees in 25 m Tiefe, (B) Antarktischer Ozean bei 49°29.40'S, 11°23.58'E in 40 m Tiefe.

Zusammenfassend für die einzelnen Gruppen ist zu sagen:

1. Beta-Gruppen Proteobakterien sind typische Bewohner des Süßwassers und viele Vertreter werden von Salzkonzentrationen $> 10\text{‰}$ inhibiert. In marinen Systemen waren sie nur in terrestrisch beeinflussten Proben nachweisbar.
2. Die *Cytophaga/Flavobacterium* Gruppe ist in limnischen und besonders in marinen Systemen wichtig. Die ökologische Leistung wichtiger Vertreter könnte dabei im Abbau der aus der Primärproduktion der Cyanobakterien und Algen stammenden Polymere liegen.
3. Die *Planctomycetales* dürften, wenn auch nur in geringen Zahlen, in allen aquatischen Systemen vorhanden sein. Sie könnten sich dabei auf den Abbau von Chitin spezialisiert haben, welches ein typisches Polymer der zweiten trophischen Ebene ist.

Berechnet man für die beiden dominanten Gruppen die absolute Anzahl der Bakterien in allen aquatischen Systemen (Tabelle C.7.), so zeigt sich, daß es ca. $2,4 \times 10^{27}$ beta-Proteobakterien und $2,1 \times 10^{28}$ Bakterien in der Cytophagen/Flavobakterien Gruppe gibt. Dies bedeutet, daß nur 2,2% der gesamten Bakterien in den aquatischen Ökosystemen der Erde zu den beta-Proteobakterien gehören, aber 18,8% zu den Cytophagen/Flavobakterien. Welche besonderen Strategien diese Gruppe aufweist, um diese enorme Dominanz zu erreichen, sollte ein Ziel künftiger Forschungen sein.

D.3.1.3. Methodische Aspekte der FISH in aquatischen Ökosystemen

Abgesehen von einigen Ausnahmen hat sich im Laufe dieser Studie gezeigt, daß zwischen 40 und 50% der mit DAPI anfärbbaren Partikel keiner der drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* oder *Eucarya* zugeordnet werden konnte (Abbildung D.4.). Vergleicht man DAPI-Fluoreszenz mit Sonden-Fluoreszenz fällt auf, daß die nichthybridisierten DAPI gefärbten Partikel generell sehr klein waren.

Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten sind denkbar:

1. Bei den DAPI-gefärbten nicht hybridisierenden Partikeln handelt es sich um sogenannte „Ghosts“. Darunter sind nach Zweifel und Mitarbeiter (1995) leere Zellhüllen ehemaliger Bakterien zu verstehen, die durch virale Lyse oder unvollständigen Abbau der Zellwand beim Grazing durch Protozoen entstanden sind. DAPI kann, laut der Aussage dieser Arbeitsgruppe, außer an Nukleinsäuren auch an durch PFA-Fixierung entstandene reaktive Oberflächenstrukturen binden. In weiteren Versuchen durch Pinhassi und Mitarbeiter

(1997) konnte gezeigt werden, daß in Ostseewasserproben bis zu 70% der mit DAPI angefärbten Partikel „Ghosts“ sind. Rein rechnerisch widerspricht dies den Detektionsraten in den meisten der hier untersuchten Proben, da gewöhnlich mehr als 50% z.T. bis hin zu 96% der DAPI gefärbten Partikel mit den domänenspezifischen Sonden hybridisierten, speziell in der Ostsee waren es zwischen 60% und 70% (Tabelle C.8.). Eine unspezifische Bindung von DAPI an Zellhüllen oder anderen Partikeln kann natürlich nie ganz ausgeschlossen werden. Weitere Versuche dazu sind in Kooperation mit dem Leiter dieser Arbeitsgruppe, Herrn Hagström, geplant.

2. Es handelt sich um normale prokaryontische Zellen, die aber auf Grund eines niedrigen Ribosomengehaltes, wie man ihn oft in hungernden Zellen findet (Roszak und Colwell, 1987; Kolter *et al.*, 1993), nicht genügend rRNA zur Detektion beinhalten, oder ihre Zellwand ist zu undurchlässig, so daß die Sonden nicht eindringen können. Dies tritt ebenfalls oft in der Hungerphase auf und kann auch auf einen Teil der mit einer dicken Zellwand ausgestatteten Gram-positiven Zellen zutreffen.
3. Es handelt sich bei den DAPI-gefärbten, aber nicht hybridisierenden Partikeln um Viren. Diese können nicht von den auf die rRNA gerichteten Sonden erfaßt werden, aber eine detektierbare Färbung der Zellen mit DAPI ist beschrieben (Weinbauer und Suttle, 1997). Viren kommen sowohl in limnischen als auch in marinen Systemen in großen Zahlen vor (Heldal und Bratbak, 1991) und gerade große Vertreter, mit Größen bis zu 150 nm (Mathias *et al.*, 1995), könnten im Epifluoreszenzmikroskop sichtbar sein.

Versuche, die Detektionsraten mit Hilfe von enzymatischen Signalamplifikationssystemen zu steigern, schlugen fehl. Vergleichszählungen mit EUB338-Cy3, und EUB338-HRP (TSA-Fluos) ergaben, daß nur ca. 20% der mit EUB338-Cy3 erfaßten Zellen bei der Hybridisierung mit EUB338-HRP detektierbar waren. Wahrscheinlich ist dies durch schlechte Zugänglichkeit der Zellen für die relativ große Meerrettichperoxidase (Schönhuber *et al.*, 1997) bedingt. Veränderungen in den Fixierungsprotokollen zeigten ebenfalls keine Wirkung. Eine vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Studie in Zusammenarbeit mit Herrn Kisand und Herrn Heldal (Kisand, 1998) soll Aufschluß über die nichthybridisierten DAPI gefärbten Partikel geben.

Ein zweites Problem zeigt sich, rechnet man die Detektionsraten mit den gruppenspezifischen Sonden zusammen. Nur ca. 50% der von der EUB338 erfaßten Bakterien können bestimmten Gruppen zugeordnet werden (Abbildung D.4.). Der hier angewandte Satz von Sonden wurde ursprünglich für hypereutrophe biotechnologische Verfahren wie z.B. Kläranlagen entwickelt.

Es ist jetzt nötig, basierend auf rDNA Genbanken aus limnischen und marinen Systemen (Ward *et al.*, 1990; Mullins *et al.*, 1995; Bahr *et al.*, 1996; Hiorns *et al.*, 1997) und den in dieser Arbeit vorgestellten Genbanken (C.3.2.), neue Sonden zu entwickeln. Speziell gruppenspezifische Sonden für die delta- und epsilon-Gruppe der *Proteobacteria* und die *Chlorobiaceae* sollten bald möglichst entwickelt werden (Gordon und Giovannoni, 1996; Wright *et al.*, 1997). Weiterhin, wie schon früher in dieser Arbeit beschrieben (D.1.2.) muß die GAM42a Sonde überarbeitet werden, da sie nicht alle der tief abzweigenden gamma-Proteobakterien erfaßt (Buchholz-Cleven *et al.*, 1997; Glöckner *et al.*, 1998). Ein Teil dieser bis jetzt nicht zuordenbaren Bakterien könnte auch zu den Gram-positiven Bakterien und dabei speziell zu der Gruppe Gram-positiver Bakterien mit hohem mol% G+C Gehalt (GPHGC) gehören. Wie später in dieser Arbeit noch gezeigt wird, sind GPHGC-Organismen in allen 16S-rDNA Genbanken stark vertreten (C.3.2.). Erste Versuche mit spezifischen Sonden waren vielversprechend.

