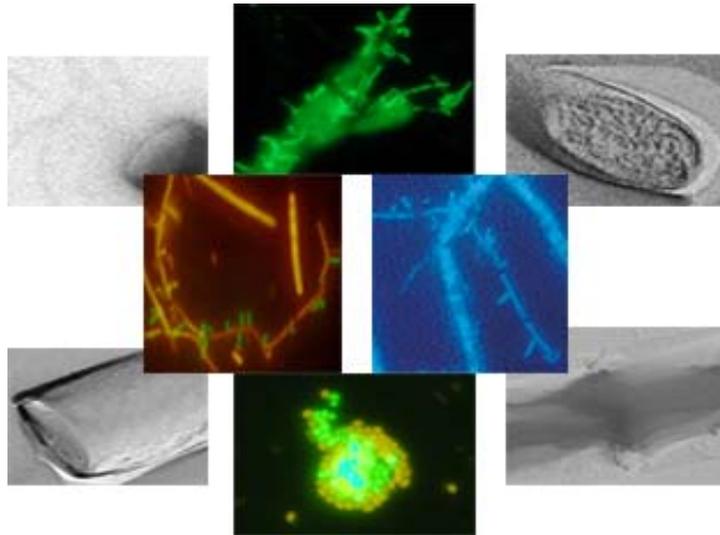


Untersuchungen zu neuartigen, charakteristisch strukturierten mikrobiellen Lebensgemeinschaften in kalten, sulfidischen Gewässern in Bayern



DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg



vorgelegt von

Marcus Koch

aus Zilchenricht

Regensburg, 2005

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. R. Huber

Promotionsgesuch eingereicht am: 05.07.2005

Prüfungsausschuß:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter	Prof. Dr. R. Huber
	2. Gutachter	Prof. Dr. M. Thomm
	3. Prüfer	Prof. Dr. S. Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	14
1. Bezugsquellen	14
1.1 Chemikalien und Biochemikalien	14
1.2 Reaktionskits	15
1.3 Enzyme.....	15
1.4 Sekundäre Antikörper.....	15
1.5 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden.....	15
1.6 Gase.....	15
1.7 Molekularmassenstandards	16
1.8 Verbrauchsmaterialien.....	16
1.9 Sonstiges	17
2. Organismen und Kultivierungsbedingungen	18
3. Herstellen der Kulturmedien	19
3.1 <i>Thiothrix</i> -Medium (TH), aerob und anaerob	19
3.2 TT-Sip-Agarplatten	20
3.3 Sippenauer Moor Medium (TTM-Medium; Amann, 2003), modifiziert für SipMet1	21
3.4 Moor- und Aubachmedium (MM und MAub)	22
3.5 LB-Medium und LB-Platten	23
3.6 Medium für <i>Flavobacterium aquatile</i> (DSMZ 102).....	23
3.7 Medium für <i>Microscilla aggregans</i> (DSMZ 172).....	23
3.8 Medium für <i>Batrachospermum sirodotia</i>	23
3.9. MS-Medium	24
3.9.1 Mineralienelixier nach Wolfe 10x / pH 1,0 / neu – Titriplex.....	25
3.9.2 Vitaminlösung nach Wolfe (10x).....	25
3.10 MM-Medium.....	25
3.10.1 Synthetisches Meerwasser	26
3.10.2 Mineralienelixier nach Wolfe	26
3.11 Medium für <i>Methanogenium bourgense</i> (DSMZ 332).....	26
4. Sterilisation	27
4.1 Sterilisation der Medien	27
4.2 Sterilisation der Substrate und Zusätze	27
4.3 Sterilisation der Glasgeräte und der Gebrauchsgegenstände.....	27
5. Mikroskopie	27
5.1 Phasenkontrastmikroskopie.....	27
5.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	28
5.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	28
5.4 Gram-Färbung	28

5.5 Elektronenmikroskopie	29
5.5.1 Probenvorbereitung.....	29
5.5.2 Herstellung von Suspensionspräparaten	29
5.5.3 Kontrastierung von Suspensionspräparaten	29
5.5.4 Gefrierätzung	29
5.5.5 Digitale Bildbearbeitung am EM.....	30
6. Messungen im Biotop und Probenentnahme	30
6.1 Messung physikalischer und chemischer Parameter	30
6.1.1 Temperatur.....	30
6.1.2 pH-Wert	30
6.1.3 Sulfidgehalt.....	31
6.1.4 Sauerstoff.....	31
6.1.5 Leitfähigkeit.....	31
6.2 Probenentnahme	31
6.3 Dokumentation	31
7. Isolierung und Aufreinigung von Umwelt-DNA.....	32
7.1 DNA-Isolierung nach Barns et al., 1994; modifiziert.....	32
7.1.1 Lösungen	32
7.1.2 Durchführung.....	33
7.2 DNA-Isolierung aus Algenproben.....	33
7.3 DNA-Isolierung mit Reaktionskit	34
7.4 DNA-Aufreinigung	34
7.4.1 Lösungen	34
7.4.2 Präparation von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	34
7.4.3 Präparation der Säulchen	35
7.4.4 Durchführung.....	35
7.5 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
7.5.1 Ethidiumbromid-Agaroseplatten-Methode	35
7.5.2 Photometrische Bestimmung	36
8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
8.1 Lösungen	36
8.2 Primer.....	37
8.3 Durchführung	38
8.4 Überprüfung des PCR-Produkts durch Gelelektrophorese.....	40
8.5 Ganzzell-PCR.....	40
8.6 Reamplifikations-PCR	40
8.7 PCR-Screening	40
9. Klonierung	41
9.1 Lösungen.....	41
9.2 Reinigung des PCR-Produkts.....	41
9.2.1 Reinigung über Microcon 100-Filter bzw. Montage PCR.....	41

9.2.2 Reinigung mittels Gelelektrophorese.....	41
9.3 Durchführung	42
9.3.1 Klonierung mit dem Original TA Cloning® Kit.....	42
9.3.2 Klonierung mit dem Qiagen® PCR Cloning Kit.....	42
9.3.3 Sicherung der Klone und Amplifikation der Insertionsfragmente	42
9.4 Screening der Klone und Restriktionsverdau (ARDRA).....	43
9.5 Sichern der Klone in Glycerinkulturen.....	44
9.6 Isolierung von Plasmid-DNA	44
9.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA	44
10 Sequenzdatenanalyse.....	44
11. Ganzzellhybridisierungen mit Oligonukleotiden.....	45
11.1 Auswahl der Oligonukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe	45
11.2 Sondenkonstruktion.....	46
11.3 Beschichtung der Objektträger	47
11.4 Fixierung der Zellen	47
11.5 Durchführung	48
11.5.1 Trägergebundene Hybridisierung	48
11.5.2 DAPI-Färbung	50
11.5.3 Hybridisierung in Suspension.....	50
12. Bestimmung der Lebensfähigkeit mittels BacLight™-Färbung	51
13. Zellvereinzelung mit Hilfe der „optischen Pinzette“	51
13.1 Vorbereitung der Laserkapillaren.....	51
13.2 Durchführung	51
14. Immunologische Methoden.....	52
14.1 Produktion von spezifischen Antikörpern	52
14.2 Lösungen	52
15. Immunomagnetische Isolierung von Mikroorganismen	53
15.1 Lösungen	53
15.2 Waschen der Dynabeads	54
15.3 Koppeln der Antikörper an die Dynabeads	54
15.4 Zellvereinzelung mit Dynabeads.....	54
15.4.1 Zellvereinzelung mit zwei verschiedenen Antikörpern	55
15.4.2 Zellvereinzelung mit einem Antikörper.....	55
16. Zellvereinzelung mit Hilfe des Laserkatapults	55
17. Zellvereinzelung mit Hilfe des Zellsorters.....	55
III. Ergebnisse.....	56
1. Untersuchung zur Verteilung der Archaeen im Sippenauer Moor.....	56
1.1 Beschreibung der Probenentnahmeorte	56
1.2 Mikrobielle Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt	59
1.2.1 Weißlich- oder bräunlich-grüne Streamer.....	59

1.2.2 Weißlich-grünlich gefärbte Algen	59
2. Untersuchung zur Verteilung von Archaeen im Islinger Mühlbach.....	61
2.1. Beschreibung der Probenentnahmeorte	61
2.2 Mikrobielle Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt	62
2.2.1 Bräunlich-grüne Streamer	62
2.2.2 Weiße Biofilmmatten.....	63
3. FISH-Untersuchungen der neuen crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft.....	64
4. Phylogenetische Untersuchungen.....	64
4.1 Phylogenetische Untersuchungen an weißlich-grünen Streamern.....	64
4.2 Phylogenetische Untersuchungen an weißlich bewachsenen Algen	65
4.3 Sondenkonstruktion basierend auf den erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen.....	68
5. Anreicherungsversuche für die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft.....	68
5.1 Verschiedene Anheftungsmaterialien.....	68
5.2 Trichtersysteme	69
5.3 Entwicklung eines neuen <i>in-situ</i> Kultivierungssystems	71
5.3.1 Formenbau	71
5.3.2 Austesten der Substratkonzentration.....	72
5.3.3 Herstellen des neuen <i>in-situ</i> Kultivierungssystems.....	72
5.3.4 Inkubation im Biotop	73
5.3.5 Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitung für FISH	73
5.3.6 Der Lebenszyklus der crenarchaeell/bakteriellen Gemeinschaft	74
6. Isolationsversuche der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft	76
6.1 Plattierungen.....	76
6.1.1 Aerobe Anreicherungsversuche	76
6.1.2 Mikroaerophile Anreicherungsversuche	76
6.1.3 Anaerobe Anreicherungsversuche	77
6.1.4 Zuordnung der Isolate.....	77
6.2 Laservereinzelungen.....	77
6.2.1 Laservereinzelungen auf mikroaerophile Medien.....	78
6.2.2 Laservereinzelungen auf anaerobe Medien.....	78
6.2.3 Phylogenetische Untersuchungen zu den erhaltenen Reinkulturen	78
6.2.4 Laservereinzelung auf Medien mit vorgezüchteten Kulturen	80
6.3 Anreicherungskulturen	80
6.3.1 Statistische Anreicherungskulturen	80
6.3.2 Variation des pH-Werts	81
6.3.3 Variation der Temperatur.....	81
6.3.4 Variationen des Sauerstoffgehalts.....	81
6.3.5 Variation der Belichtung.....	81
6.3.6 Phylogenetische Untersuchungen an den angereicherten Kulturen	82
6.4 Kontinuierliche Anreicherungskulturen im Fermenter.....	82
7. Zellvereinzlungen mit dem Laserkatapult.....	84
7.1 Vorversuche mit FISH auf verschiedenen Foliensystemen	84
7.2 Vorversuche zur Amplifikationsfähigkeit hybridisierter Zellen.....	85
7.3 Zellvereinzlungen mittels Laserkatapult.....	85