Bei den 25% der Bakterien, die bereits bestimmten Gruppen zugeordnet werden konnten (Abbildung D.4.), ist zu bedenken, daß es sich dabei um recht große Gruppen handelt, die die unterschiedlichsten physiologischen Merkmale vereinen. In der alpha-Gruppe der *Proteobacteria* gibt es z.B. sowohl anaerobe photosynthesetreibende Bakterien, wie *Rhodobacter* sp., als auch aerobe heterotrophe, wie *Caulobacter* sp. und *Hyphomicrobium*. Deshalb ist es auch hier von Nöten, feinere Sonden, die z.B. nur bestimmte Gattungen oder Arten erfassen, zu entwickeln, um deren Abundanzen in zeitlicher und räumlicher Abhängigkeit zu bestimmen.

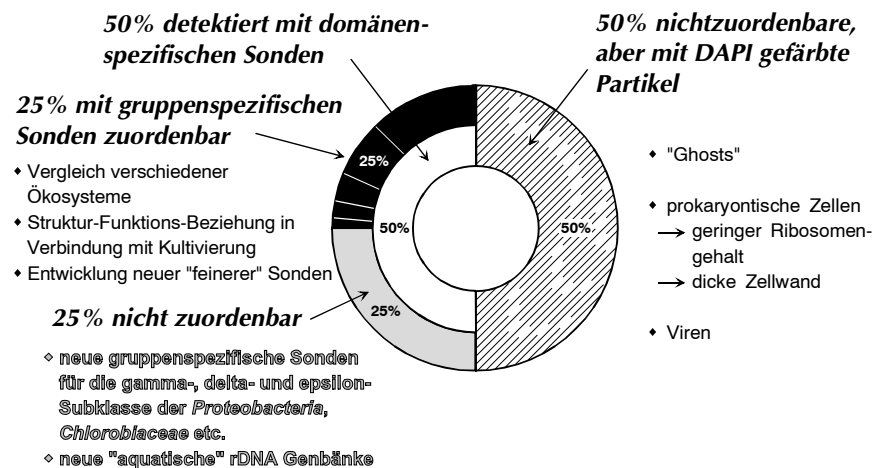


Abbildung D.4.: Perspektive der FISH in aquatischen Ökosystemen

D.3.2. Bakterielle Diversität in limnischen Ökosystemen

Die Anwendung molekularbiologischer Techniken auf mikrobielle Lebensgemeinschaften in den verschiedensten Ökosystemen brachte eine Fülle neuer Erkenntnisse. Dabei stand bei der Aufklärung der Evolution, der Diversität und der Struktur von Mikroorganismen ein Molekül im Vordergrund – die ribosomale RNA (rRNA). Basierend auf einem generellen rRNA-Stammbaum (Woese, 1987; Olsen *et al.*, 1994; Woese, 1994) ist es heutzutage möglich, die mikrobielle Diversität unbekannter Ökosysteme durch computergestützte Analyse der dort vorhandenen rRNA Informationen im Vergleich zu bestehenden Datenbanken abzuschätzen (Strunk *et al.*; Ludwig, 1995). Dabei hat sich gezeigt, daß, gemessen an den in den Datenbanken vorhandenen Sequenzen kultivierter Mikroorganismen, eine Unmenge von Sequenzen bisher nichtkultivierter oder nichtsequenzierter Mikroorganismen in der Natur vorkommen (Ward *et al.*, 1990). Ein Einblick in die Diversität kann ein erster, wichtiger Schritt zum Verständnis eines Ökosystems sein. Der sich in der rRNA-Klonsequenz äußernde Organismus kann im untersuchten Habitat autochthon und wichtig sein, muß aber nicht. Die Häufigkeit und Verteilung des entsprechenden Bakteriums sind noch getrennt zu zeigen. Eine der Möglichkeiten die absoluten Zellzahlen zu untersuchen, bietet die FISH. Die erfolgreiche Anwendung dieser Methode auf verschiedene Ökosysteme konnte im Kapitel C.3.1. und in vielen Veröffentlichungen gezeigt werden (Amann, 1995; Alfreider *et al.*, 1996; Glöckner *et al.*, 1996; Harmsen *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1998). Basierend auf diesen Arbeiten war es das Ziel dieser Studie, nicht nur die Diversität in zwei Seen abzuschätzen, sondern mit klonspezifischen 16S-rRNA Oligonukleotidsonden auch die zeitliche und räumliche Häufigkeit verschiedener Populationen in einem der Seen zu verfolgen.

D.3.2.1. Diversität und Abundanz

Die beta-Gruppe der *Proteobacteria* scheint unabhängig von der Untersuchungsmethode im Süßwasser dominant zu sein. Dies trifft sowohl auf grundwassergefüllte Bohrlöcher in Schweden und Afrika (Pedersen *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 1996), Seen im Bundesstaat New York (Hiorns *et al.*, 1997; Methé *et al.*, 1998), arktische Seen (Bahr *et al.*, 1996), Hochgebirgsseen (Alfreider *et al.*, 1996; Pernthaler *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1998), als auch auf die vielen in dieser Arbeit (C.3.1.) beprobten limnischen Systeme zu. Auf den ersten Blick zeigen die hier präsentierten Diversitätsdaten aus den vier Genbanken für die beta-Gruppe der *Proteobacteria* mit 18 aus 77 Klonen eine Subdominanz hinter den 31 Klonen der *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* Gruppe (CFB). Die über das Jahr gemittelten *in situ*-

Hybridisierungsdaten des Gossenköllesee weisen dagegen in Übereinstimmung mit früheren Daten, die beta-Proteobakterien als dominant aus. Betrachtet man die Diversität in den Genbanken jedoch genauer zeigt sich, daß bei der CFB-Gruppe im Gossenköllesee die GKS C1 Diversitätsgruppe 15 Einzelsequenzen aufweist. Daß es sich dabei um die 16S-rRNA von verschiedenen Ausgangsorganismen handelt, ist bei Ähnlichkeitswerten die nahe an 99% liegen unwahrscheinlich. Dies ist ein klarer Hinweis, daß eine in einer Genbank zahlenmäßig dominante Gruppe nicht zwingend dominant im natürlichen System ist. Wenn man sich die möglichen Verschiebungen, die sich durch DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation oder Klonierung ergeben können, ins Gedächtnis ruft (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki und Giovannoni, 1996), ist dies nicht weiter verwunderlich. Genbanken können durchaus einen guten Eindruck der natürlichen Diversität wiedergeben (Ekendahl *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1996), aber die „quantitative Genbank“ ist ein schöner Traum. Vergleicht man die Genbank I und II zeigt sich, daß insbesondere Primer starken Einfluß auf das Wiederfinden von bestimmten bakteriellen Gruppen nehmen (Marchesi *et al.*, 1998) (D.3.1.2.). Beide stammen aus dem Gossenköllesee, bei Genbank I wurde jedoch der „Universalprimer“ 630R (*E. coli* Position 1529) zur Amplifizierung der 16S-rRNA Gene verwendet und bei der Genbank II der Primer GM4 (*E. coli* Position 1492). Keine einzige CFB-Sequenz (0/32) konnte in Genbank I gefunden werden, wohingegen in Genbank II die CFB Gruppe mit 21 aus 35 Klonen die dominante Gruppe darstellt. Daß zum Probennahmezeitpunkt im Dezember 95 die CFB-Gruppe durchaus vorhanden war, zeigen parallel dazu erhobene *in situ*-Hybridisierungsdaten, die den Cytophagen/Flavobakterien 16% (± 2) relative Häufigkeit zuweisen (Tabelle C.8.).