7.4 PCR-Ansätze mit den vereinzelt Zellen.....	85
8. Zellvereinzelung mit dem Zellsorter	86
8.1 Vorversuche zum Zellsorten	86
8.2 Zellvereinzelung von fluoreszenzmarkierten Zellen	87
9. Immunomagnetische Isolierung von Zellen	89
9.1 Immunomagnetische Isolierung von Zellen mit primären und sekundären Antikörpern	89
9.2 Immunomagnetische Isolierung von Zellen mit primären Antikörpern	89
10. Untersuchungen zum bakteriellen Partner des Crenarchaeons.....	91
10.1 Mikroskopische Untersuchungen	91
10.2 FISH mit der CFB-spezifischen Sonde CF319a/b.....	91
10.3 Konstruktion einer spezifischen FISH-Sonde für die isolierten Vertreter der CFB-Gruppe	91
10.4 Konstruktion einer spezifischen FISH-Sonde gegen Sip100.....	93
10.5 Herstellung von Antikörpern gegen Sip100	94
10.6 Immuno-FISH mit Sip100, verschiedenen CFB-Vertretern und Originalproben.....	95
11. Weiterführende Untersuchungen zur crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft	96
11.1 Hinweise auf parasitären Stoffwechsel.....	96
11.2 Erste Hinweise auf ein Drei-Domänen-System.....	98
12. Charakterisierung von Sip100.....	101
12.1 Phasenkontrastmikroskopie	101
12.2 Kultivierung unter Standardbedingungen.....	101
12.3 Variation der Substrate.....	101
12.4 Variation der Sauerstoffkonzentration.....	101
12.5 Variation des pH-Werts.....	102
12.6 Variation der Temperatur	102
12.7 Variation der Salzkonzentration	102
12.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	102
12.9 Kreuzkontaminationsversuche mit <i>Thiotrix nivea</i>	104
12.10 Kreuzkontaminationsversuche mit der Alge <i>Batrachospermum sirodotia</i>	105
13. Phylogenetische Untersuchungen an den Algen	106
13.1 Bestimmung der Gattung durch Mikroskopie	106
13.2 DNA-Isolierung, Sequenzierung und phylogenetische Einordnung.....	107
14. Anreicherung von Archaeen aus kalten sulfidischen Biotopen	109
14.1 Anreicherung von Archaeen aus dem Sippenauer Moor	109
14.2 Anreicherung von Archaeen aus dem Islinger Mühlbach	110
14.3 Phylogenetische Untersuchungen der Isolate	116
14.4 Phylogenetische Analysen der Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor	116
14.5 Phylogenetische Analysen der Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach.....	117
14.6 Konstruktion von FISH-Sonden basierend auf der crenarchaeellen Klonsequenz	119

14.7 Phylogenetische Untersuchungen der Isolate	119
14.7.1 Medienvariation	119
14.7.2 Variation der Gasphasen	119
14.7.3 Variation der Temperatur	120
14.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zu einigen Isolaten	120
14.8.1 Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor	120
14.8.2 Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach	124
14.9 Verdünnungsreihen der einzelnen Anreicherungen	131
14.10 Antibiotika-Ansätze	131
14.11 Zellvereinzelung verschiedener Archaeen mittels optischer Pinzette	132
14.11.1 Zellvereinzelung auf Standardmedien	132
14.11.2 Isolierung von IM4 mit optischer Pinzette	132
14.11.3 Zellvereinzelung auf Medien mit Zusatz	133
15. Weiterführende Untersuchungen zum methanogenen Isolat SipMet1	133
15.1 Laservereinzelung von SipMet1	133
15.2 Phylogenetische Untersuchungen	134
15.3 Physiologische Untersuchungen	135
15.3.1 Variation der Substrate	135
15.3.2 Variation des pH-Bereichs	136
15.3.3 Variation der Temperatur	136
15.3.4 Variation der Salzkonzentration	136
15.3.5 Variation der Gasphasen	136
15.3.6 Gram-Färbung	136
15.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	136
15.5. Hinterlegung von SipMet1 bei DSMZ und ATCC	138
IV. Diskussion	139
V. Vorschlag zur Beschreibung einer neuen Art	154
VI. Zusammenfassung	155
VII. Literaturverzeichnis	157

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

16S rRNA	ribosomale RNA der kleinen Untereinheit der bakteriellen/archaeellen Ribosomen	Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
18S rRNA	ribosomale RNA der kleinen Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen	NK	Negativkontrolle
a	archaeell	Nr.	Nummer
Abb.	Abbildung	OD	optische Dichte
abs.	absolut	opt.	optional
ad	zu	p.a.	zur Analyse
al.	alii	Pa	Pascal
ARCH-Mix	archaeelle Oligonukleotid-Sondenmischung	PBS	Phosphate buffered saline
ARDRA	Amplified rDNA restriction analysis	PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
b	bakteriell	pers. Mittl.	persönliche Mitteilung
bidest.	zweifach destilliert	pH	pondus hydrogenii (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
bp	Basenpaare	PK	Positivkontrolle
BSA	Rinderserumalbumin	Pos.	Position
bzw.	beziehungsweise	PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
C	Celsius	R	rückwärts
ca.	circa	RG	Rhodamin Green (5(6)-carboxyrhodamin succinimidyl ester)
cm	Zentimeter	RNA	Ribonukleinsäure
CY3	Indodicarbocyanine 3-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-di-isopropyl)-phosphoramidit	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol	RT	Raumtemperatur
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	s	Sekunde
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat	s.	siehe
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	s.u.	siehe unten
d.h.	das heißt	S	Sedimentationskoeffizient nach Svedberg
DMSO	Dimethylsulfoxid	S.	Seite(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat	s.o.	siehe oben
Ed.	Editor	sog.	sogenannt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	sp.	Spezies
EM	Elektronenmikroskop	spez.	spezifisch
EUB-Mix	bakterielle Oligonukleotid-Sondenmischung	Tab.	Tabelle
evtl.	eventuell	TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
F	vorwärts	Taq-Polymerase	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
Fa.	Firma	T _m	Schmelztemperatur der DNA
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung	Tris	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
g	Gramm	TZ	Tischzentrifuge
ggf.	gegebenenfalls	U	Units
GC	Guanin, Cytosin	u	universell
h	Stunde	ün	über Nacht
I.E.	internationale Einheit	unpubl.	unpubliziert
inkl.	inklusive	Upm	Umdrehungen pro Minute
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid	UV	Ultraviolett(strahlung), 10-400nm Wellenlänge
ISKS	<i>in-situ</i> Kultivierungssystem	V	Volt
k.A.	keine Angabe	v.a.	vor allem
konz.	Konzentriert	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	vgl.	vergleiche
LD	low DNA	w/v	Gewicht pro Volumen
m	Meter	w/w	Gewichtsprozent
M	molar	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
min	Minute(n)	z.B.	zum Beispiel
mind.	mindestens	z.T.	zum Teil
N	normal		

Symbole:

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
%	Prozent	&	und
°C	Grad Celsius	®/TM	Warenzeichen
λ	Wellenlänge	=	ist gleich
\emptyset	Durchmesser		

Symbole und ihre Bedeutung

Einheiten:

<i>Präfix</i>	<i>Symbol</i>	<i>Faktor</i>	<i>Präfix</i>	<i>Symbol</i>	<i>Faktor</i>
Kilo	k	10^3	Centi	c	10^{-2}
Hekto	h	10^2	Milli	m	10^{-3}
Deka	da	10^1	Mikro	μ	10^{-6}
Dezi	d	10^{-1}	Nano	n	10^{-9}

Präfixe für Einheiten, Symbole und Faktor

IUPAC-Code für Nucleotide:

<i>Code</i>	<i>Nucleotid(e)</i>	<i>Code</i>	<i>Nukleotid(e)</i>
A	Adenin	N	A/ C/ G/ T
B	G/ C/ T	R	A/ G
C	Cytosin	S	G/ C
D	A/ G/ T	T	Thymin
G	Guanin	U	Uracil
H	A/ C/ T	V	A/ G/ C
K	G/ T	W	A/ T
M	A/ C	Y	C/ T

IUPAC-Code für Nukleotide

Chemische Elementsymbole wurden gemäß den IUPAC-Richtlinien verwendet.

1. Einleitung

Prokaryonten sind die zahlenmäßig größte Gruppe an Lebewesen auf der Erde. Ihre Gesamtzahl übertrifft mit ca. 10^{30} (Curtis and Sloan, 2004) die Zahl der Eukaryonten bei weitem. Zudem zeigen sie im Vergleich mit den Eukaryonten weitaus vielfältigere Stoffwechselwege. Damit beeinflussen sie maßgeblich alle Stoffkreisläufe, ohne die Leben auf der Erde unmöglich wäre. Durch ihre enorme Anpassungsfähigkeit konnten sie selbst Biotope mit extremen Temperaturen, pH-Werten und hoher Salinität besiedeln, in denen bisher keine Eukaryonten nachgewiesen werden konnten (Rothschild und Mancinelli, 2001; Torsvik et al., 2002; Schleifer, 2004).