Vergleicht man die beiden Seen miteinander, zeigt sich trotz ihrer ökophysiologischen Unterschiede eine ähnliche Verteilung der phylogenetischen Gruppen und ein gemeinsamer Diversitätsquotient von ca. 0,4. Diese Gemeinsamkeiten auf Basis der 16S-rRNA sind erstaunlich, wenn man auf der einen Seite an einen oligotrophen, unbeeinflussten Hochgebirgssee denkt und auf der anderen Seite an einen mesotrophen Moorsee. Zieht man die gültige makroökologische Regel in Betracht, daß an extremen Standorten eine geringere Diversität zu erwarten ist, sollte die Diversität im Gossenköllesee geringer sein, als die in der Fuchskuhle. Betrachtet man die zwei Seen genauer, so ist die Fuchskuhle mit einem pH von ca. 5,0 und geringer Leitfähigkeit ähnlich extrem, wie der nährstoffarme, hoch UV-belastete Gossenköllesee (Sommaruga *et al.*, 1997). Dennoch wirken auf die dort lebenden Organismen ganz unterschiedliche Einflüsse, die eher zu unterschiedlichen, als zu ähnlichen 16S-rRNA Sequenzen geführt haben sollten. Geht man einen Schritt weiter stellt sich die Frage, ob es auch in anderen Süßwasserhabitaten ähnliche 16S-rRNA Sequenzen gibt, und ob sich in

einem auf der 16S-rRNA basierenden Stammbaum globale „Süßwassercluster“ abzeichnen. Es zeigt sich, daß in allen phylogenetischen Gruppen Cluster bezeichnet werden können, die Sequenzen aus räumlich und ökologisch sehr unterschiedlichen limnischen Systemen beinhalten (Abbildung C.11., A, B).

Was ist die derzeitige Aussage dieser Cluster? Strenggenommen sagen die Cluster nur, daß es in der ganzen Welt bei limnischen Bakterien homologe 16S-rRNA Sequenzen gibt. Ähnliches wurde in Form der SAR-Cluster bereits bei marinen Bakterien postuliert (Mullins *et al.*, 1995). Für weitere Aussagen ist die Frage nach der ökophysiologischen Auflösungsgrenze der 16S-rRNA entscheidend. Marine und limnische Sequenzcluster können mit dem derzeitigen Datensatz unterschieden werden. Ähnliches konnte auch an Isolaten von marinen und limnischen *Caulobacter* sp. gezeigt werden, die sich im Stammbaum in zwei, vom Habitat abhängige Cluster trennen (Stahl *et al.*, 1992). Wenn sich Habitate ökologisch so gravierend unterscheiden, wie limnische und marine Systeme wird dies derzeit offensichtlich auch von der 16S-rRNA dokumentiert.

Nicht unterschieden werden können allerdings die verschiedenen Habitate innerhalb der limnischen Cluster. Viele der Sequenzen aus dem Gossenköllesee, oder der Fuchskuhle zeigen sowohl untereinander, als auch mit Sequenzen aus den anderen Seen Ähnlichkeiten die bei 99% liegen. Zeigt die 16S-rRNA hier wirkliche kosmopolitische Generalisten unter den Bakterien, d.h. gleiche Arten, die tatsächlich in den ökophysiologisch unterschiedlichsten Habitaten leben, oder hat jedes Biotop seine eigenen Spezialisten, die aber an Hand ihrer 16S-rRNA nicht differenziert werden können? Eine Klärung dieser Frage setzt voraus, daß zu jeder 16S-rRNA das zugehörige Bakterium kultiviert wird und im Sinne des polyphasischen Ansatzes über Physiologie, Morphologie, DNA-DNA-Hybridisierung etc. gleiche Arten bestätigt werden. Eine 16S-rRNA Verwandtschaft alleine reicht dazu nicht aus, wie man an Hand des in sich sehr eng verwandten BETA I Clusters sehen kann. Das einzige näher bekannte Bakterium in diesem Cluster ist *Polynucleobacter necessarius*, ein obligater Endosymbiont des in Süßwasserseen lebenden Ciliaten *Euplotes aediculatus* (Springer *et al.*, 1996). Eine rRNA Ähnlichkeit von weniger als 97% wäre ein guter Hinweis auf die Zugehörigkeit zu zwei Arten (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt und Goebel, 1994), jedoch zeigen alle Sequenzen dieser Gruppe mehr als 97,5% Ähnlichkeit zu *P. necessarius*. Das es dennoch eine durch ihre 16S-rRNA kaum unterscheidbare Art geben muß, die frei im Wasser leben kann, wird klar, wenn man die Fundstellen und Probenaufbereitung der Sequenzen im BETA I Cluster in Betracht zieht. Eine Sequenz (GWS_538) wurde in einem, für Ciliaten recht unwahrscheinlichen Lebensraum, nämlich einem mit Grundwasser gefüllten Bohrloch in

Schweden, gefunden (Pedersen *et al.*, 1996). Die Vorfiltration des Wassers für die Genbank aus dem Toolik See mit 1 μm aus dem die Sequenz ARC_31 stammt, schließt das Vorhandensein von Ciliaten aus (Bahr *et al.*, 1996). Daß freie DNA von *P. necessarius* in den Proben vorhanden war, ist theoretisch möglich, jedoch deren Amplifikation und Klonierung ist unwahrscheinlich, wenn man an die harschen Bedingungen, die bei den Anfangsschritten der DNA-Extraktion angewandt werden, denkt. Zusammenfassend kann man sagen, daß hier wahrscheinlich zwei an Hand der 16S-rRNA nicht unterscheidbare Arten vorliegen. Deshalb ist es nicht unwahrscheinlich, daß es tatsächlich Spezialisten in den verschiedenen Seen gibt. Betrachtet man den sehr unterschiedlichen Selektionsdruck, der auf Bakterien im Gossenköllesee oder der Fuchskuhle einwirkt, liegt auch hier die Vermutung nahe, daß es sich trotz hoher 16S Ähnlichkeit um unterschiedliche Genotypen, oder sogar um verschiedene Arten handelt.