Da bis jetzt schätzungsweise nur 0,1-1% der Mikroben erforscht und kultiviert werden konnten, ist über ihre Diversität, Phylogenie, Genetik und Ökologie bisher sehr wenig bekannt (Amann et al., 1995; Janasch und Jones, 1959; Stein et al., 1996; Colwell, 1997; Vetriani et al., 1998). Im Vergleich zu den Eukaryonten (ca. 1,9 Millionen beschriebene Tier- und Pflanzenarten; Baron et al., 1992) wurden nur sehr wenige Arten von Prokaryonten beschrieben (ca. 6000 beschriebene Arten; Fox, 2003).

Im Jahr 1977 wurde erstmals durch die Verwendung der 16S/18S rRNA Gensequenzen als genetische Marker ein natürliches System zur Einteilung der Lebewesen geschaffen. Durch dieses System ist es gelungen alles Leben der Erde in drei Domänen, *Eucarya*, *Bacteria* und *Archaea* einzuteilen (Woese and Fox, 1977). Von der Domäne der Archaeen wurde lange Zeit angenommen, dass sie ausschließlich aus extremophilen Mikroorganismen zusammengesetzt ist, die spezielle ökologische Nischen besetzen, welche den meisten Bakterien und Eukaryonten unerschlossen blieben (Woese et al., 1990; McInerney et al., 1997, Stetter, 1999). Hyperthermophile Archaeen wachsen optimal bei Temperaturen von mindestens 80°C und zeigen unter 60°C kein Wachstum mehr (Stetter, 1996a). Es könnte sich bei hyperthermophilen Organismen, die vielfach unter anaeroben Bedingungen und der Gegenwart von H₂ und CO₂ wachsen, um ursprüngliche Lebensformen handeln, da auf der Urerde ähnliche Bedingungen vorherrschten (Stetter, 1996b). Die Domäne der Archaeen wird mittlerweile in vier Reiche *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota* und *Korarchaeota* unterteilt (Huber et al., 2002). Während die *Korarchaeota* bisher nur über 16S rRNA-Gensequenzen nachgewiesen wurden (Barns et al., 1994; 1996), konnte von den *Nanoarchaeota* mit *Nanoarchaeum equitans* ein hyperthermophiler Vertreter in Kokultur mit

Ignicoccus sp. KIN4I, einem Vertreter der *Crenarchaeota* erhalten werden (Huber et al., 2002; 2003).

Dem Reich der *Euryarchaeota* gehören vor allem methanogene und extrem halophile Mikroorganismen an, sowie die hyperthermophilen Gattungen *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Pyrococcus* und *Thermococcus*. Methanogene Archaeen haben eine große ökologische Bedeutung. Sie können durch anaeroben Abbau von organischem Material Methan produzieren. Dazu werden neben Acetat und H_2/CO_2 , den wichtigsten Substraten der Methanogenese (Takai, 1979; Stams, 1994; Chin und Conrad, 1995; Conrad, 1999) unter anderem Alkohole, Kohlenmonoxid oder Formiat verstoffwechselt (Garcia, 1990). Die Methanogenese findet in sehr vielen Biotopen statt, wie in anoxischen Sedimenten in Meeren und Seen (Cifuentes et al., 2000; McGregor et al., 1997; Reed et al., 2002; Purdy et al., 2003; Schrenk et al., 2003), Böden borealer Wälder (Jurgens et al., 1997) und von Menschen geschaffenen Biotopen wie Ackerböden und Reisfeldern (Chin et al., 1999; Kim et al., 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2001) statt. Reisfelder sind mit 16-20% der Gesamtmethanproduktion für einen sehr hohen Anteil der Methan-Emissionen verantwortlich (Cicerone und Oremland, 1998). Trotz der relativ geringen Konzentration von Methan (1,7-1,8 ppm_v) ist es mit einem geschätzten Beitrag zur Erderwärmung von 18-25% ein bedeutendes Treibhausgas (Burke und Lashof, 1990; Schütz et al., 1990; Mosier, 1998). Durch die Absorption von erdreflektierender Infrarotstrahlung trägt es zum Treibhauseffekt bei, wobei die Absorption von CH_4 ca. 30mal höher ist als die des Treibhausgases CO_2 (Neue et al., 1990; Neue, 1993; Mosier et al., 1998). Trotz der Vielzahl methanogener Archaeen in den erwähnten kalten Biotopen (Ouverney und Fuhrman, 2003; Rudolph et al., 2001; Pernthaler et al., 2002; Bowman et al., 2003) konnten daraus bisher nur sehr wenige *Euryarchaeota* isoliert werden (Tab. 1). Bei diesen handelt es sich um psychrotolerante Methanogene und Halophile. Diese psychrotoleranten Mikroorganismen können zwar in der Nähe des Gefrierpunktes von Wasser überleben und sich vermehren (Tab. 1), ihre optimale Wachstumstemperatur liegt allerdings über 20°C. Zumindest innerhalb der Methanogenen ist also ein Vergleich auf molekularer, biochemischer oder ökologischer Ebene zwischen psychrotoleranten und thermophilen Vertretern möglich (Schink, 1992; Thomas und Cavicchioli, 1998).

<i>Organismus</i>	$T_{opt} (T_{min}-T_{max})$	<i>Lebensraum</i>	<i>Referenz</i>
<i>Halobacterium lacusprofundi</i>	33°C (2-44°C)	Sediment, Deep Lake, Antarktis	Franzmann et al., 1988
<i>Methanococcoides burtonii</i>	23,4°C (-2,5°C-29,5°C)	Hypolimnion, Ace Lake, Antarktis	Franzmann et al., 1992
<i>Methanogenium frigidum</i>	15°C (-10-18°C)	Hypolimnion, Ace Lake, Antarktis	Franzmann et al., 1997
<i>Methanosarcina lacustris</i>	25°C (1-35°C)	Sediment, Soppensee, Schweiz	Simankova et al., 2001
<i>Metanogenium marinum</i>	25°C (5-25°C)	Sediment, Skan Bay, Alaska	Chong et al., 2002
<i>Methanosarcina baltica</i>	25°C (4-27°C)	Sediment, Gotland Deep, Baltisches Meer	v. Klein et al., 2002

Tab. 1: Isolierte Archaeen aus kaltgemäßigten Biotopen; T_{opt} = Temperaturoptimum; T_{min} = Temperaturminimum; T_{max} = Temperaturmaximum

Momentan werden mit *Methanococcoides burtonii* und *Methanogenium frigidum* erstmals zwei kultivierte, psychrotolerante Vertreter der *Euryarchaeota* komplett sequenziert, um nähere Erkenntnisse über die Anpassungen an kalte Biotope zu erhalten (Cavicchioli et al., 2002). Psychrophile Mikroorganismen, deren schnellste Wachstumsrate unter 15°C liegt und die bei über 20°C kein Wachstum mehr zeigen (Morita, 1975), konnten innerhalb der *Euryarchaeota* noch nicht isoliert werden.

Innerhalb der *Crenarchaeota* stammen fast alle bis jetzt kultivierten Vertreter aus geothermal beheizten Biotopen wie unterseeischen und terrestrischen Hydrothermalquellen (Stetter, 1994; 1995). Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 80 und 105°C. Lange Zeit wurde deswegen angenommen, dass die *Crenarchaeota* ausschließlich in Hochtemperaturbiotopen vorkommen. Mit der Entwicklung neuer molekularer Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen konnte diese Annahme jedoch widerlegt werden. Eine dieser Methoden ist der *in-situ* Nachweis von Mikroorganismen in Umweltproben, basierend auf der Analyse von 16S rRNA-Gensequenzen. Dazu wird aus Umweltproben die Gesamt-DNA isoliert und mit 16S rRNA-spezifischen Primern in eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt.

Dadurch können aus der Gesamt-DNA selektiv die 16S rRNA Gene der jeweiligen Mikroorganismen amplifiziert, anschließend kloniert und sequenziert werden. Die Klonsequenzen werden mit den in den Datenbanken enthaltenen 16S rRNA-Sequenzen verglichen und in einen phylogenetischen Stammbaum eingeordnet (Olsen et al., 1986; Weller und Ward, 1989). Wichtig ist hierbei eine effiziente DNA-Isolierung aus den Originalproben, um eine möglichst genaue Aussage über die Organismenzusammensetzung treffen zu können (Steffan et al., 1988). Eine Vielzahl von PCR-hemmenden Substanzen kann zudem die Amplifikation der 16S rRNA-Sequenzen negativ beeinflussen oder ganz verhindern. Um diese störenden Substanzen (v.a. Huminsäuren) zu beseitigen, wurden unterschiedliche Aufreinigungsverfahren entwickelt (Tsai et al., 1993; Kuske et al., 1998; Steinkamp et al., 2001; Koch, 2001).

Durch die weitverbreitete Anwendung dieser phylogenetischen Untersuchungen in der Umwelt-Mikrobiologie (Olsen et al., 1986; Pace et al., 1986) konnte in den letzten 10 Jahren erfolgreich die Diversität verschiedener mikrobieller Gemeinschaften erforscht werden. Untersuchungen an mikrobiellen Matten (Moyer et al., 1995), an wirbellosen Eukaryonten aufsitzenden Organismen (Haddad et al., 1995), an Kamin- und Flüssigkeitsproben (Takai und Horikoshi, 1999; Huber et al., 2002 und 2003), an Sedimenten (Teske et al., 2002), und an *in-situ* Kultivierungssystemen (Reysenbach et al., 2000; Corre et al., 2001; Nercessian et al., 2003) offenbarten die Existenz einzigartiger und bisher unbekannter mikrobieller Gemeinschaften. Zudem konnte eine weite Verbreitung der Archaeen insbesondere der *Crenarchaeota* in gemäßigten und kalten Biotopen nachgewiesen werden. In Plankton aus Meerwasserproben der Ost- und Westküste Nordamerikas gelang erstmals der Nachweis bisher unbekannter, crenarchaeeller Gruppen in mesophilen Ökosystemen (DeLong, 1992; Fuhrman et al., 1992). Danach wurden im Picoplankton von Meerwasserproben archaeelle 16S rRNA Gensequenzen mit einem Prozentsatz von 5-35% nachgewiesen (DeLong, 1992; DeLong et al., 1994; Stein et al., 1996). In Untersuchungen antarktischer Küstengewässer wurden bis zu 34% der prokaryontischen Gesamt-rRNA den *Archaea* zugeordnet (DeLong, 1994). Aufgrund der erhaltenen archaeellen Sequenzen wurden zwei neue Gruppen postuliert. Die Gruppe I bildet einen phylogenetischen Abzweig innerhalb der *Crenarchaeota*, die Gruppe II innerhalb der *Euryarchaeota* (DeLong, 1992). Charakteristisch ist der niedrige GC-Gehalt des 16S rRNA-Gens von 51 mol% in Gruppe I (*Crenarchaeota*) und 55-57mol% in Gruppe II (*Euryarchaeota*) im Vergleich zu den hyperthermophilen Verwandten, die einen

GC-Gehalt von 60-69mol% aufweisen (DeLong 1992). Der niedrige GC-Gehalt und die niedrige Temperatur der Probenentnahmestellen lässt darauf schließen, dass es sich bei den entsprechenden Mikroorganismen um psychrotrophe oder sogar psychrophile Vertreter handelt (DeLong et al., 1994; Woese et al., 1991).

Im Laufe der letzten Jahre wurden auch in anderen gemäßigten und Niedertemperatur-Biotopen *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota* nachgewiesen. So wurden crenarchaeelle 16S rRNA-Gensequenzen z.B. in marinen Sedimenten (z.B. Vetriani et al., 1998, 1999; Cifuentes et al., 2000; Nercessian et al., 2005), Ozeanen (McInerney et al., 1997; Massana et al., 1997, 1998), Seen und Seesedimenten (Hershberger et al., 1996; Casamayor et al., 2000; Jurgens et al., 2000), Reisfeldern (Großkopf et al., 1998; Ramakrishnan et al., 2001), Böden (Bintrim et al., 1997), Wurzeln höherer Pflanzen (Simon et al., 2000; Nicol et al., 2003) und in Gemeinschaft mit Eukaryonten (Preston et al., 1996; Van der Maarel, 1998, 1999; Whitford et al., 2001.) gefunden.

Neben dem Nachweis auf genomischer bzw. ribosomaler Ebene konnte die Existenz von Archaeen in kalten, marinen Sedimenten und Meerwasserproben durch das Auffinden archaetypischer Tetraetherlipide in diesen Biotopen bestätigt werden (DeLong et al., 1999; Schouten et al., 2000). Die in kalten Biotopen gefundenen Tetraetherlipide weisen zudem deutliche strukturelle Unterschiede zu denen hyperthermophiler Archaeen auf.

Eine weitere Methode zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung von Umweltproben ist die direkte Visualisierung und somit Identifizierung und Quantifizierung durch Ganzzellhybridisierung. Durch die sog. Ganzzellhybridisierung (FISH = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) werden Zellen durch synthetische, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Oligonukleotide, die der ribosomalen 16S rRNA komplementär sind, gezielt markiert und sichtbar gemacht (DeLong et al., 1989; Stahl und Amann, 1991; Amann, 1995a, 1995b; Amann et al., 1997; Amann und Ludwig, 2000). Die Entwicklung von spezifischen Sonden für unterschiedliche Organismengruppen ermöglichte eine Einordnung der Organismen auf domänen- bis hin zur artspezifischen Ebene. Dadurch kann die mikrobielle Zusammensetzung und Verteilung der Mikroorganismen in den verschiedenen Biotopen ohne Kultivierungsansätze aufgeklärt werden. (Manz et al., 1992; Burggraf et al., 1994; Roller et al., 1994; Preston et al., 1996; Fuchs et al., 1998; Daims et al., 1999; Simon et al., 2000). Der Nachweis von Archaeen in kalten Biotopen ist mit dieser Methode bis jetzt jedoch nur in sehr wenigen Fällen gelungen. So konnte erstmals eine symbiontische Beziehung zwischen einem

Crenarchaeon und dem marinen Schwamm *Axinella mexicana* entdeckt werden (Preston et al., 1996). Der Nachweis der *Crenarchaeota* gelang dabei sowohl in frei lebenden, als auch in Labor gehaltenen Schwämmen. Dabei weisen die hohen Zellzahlen und aktiven Teilungsstadien des Crenarchaeons auf eine echte Symbiose bei niedrigen Temperaturen (8-18°C) hin. Obwohl es nicht in Kultur gebracht werden konnte, wurde als Name für das Crenarchaeon „*Cenarchaeum symbiosum*“ vorgeschlagen. Genetische Analysen zeigten allerdings, dass innerhalb des Schwammes zwei nahe verwandte Arten dieses Crenarchaeons vorliegen (Schleper et al., 1998). Während der FISH-Nachweis von Archaeen mit der Archaeen-spezifischen Sonde Arch915 z. B. auch in marinem Plankton (Glöckner et al., 1999; Ouverney und Fuhrman, 2000; Pernthaler et al., 2002; Orphan et al., 2002), marinen Sedimenten (Ravenschlag et al., 2001; Bowman et al., 2003), Süßwasserplankton (Glöckner et al., 1999), Süßwassersedimenten (Battin et al., 2001) und sulfidischen Quellen (Rudolph et al., 2001; Koch, 2001) gelungen ist, konnten *Crenarchaeota* mit *Crenarchaeota*-spezifischen FISH-Sonden nur in sehr wenigen Fällen in kalten Biotopen nachgewiesen werden (Preston, 1996; Rudolph, 1998; Koch, 2001; Pernthaler et al., 2002; Karner et al., 2003). Mittlerweile geht man davon aus, dass Archaeen zu den am häufigsten vorkommenden Organismengruppen auf der Erde zählen (DeLong et al., 1994; Ovreas et al., 1997; Béjà et al., 2000; DeLong, 2003). In den Weltmeeren ist laut Karner et al. (2003) mit einer Gesamtzellzahl von etwa $4,4 \times 10^{28}$ Prokaryonten zu rechnen, wobei die Archaeen bis zu $1,3 \times 10^{28}$ Zellen ausmachen sollen. Der Anteil der pelagischen *Crenarchaeota* liegt dabei bei 1×10^{28} Zellen. Daran kann die große Bedeutung der Archaeen und vor allen der *Crenarchaeota* im mikrobiellen Stoffkreislauf kalter mariner und terrestrischer Ökosysteme erkannt werden (DeLong et al., 1994; Hershberger et al., 1996; Massana et al., 1997; DeLong und Pace, 2001; Karner et al., 2001).

Trotz ihrer enormen Anzahl in kalten Biotopen wurde bis jetzt noch kein Vertreter der psychrophilen *Crenarchaeota* in Reinkultur erhalten (Ferguson et al., 1984; Lee und Fuhrman, 1991; Stein et al., 1996; Vetriani et al., 1998). Ein Grund für die schlechte Kultivierbarkeit ist, dass in der Natur die meisten Bakterien und Archaeen in Symbiosen, Konsortien und Gemeinschaften eingebunden sind (Stickler, 1999; O'Toole et al., 2000). An diesen Gemeinschaften können hunderte bis tausende verschiedene, voneinander abhängige Arten beteiligt sein (Torsvik et al., 2002). Mikroorganismen aus solchen Gesellschaften können durch Standardkultivierungsmethoden nur sehr selten in Reinkultur erhalten werden

(Ward et al., 1990; Barns et al., 1994; Amann et al., 1995), weil sie obligat auf andere Organismen angewiesen sind. Oft sind diese mikrobiellen Populationen aneinander und/oder an festen Oberflächen angeheftet und von einer Matrix umgeben. In diesem Fall werden sie als Biofilme bezeichnet (Costerton et al., 1995, 1999; Watnick und Kolter, 2000; Wimpenny et al., 2000). Diese Biofilme können aus verschiedensten Organismen bestehen (Allison et al., 2000). Sie sind nicht nur in natürlichen Biotopen zu finden, sondern können auch z.B. Wasserleitungen, Katheter und Implantate besiedeln und richten dabei großen Schaden in der Industrie und Medizin an (Ben-Ari, 1999; Stickler, 1996). Die Matrix eines Biofilms besteht oft aus abgesonderten Polymeren wie Polysacchariden und Proteinen, aus Stoffwechselendprodukten und Nährstoffen, aus Bestandteilen lysierter Zellen und sogar aus Partikeln der unmittelbaren Umgebung (Sutherland, 2001). Die Organismen haben durch ihr enges Zusammenleben in Biofilmen entscheidende Vorteile gegenüber frei lebenden Vertretern. Durch den engen Zusammenschluss wird der Genaustausch gefördert, wodurch neu erworbene Fähigkeiten (z.B. Resistenzen) leichter weitergegeben werden können (Angles et al., 1993; Ben-Ari, 1999; Hausner et al., 1999; Watnick und Kolter, 2000). Häufig wird durch die Ausscheidung von extrazellulären Polysacchariden (EPS) eine Schutzschicht gebildet, die das Eindringen von antimikrobiellen Stoffen abschwächt oder den Angriff von Antibiotika, Detergentien und Fressfeinden verhindert (Costerton et al., 1987; Ben-Ari, 1999; Stickler, 1999). Auch der Austausch von Nährstoffen wird durch das enge Zusammenleben erleichtert. Die Abbauprodukte oder ausgeschiedenen Polysaccharide eines Organismus können das bevorzugte Substrat eines anderen Organismus sein. Substrate können durch die feinen Wasserkanäle innerhalb des Biofilms direkt zu den Zellen gelangen, wodurch eine optimale Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet ist (Ben-Ari, 1999).