Eine andere Frage ist, ob die auf dem derzeitigen 16S-rRNA Datensatz postulierten Cluster zukünftig stabil sind. Diese Frage erlaubt im Moment nur Spekulationen. Nimmt man einmal an, daß 50.000 weitere 16S-rRNA Sequenzen verfügbar wären, sind drei Szenarien denkbar (Abbildung D.5.):

- (A) Die auf dem heutigen Datensatz postulierten Cluster stabilisieren sich. Dies würde bedeuten, daß die Analyse der 16S-rRNA uns außer einer phylogenetischen Einordnung tatsächlich zusätzliche Informationen gibt, die sich aus der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Cluster ableiten. Dies kann, wenn man an die hier beschriebene Aufteilung in Süß- und Salzwassercluster denkt, die Information sein, daß es sich um ein limnisches oder ein marines Bakterium handelt. Eine weitere Feindifferenzierung innerhalb der Cluster und die Ausbildung von Subclustern durch die neuen Sequenzen ist relativ unwahrscheinlich, da schon heute die Ähnlichkeitswerte in den postulierten Clustern mit bis zu 99% wenig Spielraum für zusätzliche informative Basen lassen.
- (B) Ein Teil der Cluster stabilisiert sich, ein Teil verschwindet und neue Cluster entstehen. Für die stabilisierten Cluster gilt das in (A) gesagte, d.h. das Auflösungsvermögen der 16S-rRNA reicht aus, um uns mehr als nur die phylogenetische Stellung eines Prokaryonten anzuzeigen. Daß Cluster verschwinden, respektive neue entstehen, wäre ein Zeichen dafür, daß der derzeitige Datensatz nur bedingt für generelle Voraussagen ausreicht.

(C) Alle Cluster verschwinden. Dies bedeutet, daß der derzeit in die 16S-rRNA hineininterpretierte zusätzliche Informationsgehalt ein reines Artefakt eines völlig unzureichenden Datensatzes ist. Die 16S-rRNA, kann somit nur die phylogenetische Stellung eines Prokaryonten zeigen und erlaubt keine weitergehenden Aussagen zur Ökologie oder Physiologie des Organismuses.

Das Fazit der Spekulationen in A - C ist: Für die Beantwortung der Frage nach der Signifikanz derzeit postulierter Cluster ist eine Erweiterung des Datensatzes unumgänglich.

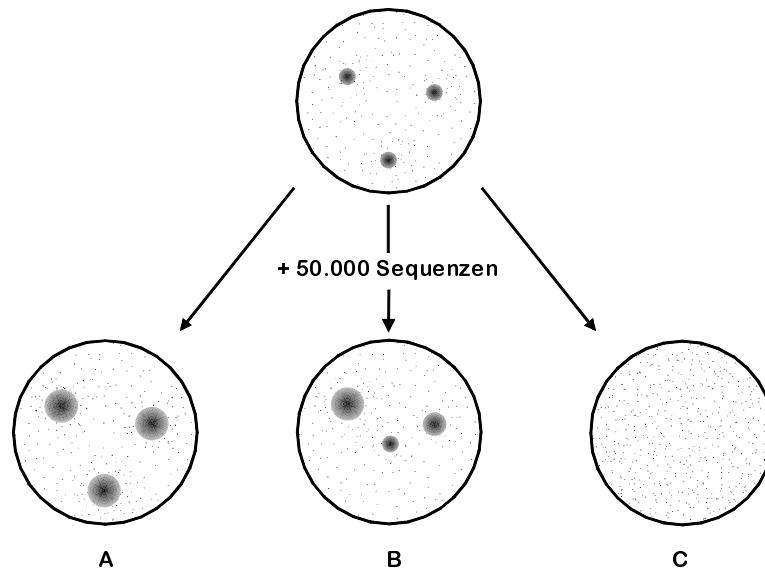


Abbildung D.5.: Illustration zur Stabilität von derzeit postulierten Clustern im 16S-rRNA Stammbaum – „Theorie der 50.000 Sequenzen“. Die großen Kreise symbolisieren dabei alle Bakterien, die kleinen Kreise zeigen die Cluster an. Punkte markieren einzelne (noch) nicht zu Clustern gehörende Sequenzen.

Zwei ganz neue, derzeit nur im Gossenköllesee gefundene Sequenzen von Bakterien zeigen, daß die Variabilität der 16S-rRNA noch nicht erschöpft ist und nicht alles in bereits bestehende Gruppen eingeordnet werden kann. Bei den 16S-rRNA Sequenzen der Klone GKS_30_2 und GKS_174_2 handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Chimären, wie eine Überprüfung des Alignments und das getrennte Einrechnen von Teilabschnitten der Sequenzen zeigte. Die weitere Untersuchung der Sequenzen unter Inbetrachtung der dazugehörigen Sekundärstrukturen ist geplant.

D.3.2.2. Entwicklung und Anwendung klonspezifischer Sonden

Verschiedenste Methoden wurden in den letzten Jahren angewandt, um bakterielle Populationen in ihrer natürlichen Umgebung zu verfolgen. Die meisten dieser Methoden beginnen mit einer Gesamt-DNA-Extraktion. Diese kann anschließend dazu verwendet werden, mit spezifischen Sonden die relativen Häufigkeiten der gewünschten Organismen zu bestimmen (Gordon und Giovannoni, 1996). Eine andere Möglichkeit ist, die erhaltene DNA als Ausgangspunkt für eine PCR-Amplifizierung zu verwenden und die Amplifikate einer Elektrophorese (z.B. DGGE) zu unterwerfen (Muyzer *et al.*, 1993). Aus den erhaltenen Bandenmustern können dann Rückschlüsse auf die vorhandenen Populationen und deren Veränderungen gezogen werden. Alle diese Methoden liefern wertvolle Ergebnisse, lassen aber keine Aussagen über absolute Zellzahlen oder Morphologien zu. Neuere Ansätze zur Quantifizierung bestimmter Populationen oder Arten basierend auf DNA-DNA-Hybridisierung (Pinhassi *et al.*, 1997) oder monoklonalen Antikörpern (Faude und Höfle, 1997; Tuomi *et al.*, 1997) sind in der Anwendung zwar kultivierungsunabhängig, benötigen im Vorfeld aber Isolate. Wie in Kapitel C.3.1. gezeigt werden konnte, bietet FISH die Möglichkeit, bakterielle Gruppen kultivierungsunabhängig nicht nur zu detektieren, sondern auch zu quantifizieren. Domänen- und gruppenspezifische Sonden gaben dabei die Möglichkeit generelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten von verschiedenen Ökosystemen zu evaluieren. Um bestimmte Populationen räumlich und saisonal in einem Ökosystem – dem Gossenköllesee – zu verfolgen, wurden gegen vier, aus dem Gossenköllesee stammende 16S-rDNA Sequenzen, Sonden entwickelt. Die Problematik bei diesen Sonden war die Ermittlung adäquater Hybridisierungsbedingungen. Da eine Überprüfung an Reinkulturen nicht möglich war, wurden Schmelzkurven mit rRNA Transkripten der 16S-rDNA der entsprechenden Klone ermittelt. Zusätzlich wurden die Sonden bei steigender Formamidkonzentration auf verschiedene Proben aus dem Gossenköllesee getestet. Die dabei erhaltenen optimalen Formamidkonzentrationen und Schmelzkurven stimmten überein und bestätigten, daß RNA Transkripte gut das Schmelzverhalten nativer rRNA wiedergeben (Polz und Cavanaugh, 1997). Da die Sondenpaare jeweils die gleichen Morphotypen *in situ* detektierten, kann davon ausgegangen werden, daß tatsächlich nur eine, durch die Spezifität der Sonden definierte, Population verfolgt wurde. Wie in Abbildung C.14. gezeigt und ausführlich in (Pernthaler *et al.*, 1998) beschrieben, konnten für die einzelnen Populationen deutliche Unterschiede in ihren vertikalen und saisonalen Abundanzen gefunden werden. Vorsicht ist allerdings angebracht, wenn man aus der phylogenetischen Verwandtschaft auf die physiologische Aktivität der Populationen schließen will. Wie das Beispiel von *Pseudomonas stutzeri*

Stämmen (Rossello-Mora *et al.*, 1994) zeigt, können nah verwandte Organismen sehr unterschiedliche Fähigkeiten aufweisen. Dadurch stellt sich unweigerlich die Frage, ob es überhaupt Sinn macht, unkultivierte Populationen *in situ* zu verfolgen. Zwei Gründe sprechen dafür: (I) mit Hilfe der Sonden ist es möglich, aus der Menge der Kultivate gezielt die gewünschten Isolate herauszupicken, um sie z.B. physiologisch zu charakterisieren. (II) Durch die Anwendung der Sonden konnte gezeigt werden, daß sich zwar eine Vielzahl von Arten permanent im Ökosystem aufhält, jedoch erst unter bestimmten Bedingungen größere Populationen ausgebildet werden (Abbildung C.14. B, C). Die Gründe für diese Populationsdynamiken sind im Moment noch unbekannt. Ein zukünftiges Ziel muß daher sein, die Daten der 16S-rDNA Genbanken aus dieser Arbeit in Verbindung mit den vielen Daten, die derzeit in anderen Arbeitsgruppen erhoben werden, dazu zu benutzen, weitere gruppen- gattungs-, oder artspezifische Sonden zu entwickeln und anzuwenden. Dies kann einerseits zu einem besseren Einblick in die Dynamik von Bakterien im Ökosystem führen, andererseits sollte es aber auch die Möglichkeit bieten, mehr über die Funktion der einzelnen Populationen in ihrer Wechselwirkung mit anderen Organismen zu erfahren.

E. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der kultivierungsunabhängige rRNA-Ansatz in Verbindung mit neu entwickelten fluoreszenzmarkierten rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden eingesetzt, um Aspekte der Diversität, Struktur und Dynamik der mikrobiellen Lebensgemeinschaften aquatischer Ökosysteme aufzuklären.

Vertreter der *Bacteria* und nicht der *Archaea* dominieren das Bakterioplankton limnischer und mariner Ökosysteme. Ein Vergleich der Abundanzen der verschiedenen phylogenetischen Gruppen des Salz- und Süßwassers wies signifikante Unterschiede aus. Die beta-Gruppe der *Proteobacteria* ist im Süßwasser dominant, konnte aber in marinen Systemen, mit einem Salzgehalt größer 10‰, nicht detektiert werden. Die alpha- und gamma-Proteobakterien, die Cytophagen/Flavobakterien und die Planktomyceten sind dagegen in beiden Systemen vorhanden, wobei die Cytophagen/Flavobakterien die dominante Rolle in marinen Systemen einnehmen.

Zur Untersuchung der Diversität des Bakterioplanktons limnischer Ökosysteme wurden 16S-rDNA Genbanken angelegt. Dabei zeigte sich, daß bestimmte Gruppen von Bakterien in sehr weit entfernten und physikochemisch unterschiedlichen Süßwasserseen vorkommen und eventuell kosmopolitische Gruppen bilden. Gegen ausgewählte Sequenzen der alpha- und beta-Gruppe der *Proteobacteria* konnten Sonden entwickelt werden, die es erlaubten, die saisonale und räumliche Dynamik von vier Populationen im Gossenköllesee zu verfolgen.

Für das morphologisch auffällige Bakterium *Nevskia ramosa*, einem im Jahre 1892 von Famintzin beschriebenen, lange nicht kultivierbaren Bewohner der Wasser-Luft-Grenzschicht – das Neuston –, konnten mit Hilfe des rRNA-Ansatzes, spezifische Sonden entwickelt werden. *N. ramosa* konnte dadurch einem neuen, tiefen Ast der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* zugeordnet werden.

In ähnlicher Weise wurde die Phylogenie und Diversität des auch heute noch unkultivierten Bakteriums *Achromatium oxaliferum*, eines mit bis zu 125 µm Länge ungewöhnlich großen Bewohners der Wasser-Sediment-Grenzschicht, untersucht. Zwei Standorte mit morphologisch unterschiedlichen Populationen wurden phylogenetisch und mit neu entwickelten, für *Achromatium* sp. spezifischen Sonden verglichen. Dabei offenbarte der neutrale Stechlinsee eine Bandbreite verschiedener Genotypen, während der saure Weichwassersee Große Fuchskuhle nur einen Genotyp, den neu beschriebenen „*A. minus*“, beherbergte.

F. Literaturverzeichnis

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. O. Glöckner, A. Wille und R. Psenner.** 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2138-2144.
- Amann, R., F. O. Glöckner und A. Neef.** 1997. Modern methods in subsurface microbiology - *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 191-200.
- Amann, R., H. Lemmer und M. Wagner.** 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: A comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 205-215.
- Amann, R., J. Snidr, M. Wagner, W. Ludwig und K.-H. Schleifer.** 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**: 3496-3500.
- Amann, R., N. Springer, W. Ludwig, H.-D. Görtz und K.-H. Schleifer.** 1991. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**: 161-164.
- Amann, R. I.** 1995. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.6.**: 1-15.
- Amann, R. I., L. Krumholz und D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.
- Amann, R. I., W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key und D. A. Stahl.** 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 614-623.
- Babenzien, H.-D.** 1991. *Achromatium oxaliferum* and its ecological niche. *Zentralbl. Mikrobiol.* **146**: 41-49.

- Babenzien, H.-D.** 1989. Genus *Nevskia* Famintzin 1892. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. s. 1979-1981. Williams & Wilkens, Baltimore, USA.
- Babenzien, H.-D., F. O. Glöckner und R. I. Amann.** 1999. *Achromatium minus* sp. nov., a small colorless purple sulfur bacterium. in prep.
- Babenzien, H.-D. und H. Sass.** 1996. The sediment-water interface - habitat of the unusual bacterium *Achromatium oxaliferum*. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. **48**: 247-251.
- Bahr, M., J. E. Hobbie und M. L. Sogin.** 1996. Bacterial diversity in an arctic lake - a freshwater SAR11 cluster. Aquat. Microb. Ecol. **11**: 271-277.
- Baumann, L., P. Baumann, M. Mandel und R. D. Allen.** 1972. Taxonomy of aerobic marine Eubacteria. J. Bacteriol. **110**: 402-429.
- Beaucage, S. L. und M. H. Caruthers.** 1981. Deoxynucleoside phosphoramidites: A new class of key intermediates for deoxynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. **22**: 1232-1239.
- Benlloch, S., F. Rodriguez Valera und A. J. Martinez Murcia.** 1995. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S-rDNA PCR amplification and partial sequencing. FEMS Microbiol. Ecol. **18**: 267-279.
- Bernardet, J. F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters und P. Vandamme.** 1996. Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga quatilis* Stohl and Tait 1978). Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 128-148.
- Bersa, E.** 1920. Über das Vorkommen von kohlsauerem Kalk in einer Gruppe von Schwefelbakterien. Akad. Wiss. Wien, Math. Nat. Klasse, Abt. I **129**: 231-259.
- Bohlool, B. B. und E. L. Schmidt.** 1980. The immunofluorescence approach in microbial ecology. Adv. Microb. Ecol. **4**: 203-241.
- Britschgi, T. B. und S. J. Giovannoni.** 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1707-1713.

- Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter und H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **148**: 107-127.
- Buchholz-Cleven, B., B. Rattunde und K. Straub.** 1997. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. Syst. Appl. Microbiol. **20**: 301-309.
- Cariello, N. F., W. G. Thilly, J. A. Swenberg und T. R. Skopek.** 1991. Deletion mutagenesis during polymerase chain reaction: Dependence on DNA polymerase. Gene **99**: 105-108.
- Casper, S. J.** 1985. Lake Stechlin - a temperate oligotrophic lake. (Hrsg.): Dr. W. Junk, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq und L. M. Palmer.** 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment implications for release of genetically engineered microorganisms. Bio Technology **3**: 817-820.
- De Boer, W. E., J. W. La Riviere und K. Schmidt.** 1971. Some properties of *Achromatium oxaliferum*. Antonie Leeuwenhoek **37**: 553-563.
- DeLong, E. F.** 1992. *Archaea* in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 5685-5689.
- DeLong, E. F., D. G. Franks und A. L. Alldredge.** 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. Limnol. Oceanogr. **38**: 924-934.
- DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prezelin und R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. Nature **371**: 695-697.
- Dilling, W., W. Liesack und N. Pfennig.** 1995. *Rhabdochromatium marinum* gen. nom. rev., sp. nov., a purple sulfur bacterium from a salt marsh microbial mat. Arch. Microbiol. **164**: 125-131.
- Eguchi, M., T. Nishikawa, K. Macdonald, R. Cavicchioli, J. C. Gottschal und S. Kjelleberg.** 1996. Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1287-1294.

- Ehrlich, H. A., D. Gelfand und R. K. Saiki.** 1989. Specific DNA amplification. *Nature* **331**: 461-462.
- Ekendahl, S., J. Arlinger, F. Stahl und K. Pedersen.** 1994. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S-rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiol.* **140**: 1575-1583.
- Famintzin, A.** 1892. Eine neue Bacterienform: *Nevskia ramosa*. *Arb. Bot. Lab. Kaiserlichen Akad. Wiss. St. Petersburg* **2**: 481-487.
- Farrelly, V., F. A. Rainey und E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S-rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2798-2801.
- Faude, U. C. und M. G. Höfle.** 1997. Development and application of monoclonal antibodies for *in situ* detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4534-4542.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Fitch, W. J.** 1975. Toward finding the tree of maximum parsimony. *In* G. F. Estabrook (Hrsg.): *Proceedings of the Eighth International Conference on Numerical Taxonomy*. s. 189-230. Freeman, San Francisco, USA.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick und et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* **269**: 496-512.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey und P. Jurtschuk, Jr.** 1992. How close is close? 16S-rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.
- Fuerst, J. A.** 1995. The planctomycetes: Emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiol.* **141**: 1493-1506.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum und A. A. Davis.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148-149.

- Fuhrman, J. A., K. McCallum und A. A. Davis.** 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1294-1302.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer und K. G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1988. Phylogenetic groupspecific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**: 720-726.
- Glöckner, F. O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius und K.-H. Schleifer.** 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 403-406.
- Glöckner, F. O., H. D. Babenzien und R. Amann.** 1998. Phylogeny and identification *in situ* of *Nevskia ramosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1895-1901.
- Glöckner, F. O., H.-D. Babenzien, J. Wulf und R. Amann.** 1999. Phylogeny and diversity of *Achromatium oxaliferum*. *Syst. Appl. Microbiol.* in press.
- Göbel, U. B., A. Geiser und E. J. Stanbridge.** 1987. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1969-1974.
- Gonzalez, J. M. und M. A. Moran.** 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4237-4242.
- Gordon, D. A. und S. J. Giovannoni.** 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1171-1177.
- Görtz, H.-D.** 1983. Endonuclear symbionts in ciliates. *Int. Rev. Cytol.* **14 (Suppl.)**: 145-176.
- Görtz, H.-D.** 1986. Endonucleobiosis in ciliates. *Int. Rev. Cytol.* **102**: 169-213.
- Gosink, J. J. und J. T. Staley.** 1995. Biodiversity of gas vacuolate bacteria from Antarctic Sea ice and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3486-3489.

- Gray, N. D., R. W. Pickup, J. G. Jones und I. M. Head.** 1997. Ecophysiological evidence that *Achromatium oxaliferum* is responsible for the oxidation of reduced sulfur species to sulfate in a freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1905-1910.
- Gutell, R. R., N. Larsen und C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S-rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58**: 10-26.
- Hall, B. D. und S. Spiegelman.** 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 137-146.
- Harmsen, H. J. M., D. Prieur und C. Jeanthon.** 1997. Distribution of microorganisms in Deep-Sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2876-2883.
- Head, I. M., N. D. Gray, K. J. Clarke, R. W. Pickup und J. G. Jones.** 1996. The phylogenetic position and ultrastructure of the uncultured bacterium *Achromatium oxaliferum*. *Microbiol.* **142**: 2341-2354.
- Heldal, M. und G. Bratbak.** 1991. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **72**: 205-212.
- Henrici, A. T. und D. E. Johnson.** 1935. Studies of freshwater bacteria. II. Stalked bacteria, a new order of Schizomycetes. *J. Bacteriol.* **30**: 61-92.
- Hicks, R. E., R. I. Amann und D. A. Stahl.** 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S-rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2158-2163.
- Hiorns, W. D., B. A. Methe, S. A. Nierzwicki-Bauer und J. P. Zehr.** 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S-rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2957-2960.
- Hirsch, P.** 1991. The genus *Blastobacter*. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*. s. 2171-2175. Fischer Verlag, New York.
- Hirsch, P.** 1991. The genus *Nevskia*. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*. s. 4090-4092. Fischer Verlag, New York.
- Hirsch, P. und G. Rheinheimer.** 1968. Biology of budding bacteria. V. Budding bacteria in aquatic habitats: occurrence, enrichment and isolation. *Arch. Mikrobiol* **62**: 289-306.

- Hovanec, T. A. und E. F. Delong.** 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2888-2896.
- Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand und M. A. Brow.** 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9436-9440.
- Jannasch, H. W. und G. E. Jones.** 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* **4**: 128-139.
- Jukes, T. H. und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. *In* M. N. H. (Hrsg.): *Mammalian prot. metabolism.* s. 21-132. Academic Press, New York.
- Kapuscinski, J. und W. Szer.** 1979. Interactions of 4',6'-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acid Res.* **6**: 3519-3534.
- Kepner, R. L. und J. R. Pratt.** 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples - past and present. *Microbiol. Rev.* **58**: 603-615.
- Kisand, V.** 1998. FISH on native aquatic Bacteria: a comparative study by use of transmission electron microscope and rRNA-targeted oligonucleotide probes. ISME-8, Halifax, Canada.
- Kolter, R., D. A. Siegele und A. Tormo.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 855-874.
- Krassilnikov, N. A.** 1959. *Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten*, Fischer Verlag, Jena, Germany.
- Kretz, K., W. Callen und V. Hedden.** 1994. Cycle sequencing. *PCR Met. Appl.* **3**: S107-112.
- La Riviere, J. W. M. und K. Schmidt.** 1989. The Genus *Achromatium*. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* s. 2131-2133. Williams & Wilkens, Baltimore.
- La Riviere, J. W. M. und K. Schmidt.** 1991. Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing Eubacteria. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes.* s. 3934-3947. Fischer Verlag, New York.
- Lackey, J. B. und E. W. Lackey.** 1961. The habitat and description of a new genus of sulfur bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 29-39.