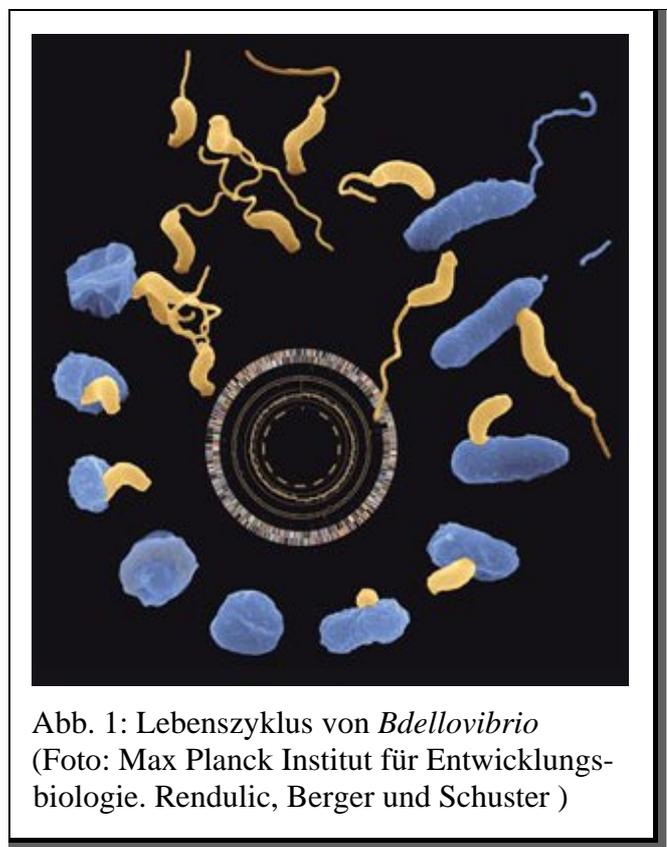
Natürlich vorkommende Gemeinschaften werden auch zwischen sulfatreduzierenden Bakterien und methanogenen *Euryarchaeota* ausgebildet, die in Gas-Hydrat reichen Gebieten anaerobe Methanoxidation betreiben (Boetius et al., 2000; Michaelis et al., 2002). Anaerobe Methanoxidation ist biogeochemisch von besonderer Bedeutung, da dadurch das Treibhausgas Methan der Atmosphäre entzogen wird. In Proben aus Biotopen mit hoher Methanoxidationsaktivität wurden durch phylogenetische Untersuchungen archaeelle Vertreter der *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* gefunden (Cluster ANME-1: Hinrichs et al., 1999; Cluster ANME-2; Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2002). Desweiteren konnte mittels FISH ein Konsortium entdeckt werden, in dem eine

Archaeenkolonie (ca. 100 Zellen; *Methanosarcinales*, ANME-2) von sulfatreduzierenden Bakterien (*Desulfosarcina/Desulfococcus*) eng umhüllt wird (Boetius et al., 2000), was auf eine enge metabolische Interaktion hinweist (Boetius et al., 2000). Weitere Studien zeigten, dass eine größere Diversität der Konsortien (Orphan et al., 2002) und der daran beteiligten Bakterien zu erwarten ist (Valentine, 2002).

Eine weitere, schon makroskopisch auffallende archaeell/bakterielle Gemeinschaft stellen die „Perlenketten“ aus den kalten (10°C), sulfidischen Quellen des Sippenauer Moors (Rudolph et al., 2001) und der sulfidischen Quellen des „Islinger Mühlbachs“ dar (Rudolph et al., 2004). Die „Perlenketten“-Gemeinschaft bildet im Biotop schon mit bloßem Auge erkennbare Verdickungen, die sog. „Perlen“, die aus Mikrokolonien des nicht-methanogenen SM1 Euryarchaeons bestehen. Diese sind eng von überwiegend filamentösen Bakterien umgeben (Rudolph et al., 2001; Moissl et al., 2002; Moissl et al., 2003; Rudolph et al., 2004).

Prokaryontische/eukaryontische Symbiosen oder Syntrophien, in denen alle beteiligten Organismen voneinander profitieren, sind Gegenstand vieler Studien (Schink, 1992). Im Gegensatz dazu ist über Beziehungen, in denen ein Organismus einen oder mehrere Organismen parasitiert, nur sehr wenig bekannt. Der sogenannte Parasitismus zwischen Prokaryonten wurde das erste Mal bei der bakteriellen Gattung *Bdellovibrio* und seinen bakteriellen Wirten beschrieben (Stolp und Starr, 1963). *Bdellovibrio* durchdringt die Zellwand seines Wirtes, vermehrt sich im Periplasma, und führt schließlich vor seinem Austritt zur Lyse der Wirtszelle (Abb. 1).

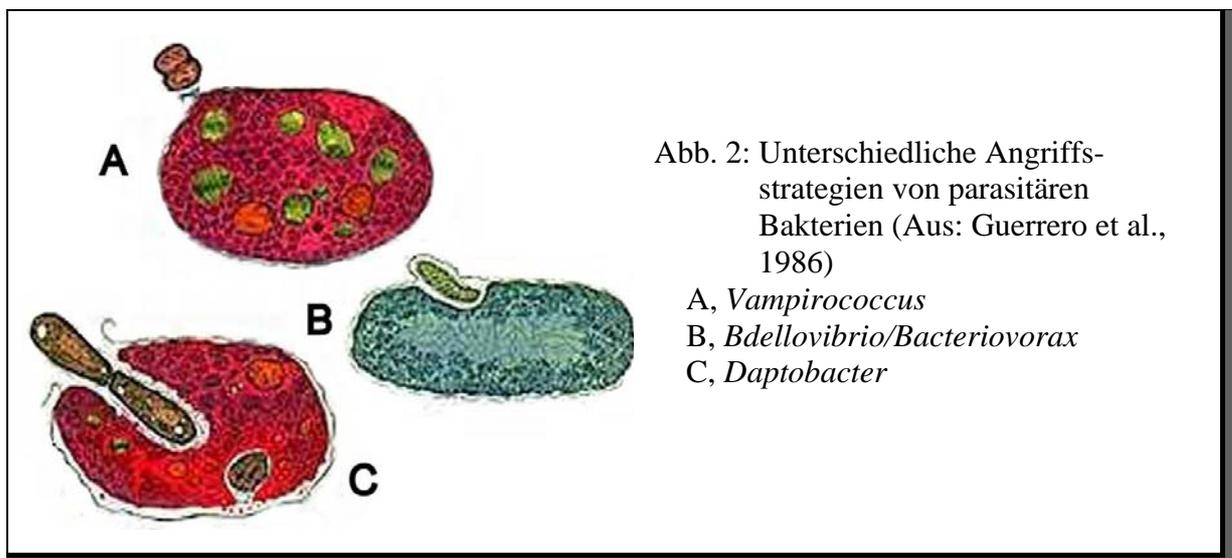
Um an das nährstoffreiche Cytoplasma der Wirtszelle zu gelangen, muss *Bdellovibrio* die äußere Zellwand und das kovalent vernetzte Peptidoglykan durchdringen. Neben mechanischen Bewegungen, die zur Anheftung und Penetration beitragen, spielen eine Reihe von enzymatischen Prozessen eine



wichtige Rolle (Fackell und Robinson, 1973; Huang und Starr, 1973; Thomashow und Rittenberg, 1978a, 1978b; Tudor et al., 1990). Andere parasitäre Mikroorganismen wie *Micavibrio* (Lambina et al., 1984), *Vampirovibrio* (Mamkaeva et al., 1988), *Vampirococcus* (Guerrero et al., 1986), *Daptobacter* (Guerrero et al., 1986) und *Ensifer* (Casida, 1982) haben abweichende Mechanismen, um Wirtszellen zu befallen (Tab. 2). Sie sitzen entweder außen angeheftet an der Zellwand des Wirtes auf und „saugen“ ihn von dort aus oder dringen ins Cytoplasma ein (Abb. 2).

Organismus	Wirtsangriff	Wirtsspezifität	Referenz
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Periplasma	Gram(-) Bakterien	Stolp und Starr, 1963
<i>Bacteriovorax stolpii</i> <i>Bacteriovorax starii</i>	Periplasma	Gram(-) Bakterien	Stolp und Starr, 1963
<i>Ensifer adherens</i>	Bindet an Zellwand	Gram(-) und Gram(+) Bakterien	Casida, 1982
<i>Daptobacter</i>	Cytoplasma	Verschiedene <i>Chromatiaceen</i> -Spezies	Guerrero et al., 1986
<i>Micavibrio admirans</i> <i>Micavibrio aeruginosavorus</i>	Bindet an Zellwand	<i>Pseudomonas maltophila</i> (<i>M. admirans</i>) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>M. aeruginosavorus</i>)	Lambina et al., 1980
<i>Vampirococcus</i>	Bindet an Zellwand	Phototrophe Bakterien (<i>Chromatium</i> sp.)	Esteve et al., 1983
<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i>	Bindet an Zellwand	<i>Chlorella</i> (eukaryontische Grünalge)	Mamkeava et al., 1988

Tab. 2: Räuberische Mikroorganismen, ihre Angriffsorte und Beutespektrum



Im Gegensatz dazu ist bis auf eine Ausnahme nichts über Parasitismus bei Archaeen bekannt. Das wirtsabhängige, hyperthermophile *Nanoarchaeum equitans* wächst nur in Gemeinschaft mit dem hyperthermophilen Archaeum *Ignicoccus* sp. Kin4/I (Huber et al., 2002, Huber et al. 2003). Es wird angenommen, dass die Partnerschaft zwischen diesen beiden Mikroorganismen von parasitärer Natur ist, da bei der Genomsequenzierung von *Nanoarchaeum equitans* nahezu keine Gene für Biosynthesewege entdeckt wurden (Waters et al., 2003). Desweiteren wurde gezeigt, dass es alle Lipide von seinem Wirt bezieht (Jahn et al., 2004).

Mikrobielle Analysen kaltgemäßiger Schwefelquellen im bayerischen Raum mit dem Fokus auf Archaeen stellen das Hauptforschungsgebiet der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Huber am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg dar. Im Mittelpunkt der Forschungen steht hierbei seit 1997 das Sippenauer Moor, ein typischer Vertreter der Niedermoore. Es wurde nicht wie viele andere große Moore in Bayern kultiviert und entwässert, wodurch seine ursprüngliche Fauna und Flora größtenteils erhalten blieb (Warneke, 1992).