- Lambert, W. und U. Sommer.** 1997. Limnoecology. (Hrsg.): Oxford University Press, Oxford, UK.
- Lane, D. J., D. A. Stahl, G. J. Olsen, D. J. Heller und N. R. Pace.** 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S-rRNA sequences. J. Bacteriol. **163**: 75-81.
- Lathe, R.** 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino-acid sequence data theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol. **183**: 1-12.
- Lauterborn, R.** 1915. Die sapropelische Lebewelt. Verhandl. Naturhistor. Mediz. Ver. Heidelberg **13**: 395-481.
- Liesack, W. und E. Stackebrandt.** 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as Revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. **174**: 5072-5078.
- Llobet-Brossa, E., R. Rossellò-Mora und R. Amann.** 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by Fluorescence-*in-situ*-Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2691-2696.
- Ludwig, W.** 1995. Sequence Databases. Molecular Microbial Ecology Manual **3.3.5.**: 1-22.
- Ludwig, W. und K. H. Schleifer.** 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S-rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. **15**: 155-173.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner und K. H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis **19**: 554-568.
- MacLeod, R. A.** 1965. The question of the existence of specific marine bacteria. Bact. Rev. **29**: 9-23.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey und C. R. Woese.** 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acid Res. **25**: 109-110.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt und K.-H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S-rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. Microbiol. **142**: 1097-1106.

- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Manz, W., M. Wagner, R. Amann und K.-H. Schleifer.** 1994. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* **28**: 1715-1723.
- Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom und W. G. Wade.** 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 795-799.
- Marmur, J. und D. Lane.** 1960. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Biological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 453-461.
- Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston und E. F. Delong.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 50-56.
- Mathias, C. B., A. K. T. Kirschner und B. Velimirov.** 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3734-3740.
- Methé, B. A., W. D. Hiorns und J. P. Zehr.** 1998. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition - analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 368-374.
- Meyerhans, A., J. P. Vartanian und S. Wain-Hobson.** 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acid Res.* **18**: 1687-1691.
- Morita, R. Y.** 1992. Low-nutrient environments. *In* J. Lederberg (Hrsg.): *Encyclopedia of Microbiology*. s. Academic press, Inc., San Diego, London.
- Mullins, T. D., T. B. Britschgi, R. L. Krest und S. J. Giovannoni.** 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 148-158.
- Murphy, J. und J. P. Riley.** 1962. A modified solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analyt. Chem. Acta* **27**: 31-36.
- Murray, V.** 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* **17**: 8889.

- Muyzer, G., E. C. de Waal und A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsen und H. W. Jannasch.** 1995. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S-rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**: 165-172.
- Naumann, E.** 1931. *Limnologische Terminologie*. Berlin.
- Neef, A.** 1997. Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Thesis, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München.
- Netter, H.** 1950. *Biologische Physikochemie*. Deutsche Demokratische Republik.
- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig und H. Backhaus.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S-rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**: 5636-5643.
- Ogasawara, N., S. Nakai und H. Yoshikawa.** 1994. Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. *DNA Research* **1**: 1-14.
- Oliver, J. D., L. Nilsson und S. Kjelleberg.** 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2640-2644.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace und D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 337-365.
- Olsen, G. J., C. R. Woese und R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**: 1-6.
- Ottenjann, T.** 1998. Vergleich von rosettenbildenden Bakterien aus dem Neuston verschiedener Gewässer. Diplomarbeit, Universität Oldenburg.

- Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae und V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3367-3373.
- Pace, N. R., G. J. Olsen und C. R. Woese.** 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* **45**: 325-326.
- Painchaud, J., J. C. Therriault und L. Legendre.** 1995. Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the Saint Lawrence estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 205-208.
- Pedersen, K., J. Arlinger, S. Ekendahl und L. Hallbeck.** 1996. 16S-rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* **19**: 249-262.
- Pedersen, K., J. Arlinger, L. Hallbeck und C. Pettersson.** 1996. Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S-rRNA gene sequencing. *Mol. Ecol.* **5**: 427-436.
- Pernthaler, J., A. Alfreider, T. Posch, S. Andreatta und R. Psenner.** 1997. *In situ* classification and image cytometry of pelagic bacteria from a high mountain lake (Gossenköllesee, Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4778-4783.
- Pernthaler, J., F. O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider und R. Amann.** 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archaea* in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4299-4306
- Peterson, M. G.** 1988. DNA sequencing using *Taq* polymerase. *Nucleic Acid Res.* **16**: 10915.
- Pfennig, N. und H. G. Trüper.** 1991. The family Chromatiaceae. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*. s. 3200-3221. Fischer Verlag, New York.
- Pinhassi, J., U. L. Zweifel und A. Hagstrom.** 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3359-3366.

- Polz, M. F. und C. M. Cavanaugh.** 1997. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on *in-vitro*-transcription of 16S-rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 1028-1033.
- Porter, K. G. und Y. S. Feig.** 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. **25**: 943-948.
- Pramer, D., A. F. Carlucci und P. Y. Scarpino.** 1963. The bactericidal action of sea water. Symposium on marine microbiology, Springfield.
- Prévot, A.-R.** 1961. Traité de systématique bactérienne. Aufl. (Hrsg.), Dunod, Paris, Frankreich.
- Rainey, F. A., N. Ward, L. I. Sly und E. Stackebrandt.** 1994. Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S-rDNA, on the primer pair and the cloning system used. Experientia **50**: 796-797.
- Rath, J., K. Y. Wu, G. J. Herndl und E. F. Delong.** 1998. High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. Aquat. Microb. Ecol. **14**: 261-269.
- Reysenbach, A. L., L. J. Giver, G. S. Wickham und N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3417-3418.
- Rheinheimer, G.** 1991. Mikrobiologie der Gewässer. 5. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena.
- Rossello-Mora, R. A., J. Lalucat und E. Garcia-Valdes.** 1994. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 966-972.
- Roszak, D. B. und R. R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. **51**: 365-379.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491.
- Saitou, N. und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.

- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- Schewiakoff, W.** 1893. Über einen neuen bacterienähnlichen Organismus des Süßwassers. Heidelberg: Habilitationsschrift 1-38.
- Schleifer, K.-H., W. Ludwig und R. Amann.** 1993. Nucleic acid probes. In M. Goodfellow und A. G. O'Donnell (Hrsg.): The new bacterial systematics. s. 463-510. Academic Press, New York.
- Schlesner, H.** 1994. The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. Syst. Appl. Microbiol. **17**: 135-145.
- Schmidt, T. M., E. F. DeLong und N. R. Pace.** 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S-rRNA gene cloning and sequencing. J. Bacteriol. **173**: 4371-4378.
- Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko und R. Amann.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3268-3273.
- Schut, F., E. J. De Vries, J. C. Gottschal, B. R. Robertson, W. Harder, R. A. Prins und D. K. Button.** 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture growth maintenance and characteristics of isolates under laboratory conditions. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2150-2160.
- Schwoerbel, J.** 1993. Einführung in die Limnologie. 7. Aufl.. G. Fischer (Hrsg.), UTB-Verlag, Jena.
- Shewan, J. M. und T. A. McMeekin.** 1983. Taxonomy (and ecology) of *Flavobacterium* and related genera. Annu. Rev. Microbiol. **37**: 233-252.
- Skerman, V. B.** 1959. A guide to the identification of the genera of bacteria. (Hrsg.): Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Skuja, H.** 1948. Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland. Symb. Bot. Ups. **9**: 1-399.
- Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig und K.-H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 2884-2896.