Das Sippenauer Moor liegt ca. 20 km südlich von Regensburg im Landkreis Kelheim, Regierungsbezirk Niederbayern, am Feckinger Bach zwischen Sippenau und Mitterfecking oberhalb der Einmündung des Esperbaches (Abb. I.3).

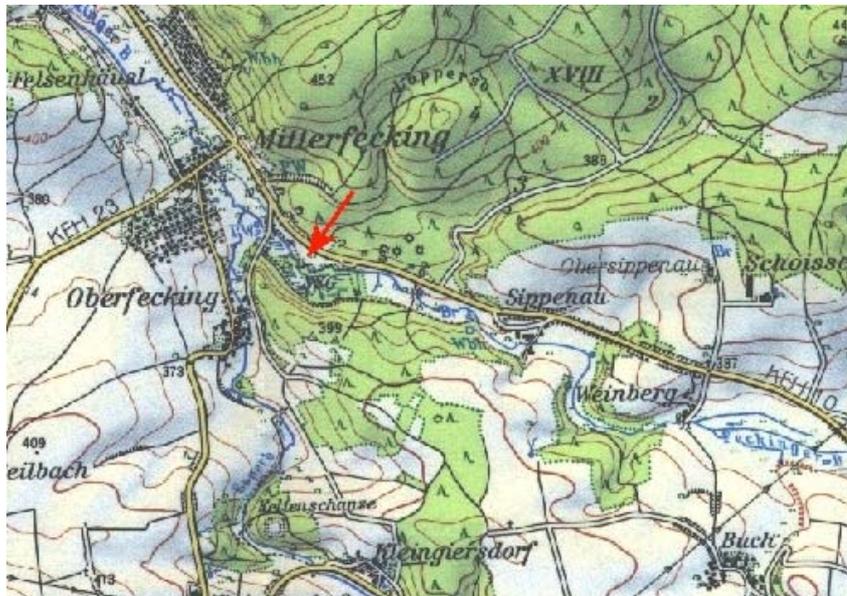


Abb. 3: Ausschnitt der topographischen Karte L 7136 Kelheim des bayerischen Landesvermessungsamtes (Maßstab 1: 50 000). Der Pfeil gibt die Lage des Sippenauer Moors an.

Beim Sippenauer Moor handelt es sich um das einzige von schwefelhaltigem Karstquellwasser gebildete Flachmoor Bayerns. Teile davon befinden sich seit 1911 im Besitz der Regensburger Botanischen Gesellschaft. Ziel dieser Gesellschaft war es, das Gebiet mit seinen Tier- und Pflanzenarten, von denen viele heute bereits auf der „Roten Liste der vom Aussterben bedrohten Tier- und Pflanzenarten“ zu finden sind, zu erhalten (Bresinsky, 1991; Warneke, 1992). Bereits 1939 wurde es zum Naturschutzgebiet erklärt. Seit 1990 befindet sich das ganze heutige Naturschutzgebiet (8,271 ha) im Besitz der Regensburger Botanischen Gesellschaft. Da es seine Feuchtigkeit als typisches Niedermoor aus dem Grundwasser bezieht, ist es von einem hohen Grundwasserspiegel abhängig (Bresinsky, 1991). In diesem Punkt ist es jedoch stark bedroht. Durch das Kalkwerk in Saal a. d. Donau wird das Karstwasser zur Förderung von Kalk abgepumpt. Dies führt zu einer Erniedrigung des Karstwasserstands, verringert somit die Feuchtigkeit der Moorflächen und wirkt sich negativ auf die Fauna aus (Bresinsky, 1999; Bresinsky, 2001). Durch eine Berieselung der Moorflächen mit gefördertem Karstwasser soll dieser Entwicklung entgegengewirkt werden. Dabei sind schon erste positive Erfolge zu verzeichnen (Bresinsky, 2001).

Im Sippenauer Moor entspringen etwa 20 Quellen und Quellaushübe, von denen einige Schwefelwasserstoff enthalten. Die Hauptquelle speist einen ca. 7x4 m großen Quelltopf, in den mind. fünf Quellen zusammenlaufen, von denen vier schwefelhaltig sind. Durch Risse im zerklüfteten Kalkgestein kann Grundwasser unterschiedlicher Herkunft an benachbarten Stellen austreten, wodurch Quellen mit und ohne Schwefelwasserstoff teilweise direkt nebeneinander auftreten (Weber, 1978). Die Herkunft des Schwefelwasserstoffs (H_2S) ist noch nicht geklärt. Im Allgemeinen entstehen Schwefelwässer in Sedimenten, in denen aus Sulfat und Organik durch sulfatreduzierende Mikroorganismen Schwefelwasserstoff freigesetzt wird (Wallhäuser und Puchelt, 1966, 1967). Man nimmt an, dass das Vorkommen des freien H_2S im Sippenauer Moor auf die tertiären Braunkohlelagerstätten und auf den umgebenden Braunkohlethon, der reich an Pyrit (FeS_2) ist, zurückzuführen ist. Es ist jedoch nicht bekannt, ob das H_2S durch biogene oder anorganische Umsetzungsprozesse entsteht (Apel, 1978).

In den Quellen herrscht eine hohe Bioaktivität, so dass im ganzen Biotop weißliche und bräunlich-grüne Filamente und Biomatten zu finden sind. In der Hauptquelle des Sippenauer Moors wurde eine Organismengesellschaft entdeckt, die eine charakteristisch strukturierte

Morphologie aufweist (Rudolph et al., 2001). Es handelt sich dabei um flotierende Filamente mit einer „Perlenschnur“-ähnlichen Struktur (Abb. 4), die an Steinen, Ästen oder Blättern angeheftet sind. Die äußere Hülle der Perlen besteht größtenteils aus filamentösen Bakterien, die hauptsächlich der Gattung *Thiothrix* angehören (Moissl et al., 2002). Das Innere einer Perle wird aus einer Mikrokolonie von archaeellen Kokken gebildet, die regelmäßig dreidimensional angeordnet sind. Die einzelnen „Perlen“ werden durch einen dünnen, von *Thiothrix*-Zellen



Abb. 4: Biofilmstruktur mit Perlenkettenmorphologie in der Hauptquelle des Sippenauer Moors. Die Pfeile zeigen auf einzelne „Perlen“. Maßstab: 3 cm. Aus: Rudolph et al., 2001

gebildeten Faden miteinander verbunden. Durch FISH (Rudolph, 1998) und 16S rRNA-Genanalysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen um eine neue phylogenetische Linie innerhalb der *Euryarchaeota* (als SM1 Euryarchaeon bezeichnet) handelt (Rudolph et al., 2001). Das SM1 Euryarchaeon zeigt jedoch nur geringe Verwandtschaft zu den anderen bekannten Vertretern der *Euryarchaeota* (Rudolph et al., 2001; Rudolph, 2003).

Im Bachlauf des Sippenauer Moors, etwa 90 m unterhalb der Hauptquelle, wurde 1998 eine weitere, charakteristisch strukturierte Lebensgemeinschaft aus Archaeen und Bakterien entdeckt (Zarnkow, 1998; Rudolph, 1998; Koch, 2001). Durch FISH-Untersuchungen mit spezifischen Sonden konnte das Archaeum den *Crenarchaeota* zugeordnet werden (Rudolph, 1998; Koch, 2001). Phylogenetische Untersuchungen an

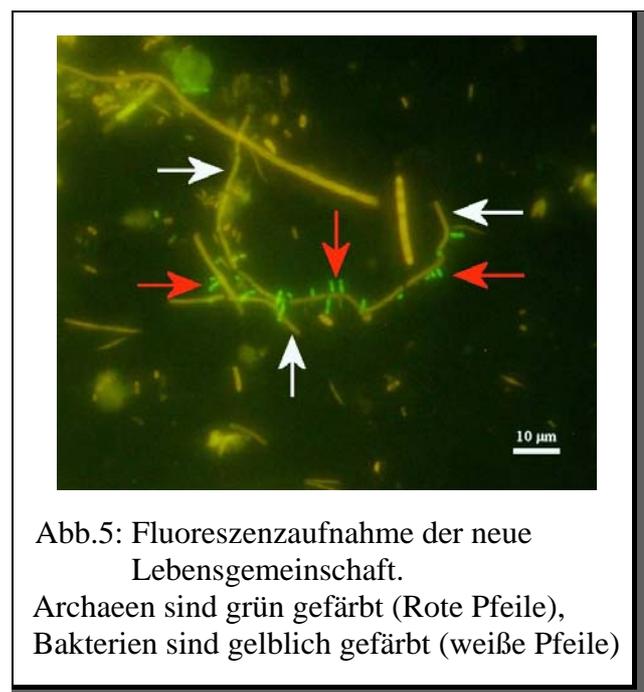


Abb.5: Fluoreszenzaufnahme der neue Lebensgemeinschaft. Archaeen sind grün gefärbt (Rote Pfeile), Bakterien sind gelblich gefärbt (weiße Pfeile)

Umweltproben aus dem Sippenauer Moor ergaben verschiedene crenarchaeelle 16S rRNA-Sequenzen. Die Zuordnung einer dieser Sequenzen zu dem an der Lebensgemeinschaft beteiligten Crenarchaeon war jedoch nicht möglich (Koch, 2001). Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass diese *Crenarchaeota* in einem charakteristischen 90°-Winkel an den Bakterien angeheftet waren (Abb.5, Koch, 2001). Aufgrund der Temperaturverhältnisse im kalten (10°C), sulfidischen Bachlauf des Sippenauer Moores wurde vermutet, dass es sich bei diesem Crenarchaeon um einen psychrotoleranten oder psychrophilen Mikroorganismus handelt. Da es nur in Assoziation mit dem unbekanntem bakteriellen Stäbchen detektiert wurde, wurde eine direkte Abhängigkeit zwischen diesen beiden Mikroorganismen für möglich gehalten (Koch, 2001).

Ziel dieser Dissertation war die detaillierte Analyse dieser einzigartigen, charakteristisch strukturierten crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft. Im Mittelpunkt standen dabei die Identifizierung der an dieser Lebensgemeinschaft beteiligten Mikroorganismen sowie die Aufklärung der Interaktionen der Mikroorganismen untereinander. Hierzu wurde eine Kombination aus FISH-Untersuchungen und neu entwickelten Kultivierungssystemen im Labor und direkt im natürlichen Biotop angewandt. Um die ökologische Relevanz dieser neuartigen Lebensgemeinschaft im Biotop abzuschätzen, sollte zudem die Verbreitung im gesamten Bereich des Sippenauer Moors erforscht werden. Außerdem sollten aus dem Sippenauer Moor und anderen sulfidischen Quellen weitere neuartige Archaeen identifiziert und kultiviert werden, um tiefere Einblicke in die mikrobielle Diversität kaltgemäßiger Biotope zu erhalten.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Agar bacteriological (Agar No. 1)	Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire (England)
Agarose 1000, High Resolution	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose, Low Melting Point	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Alginat	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Ampicillin, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Amylopektin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Aquaphenol™ und pH-Maker™	Appligene-Oncor, Illkirch (Frankreich)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Casamino-säuren	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Cellulose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chitin	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Chitosan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Citifluor AF-1	UKC, Chem. Lab., Canterbury (England)
DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
EDTA, Na ₂ -Salz (Ethylen-diamintetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
EtBr (Ethidiumbromid)	Serva, Heidelberg
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glykogen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Gum Arabicum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
HClO ₄ , Natriumhypochlorid-Lösung (Chlorbleichlauge)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)	ICN, Biochemicals GmbH, Eschwege
Lambda-DNA	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Laminarin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Locust Bean Gum	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
N-Acetylglucosamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumthiosulfat, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pektin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polylysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sephadex G 200-120	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Serdolit MB-1 (20-50 mesh)	Serva, Heidelberg
Tris	USB, Cleveland (USA)
Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Trypton-Pepton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid)	Serva, Heidelberg
Xylan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Tab. 3: Bezugsquelle der Chemikalien und Biochemikalien

Die übrigen verwendeten, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma VWR, Darmstadt bezogen. Der Reinheitsgrad der Substanzen war p. a., sofern nicht anders angegeben.

1.2 Reaktionskits

<i>Kit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Original TA Cloning [®] Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Qiagen [®] PCR Cloning Kit (10)	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep [®] Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
Microquant Hydrogensulfid-Test	Merck KG, Darmstadt

Tab. 4: Bezugsquellen der Reaktionskits

1.3 Enzyme

<i>Enzyme inkl. Reaktionspuffer</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<i>AluI, HhaI, HinfI, RsaI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
AmpliTaqDNA-Polymerase (5U/μl) und AmpliTaqDNA-Polymerase, LD (5U/μl)	Perkin-Elmer Biosystems-Roche, Branchburg (USA)
GL-Taq DNA-Polymerase (5U/μl)	GL Bio Tech, Bremen
Proteinase K	VWR, Darmstadt

Tab. 5: Bezugsquellen der Enzyme

Alle weiteren verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs, Frankfurt bezogen.

1.4 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Markierung</i>	<i>produziert in</i>	<i>Bezugsquelle</i>
anti-Huhn IgY (H+L)	CY3	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti-Huhn IgY (H+L)	FITC	Kaninchen	Dianova, Hamburg

Tab. 6: Bezugsquellen der markierten Antikörper

1.5 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotidsonden wurden von den Firmen Metabion GmbH, Martinsried, bzw. MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

1.6 Gase

Alle Gase wurden von der Firma Linde Technische Gase GmbH, Höllriegelskreuth, bezogen.

1.7 Molekularmassenstandards

<i>Standard</i>	<i>Bezugsquelle</i>
25 bp DNA-Leiter	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
Lambda DNA Standard/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Tab. 7: Bezugsquellen der Molekularmassenstandards

1.8 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Aerosolfilter-Pipettenspitzen	Gilson, Inc., Middleton (USA)
Cellulosefilter, Nr. 595	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser für Mikroskopie, 20 x 20 mm 20 x 54 mm	P. Marienfeld KG, Lauda-Königshofen Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman 3MM	Biometra GmbH, Göttingen
Glaskapillaren (Konservierung)	Hilgenberg, Malsfeld
Kanülen	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Kapillaren (Laservereinzelung)	Dynamics Inc., New York (USA)
Microcon 100-Filter	Amicon, Witten
Montage PCR	Millipore Corporation, Bedford (USA)
Nanosep TM MF Microconcentrators	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor (USA)
Objektträger, Epoxidharz-beschichtet mit 6 Feldern, je 8 mm Durchmesser	P. Marienfeld KG, Lauda-Königshofen
Objektträger, Glas	P. Marienfeld KG, Lauda-Königshofen
Parafilm „M“ [®] Laboratory Film	American National Can TM , Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
pH-Indikatorstäbchen, Acilit, Neutralit, Alkalit	VWR, Darmstadt
Phase Lock Gel Light	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld
Reaktionsgefäße (PCR-Cups) 0,2 ml	BIOzym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schraubdeckelreaktionsgefäß (Falcon Tubes TM), 15 und 50 ml	BD GmbH, Heidelberg
Spritzen, steril, 1 ml	Ersta, Maersk (Dänemark)
Sterilfilter (0,1 µm und 0,22 µm Porenweite)	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor (USA)
Zahnstoßer	Fackelmann, Hersbruck

Tab. 8: Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien

1.9 Sonstiges

<i>Sonstiges</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Aluminiumringe (Aluminium seal stoppers)	Bellco glass, New Jersey (USA)
Druckflaschen (Borsilikatglas)	Müller und Krempel AG, Büllach (Schweiz)
Epoxidharz L285 und Härter 286	Lange & Ritter, Gerlingen
Epoxidharz L280 und Härter 260	Lange & Ritter, Gerlingen
Glasgeräte (wenn nicht anders angegeben)	Schott Glas, Mainz
Glasgewebe	Lange & Ritter, Gerlingen
Gummistopfen	Deutsch & Neumann GmbH, Berlin
Kunststoffdeckel (durchbohrt)	Schott Glas, Mainz
Live/Dead [®] BacLight [™]	Molecular Probes Inc. Europe BV, Leiden (Niederlande)
Polyethylen-Netze und -Fäden	Helac, Kassel
Polyamidfaden (0,45 mm und 0,7 mm)	Conacord, Lippstadt
Rollrandgefäße, 5 und 25 ml	Macherey & Nagel, Düren
Serumflaschen (Natronkalksilikatglas)	Pharmpack Stute GmbH, Königswinter
Stahlhaken	Mech. Werkstatt, Uni Regensburg

Tab. 9: Sonstige Bezugsquellen

2. Organismen und Kultivierungsbedingungen

<i>Organismus</i>	<i>Medium</i>	<i>Gasphase</i>	<i>Inkubationstemperatur</i>	<i>Literatur (Medium)</i>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> VC 16 DSM 4304	MGG-Medium +0,2% YE +0,1% L(+)- Laktat	H ₂ /CO ₂	85°C	Huber et al., 1982
<i>Batrachospermum sirodotia</i> , SAG 99.79	MiEB ₁₂ -Medium	aerob	10°C/20°C	SAG Desmidiacean Medium
<i>Flavobacterium aquatile</i> DSM 1132	<i>Flavobacterium aquatile</i> -Medium	aerob	30°C	DSMZ 102
<i>Ignicoccus islandicus</i> Kol8 DSM 13165	½ SME-Medium +1% S ⁰ +0,02%YE	H ₂ /CO ₂	85°C	Blöchl et al., 1997
<i>Methanococcus igneus</i> Kol5	MGG-Medium	H ₂ /CO ₂	85°C	Huber et al., 1982
<i>Microscilla aggregans</i> DSM 4133	<i>Cytophaga</i> - (marin) Medium	aerob	25°C	DSM 172
<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184	Brock-Medium +0,02% YE +0,2% S ⁰	N ₂	100°C	Huber et al., 1988
<i>Pyrococcus furiosus</i> VC1	½ SME +0,25% Pepton +0,1% YE	N ₂ /CO ₂	100°C	Blöchl et al., 1997
<i>Pyrodictium occultum</i> DSM 2709	½ SME +0,5% YE +3% S ⁰	H ₂ /CO ₂	105°C	DSMZ 283
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM 639	MAL-Medium + 0,1% YE	aerob	75°C	Brock et al., 1972
<i>Thermococcus celer</i> DSM 2476	½ SME +0,5% YE +3% S ⁰	N ₂ /CO ₂	85°C	Blöchl et al., 1997
<i>Thermoproteus tenax</i> DSM 2078	Brock-Medium + 0,02% YE + 0,2% S ⁰	N ₂ /CO ₂	85°C	Zillig und Stetter, 1982
<i>Thiothrix nivea</i> DSM 5205	<i>Thiothrix</i> - Medium	aerob	25°C	DSMZ 573

Tab.10: Verwendete Organismen und ihre Kultivierungsbedingungen

3. Herstellung der Kulturmedien

3.1 *Thiothrix*-Medium (TH), aerob und anaerob:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NH ₄ Cl	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,01 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
CaSO ₄ , gesättigte Lösung	20 ml
Spurenelemente-Lösung	5 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Mit 5 N NaOH wurde der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt

Neben destilliertem Wasser wurde auch gefiltertes (Faltenfilter, Grade 597 ½, Schleicher und Schuell, Dassel) Sippenauer Moorwasser aus dem Quelltopf verwendet. Das modifizierte Medium wurde TT-Sip-Medium genannt.

Standardzusätze: 10 ml Vitamine nach Pfennig (1x)/l Medium, 0,01% Natriumthiosulfat. Die Zugabe erfolgte direkt vor dem Animpfen.