- Sommaruga, R., I. Obernosterer, G. J. Herndl und R. Psenner.** 1997. Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4178-4184.
- Southwick, P. L., L. A. Ernst, E. W. Tauriello, S. R. Parker, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, H. A. Clever und A. S. Waggoner.** 1990. Cyanine dye labeling reagents-carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* **11**: 418-430.
- Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, H. van Gernerden und N. Petersen.** 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2397-2403.
- Springer, N., R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer und H. Schmidt.** 1996. *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the beta-subclass of *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 333-336.
- Springer, N., W. Ludwig, R. Amann, H. J. Schmidt, H. D. Goertz und K.-H. Schleifer.** 1993. Occurrence of fragmented 16S-rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9892-9895.
- Stackebrandt, E. und B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S-rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Stahl, D. A.** 1984. Analysis of hydrothermal vent associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **224**: 409-411.
- Stahl, D. A. und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes. *In* E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.): *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. s. 205-248. John Wiley&Sons Ltd., Chichester, UK.
- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield und L. Montgomery.** 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1079-1084.
- Stahl, D. A., R. Key, B. Flesher und J. Smit.** 1992. The phylogeny of marine and freshwater caulobacters reflects their habitat. *J. Bacteriol.* **174**: 2193-2198.

- Stahl, D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S-rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1379-1384.
- Starr, M. P. und V. D. Skerman.** 1965. Bacterial Diversity: the natural history of selected morphologically unusual bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **19**: 420-422.
- Strunk, O., O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckman, B. Nonhoff, M. Lenke, A. Ginhardt, A. Vilbig, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer und W. Ludwig.** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München
- Stürmeyer, H., J. Overmann, H. D. Babenzien und H. Cypionka.** 1998. Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1890-1894.
- Suzuki, M. T. und S. J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S-rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630.
- Suzuki, M. T., M. S. Rappe, Z. W. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Strobel und S. J. Giovannoni.** 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 983-989.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, S. Toze, B. E. Rittmann und D. A. Stahl.** 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* **176**: 6623-6630.
- Torsvik, V., J. Goksoyr und F. L. Daae.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782-787.
- Tuomi, P., T. Torsvik, M. Heldal und G. Bratbak.** 1997. Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2181-2188.
- Van De Peer, Y., S. Nicolai, P. De Rijk und R. De Wachter.** 1996. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acid Res.* **24**: 86-91.
- Vollenweider, R. A.** 1968. Scientific fundamentals of eutrophication of lakes and flowing waters with special reference to phosphorus and nitrogen. *OECD/DAS/CSI* **68.27**: 1-159.

- Voytek, M. A. und B. B. Ward.** 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1444-1450.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer und K.-H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520-1525.
- Wahl, G. M., S. L. Berger und A. R. Kimmel.** 1987. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: Theoretical concepts and practical considerations. *Methods in Enzymology* **152**: 399-407.
- Wallner, G., R. Amann und W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent *in situ*-hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136-143.
- Ward, D. M., R. Weller und M. M. Bateson.** 1990. 16S-rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Ward-Rainey, N., F. A. Rainey, H. Schlesner und E. Stackebrandt.** 1995. Assignment of hitherto unidentified 16S-rDNA species to a main line of descent within the domain *Bacteria*. *Microbiol.* **141**: 3247-3250.
- Weinbauer, M. G. und C. A. Suttle.** 1997. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.* **13**: 225-232.
- Weller, R. und D. M. Ward.** 1989. Selective recovery of 16S-rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1818-1822.
- Weller, R., J. W. Weller und D. M. Ward.** 1991. 16S ribosomal RNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1146-1151.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman und W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6578-6583.
- Winogradsky, S.** 1888. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien **1**: 1-120.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

- Woese, C. R.** 1994. There must be a prokaryote somewhere: Microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* **58**: 1-9.
- Woese, C. R. und E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.
- Wright, T. D., K. L. Vergin, P. W. Boyd und S. J. Giovannoni.** 1997. A novel delta-subdivision proteobacterial lineage from the lower ocean surface layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1441-1448.
- Zarda, B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R. I. Amann und J. Zeyer.** 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* **168**: 185-192.
- Zavarzin, G. A., E. Stackebrandt und R. G. Murray.** 1991. A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can. J. Microbiol.* **37**: 1-6.
- Zhou, J., M. A. Bruns und J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.
- Zobell, C. E. und H. C. Upham.** 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* **5**: 239-292.
- Zuckerkindl, E. und L. Pauling.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**: 357-366.
- Zwart, G., R. Huismans, M. P. Van Agterveld, Y. Van De Peer, P. De Rijk, H. Eenhoorn, G. Muyzer, E. J. Van Hannen, H. J. Gons und H. J. Laanbroek.** 1998. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 159-169.
- Zweifel, U. L. und A. Hagström.** 1995. Total counts of marine *Bacteria* include a large fraction of non-nucleoid-containing *Bacteria* (Ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2180-2185.

Die vorliegende Arbeit wurde im Juli 1995 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer begonnen und ab April 1997 bis zum Dezember 1998 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen unter Leitung von Herrn PD Dr. Rudolf Amann beendet.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Dr. Rudi Amann für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten, seine Fairneß und Weitblick, die guten fachlichen und persönlichen Gespräche, daß richtige Maß an Freiheit und die entscheidende Dosis Motivation zur richtigen Zeit. Unvergessen wird mir dabei immer bleiben, wie er sich stets bemühte, uns die Vorzüge des Nordens zu erläutern.

Herrn Prof. Dr. Schleifer für die Arbeitsmöglichkeit in München, sein Interesse an dieser Arbeit und die mir entgegengebrachte Unterstützung.

Herrn Dr. Wolfgang Ludwig für das exzellente Programm ARB, das für mich Himmel und Hölle zugleich darstellte.

Frau Sibylle Schadhauer und allen Mitgliedern unseres „alten“ Labors in München für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die guten Gespräche.

Herrn Marcus Schmöger, für die Strukturen im Chaos, seine Bemühungen mir etwas lateinische Sprachkultur beizubringen und die vielen interessanten Diskussionen.

Herrn Bernhard Fuchs, unseren Zimmergenossen, der sich einfach nicht von uns überzeugen lassen wollte, daß in München ja doch alles viel besser war und damit gar nicht so unrecht hatte.

Herrn Willi Schönhuber, für den Beweis, daß zwei an sich grundverschiedene Charaktere durchaus krisensichere Freundschaften eingehen können. Die Bedeutung Landshuts für Deutschland, die Welt und das ganze Universum war mir nie so klar wie heute.

Meine Eltern und Großeltern, die stets da waren wenn man sie brauchte und vieles erleichterten, oder sogar erst möglich gemacht haben.

Meiner Freundin Christiane, die mir ohne zu Zögern in unbekannte Länder gefolgt ist und auf deren Liebe und Hilfe ich nicht hätte verzichten wollen. Sie ist nach wie vor der Antrieb und die Sicherheit in meinem Leben.