Zusätze für *Thiothrix nivea*: 0,03% Na₂S, Na-Acetat 0,01%

Zusätze für Anreicherungskulturen:

<i>Zusatz/Substrat</i>	<i>Konzentration der Stammlösung, in % (w/v)</i>	<i>Endkonzentration in den Medien, in % (w/v)</i>
Casaminosäure	10	0,1
Cellubiose	10	0,1
C-Org-Mix :		
Hefeextrakt		
Pepton	je 5	je 0,05
Brain-Heart-Infusion		
Fleischextrakt		
Glukose	1	0,01
Glykogen	10	0,1
Hefeextrakt	1	0,01
Laminarin	2,5	0,05
Na-Acetat	1	0,01
N-Acetyl-Glucosamin	2,5	0,025
Natriumthiosulfat	1	0,01
Na-Pyruvat	1	0,01
Zuckermix:		
Raffinose		
Glucose		
Xylose	je 5	je 0,05
Maltose		
N-Acetylglucosamin		

Tab. 11: Verwendete Zusätze (sterilfiltrierte Lösungen)/ Substrate; Stamm- und Endkonzentrationen

<i>Zusatz/Substrat</i>	<i>Endkonzentration in % (w/v)</i>
Alginat	0,1
Amylopektin	0,075
Casein	0,1
Cellulose	0,1
Chitin	0,075
Chitosan	0,075
Gelatine	0,1
Gum Arabicum	0,1
Locust Bean Gum	0,1
Pektin	0,075
Stärke	0,075
Xylan	0,1

Tab. 12: Direkt eingewogene Zusätze / Substrate

Spurenelementelösung für *Thiothrix*-Medium:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
EDTA	0,2 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	2 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	5 µg
H ₃ BO ₃	10 mg
Co(NO ₃) ₂	1 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei 4°C (max. 1 Jahr)

1 x Vitamine nach Pfennig, modifiziert:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Biotin	0,2 mg
Thiamin	1 mg
p-Aminobenzoesäure	1 mg
Pyridoxamin-HCl	5 mg
Folsäure	0,2 mg
Riboflavin	0,5 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,01 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Nach dem Sterilfiltrieren (Cellulose-Acetat-Filter, 0,22 µm Porengröße, Millipore, Bedford, USA) wurde die Lösung abgedunkelt bei 4°C max. 1 Jahr gelagert.

3.2 TT-Sip-Agarplatten

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Agar, gewaschen	0,5%
TT-Sip-Medium	ad 1000 ml

Zusätze siehe Tab. 11 und 12

Waschen des Agars:

Ca. 80 g Agar wurde mit 1,5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ in ein 2 l Becherglas gegeben. Auf einem Magnet-rührer wurde die Suspension ca. 15 min gerührt und anschließend zum Sedimentieren ruhig gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, und der Agar noch weitere drei Male wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wurde der Agar in große Kristallisationsschalen umgefüllt und bei 37°C und gelegentlichem Wenden getrocknet. Nach 1-2 Wochen war der Agar getrocknet und wurde mit dem Mörser fein zerrieben.

3.3 Sippenauer Moor Medium (TTM-Medium; Amann, 2003), modifiziert für SipMet1

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NH_4Cl	0,50 g
NaHCO_3	0,20 g
Mineralienelixier nach Wolfe 10x	1 ml
Vitaminlösung nach Wolfe 10x	1 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Das Medium wurde mit N_2 (ca. 30-60 min) in einer mit Gummistopfen und durchbohrten Kunststoffdeckel verschlossenen 1 l-Schottflasche durchgast und mit 0,5 g $\text{Na}_2\text{S/l}$ reduziert. Der pH-Wert wurde mit 5 N HCl auf pH 7,0 eingestellt. Das Medium wurde in der Anaerobenkammer in Rollrand-Röhrchen (10 ml) abgefüllt und mit $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$ (65/ 15/ 20) mit 1 bar Überdruck begast.

Modifiziertes Mineralieneelixier (1x) nach Wolfe (Balch et al., 1979)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Titriplex I (Nitrilotriacetic acid)	1,50 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	3,00 g
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,50 g
NaCl	1,00 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
H_3BO_3	0,01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Na_2SeO_4	0,01 g
$(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,28 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde zunächst mit KOH-Plätzchen bis auf ca. pH 5, dann mit 4 N KOH-Lösung auf pH 6,5 eingestellt. Die frisch hergestellte Lösung wurde mit einem Cellulose-Mischester-Filter sterilfiltriert und in einer abgedunkelten Flasche bei 4°C aufbewahrt.

Vitaminlösung (1x) nach Wolfe (Balch et al., 1979)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
D(+)-Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxamindihydrochlorid (B6)	10,0 mg
Thiamindichlorid (B1)	5,0 mg
Riboflavin (B2)	5,0 mg
Nikotinsäure	5,0 mg
Calcium-D(+)-pantothenat	5,0 mg
Cyanocobalamin (B12)	0,1 mg
para-Aminobenzoensäure	5,0 mg
DL-Liponsäure	5,0 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Die frisch hergestellte Lösung wurde mit einem Cellulose-Mischester-Filter sterilfiltriert und in einer abgedunkelten Flasche bei 4°C aufbewahrt.

3.4 Moor- und Aubachmedium (MM und MAub)

Sippenauer Moorwasser- bzw. Aubachwasser wurde durch einen Faltenfilter gereinigt und für mind. 30 min mit N₂ durchgast. Darauf wurde es in der Anaerobenkammer in Serumflaschen, Rollrand-Röhrchen und 500ml Druckflaschen abgefüllt und mit N₂ mit 0,5-2,0 bar Überdruck begast. Als Standardzusätze wurden direkt vor dem Animpfen je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig zugegeben.

3.5 LB-Medium und LB-Platten

LB-Medium:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

LB-Platten:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H ₂ O _{bide} st.	ad 1000 ml

3.6 Medium für *Flavobacterium aquatile* (DSMZ 102)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Na-Caseinat	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
Proteose Pepton	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
H ₂ O _{bide} st.	ad 1000 ml
Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,4.	
Für Platten zusätzlich:	
Agar, gewaschen	15,0 g

3.7 Medium für *Microscilla aggregans* (DSMZ 172)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Hefeextrakt (Difco)	1,0 g
Trypton (Difco)	1,0 g
NaCl	24,7 g
KCl	0,7 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,3 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4,6 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,2 g
NaHCO ₃	0,2 g
H ₂ O _{bide} st.	ad 1000 ml
Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,2. Natriumhydrogencarbonat und Calciumchlorid wurden je separat in 50 ml H ₂ O _{bide} st. autoklaviert.	
Für Platten zusätzlich:	
Agar, gewaschen	15,0 g

3.8 Medium für *Batrachospermum sirodotia* (MiEB₁₂-Medium "Micrasterias + Erddekot + Vitamin B₁₂"; modifiziert)

<i>Substanz</i>	<i>Stammlösung (g/100 ml)</i>	<i>Nährlösung (ml)</i>
KNO ₃	1,0	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	10
CaSO ₄ , gesättigte Lösung		10
Erdextrakt 1		15
Erdextrakt 2		15
Mikro-Nährlösung		5
H ₂ O _{bide} st.		930

Zugabe von steriler Vitamin B12-Lösung (5 x 10⁻⁶ g/l) nach dem Autoklavieren.

Herstellung der Erdextrakte

Es wurden zwei Erdextrakte aus unterschiedlicher Erde (Botanischer Garten, Universität Regensburg; Gartenerde aus Erfurt) hergestellt. Hierzu wurde eine 1 l Schottflasche zu einem Drittel mit der jeweiligen Erde befüllt. Diese wurde mit entionisiertem Wasser ca. 5 cm überschichtet. Die Ansätze wurden im Abstand von 24 h zweimal für 60 min bei 100°C im Autoklaven bedampft. Der dekantierte Überstand wurde durch Zentrifugation bei 10.000 Upm (Sorvall RC-5C+, SS34-Rotor) von Schwebstoffen gereinigt. Der gereinigte Überstand wurde für 20 min bei 121°C und 2 bar Überdruck autoklaviert und im Kühlraum bei 4°C gelagert

Herstellung der Mikro-Nährlösung

<i>Substanz</i>	<i>Stammlösung (g/100 ml)</i>	<i>Zugegebene Lösung</i>
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	1 ml
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,1	2 ml
H ₃ BO ₃	0,2	5 ml
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,02	5 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,02	5 ml
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0005	1 ml
H ₂ O _{bidest.}		981 ml
FeSO ₄ x 7H ₂ O		0,7 g
EDTA (Titriplex III, Merck)		0,8 g

Um ein Ausfallen von Salzen zu verhindern, wurden die Komponenten separat in zwei Lösungen autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Lösung 1: 881 ml H₂O_{bidest.} + Stammlösungen der Salze ohne FeSO₄ + 0,4 g EDTA

Lösung 2: 100 ml H₂O_{bidest.} + 0,7 g FeSO₄ + 0,4 g EDTA

3.9 MS-Medium

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NaCl	0,450 g
NaHCO ₃	6,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,225 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,225 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,225 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,06 g
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂	0,002 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g
Mineralienelixier nach Wolfe 10x / pH 1,0 / neu - Titriplex	1,0 ml
Wolfes Vitamine 10x	1,0 ml
Resazurin, 0,1%ig	1,0 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,5 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

3.9.1 Mineralienelixier nach Wolfe 10x / pH 1,0 / neu - Titriplex

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0 g	121,70 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,0 g	29,60 mM
NaCl	10,0 g	171,10 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g	3,60 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,8 g	7,57 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 g	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,8 g	6,30 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,1 g	0,40 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,1 g	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,8 g	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,1 g	0,53 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	

3.9.2 Vitaminlösung nach Wolfe (10x)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
Biotin	20 mg	81,9 µM
Folsäure	20 mg	45,3 µM
Pyridoxamindihydrochlorid	100 mg	386,0 µM
Thiamindihydrochlorid	50 mg	148,0 µM
Riboflavin	50 mg	133,0 µM
Nikotinsäure	50 mg	406,0 µM
DL-Calciumpantothenat	50 mg	105,0 µM
Cyanocobalmin	5 mg	3,7 µM
p - Aminobenzoessäure	50 mg	365,0 µM
Liponsäure	50 mg	242,0 µM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	

3.10 MM-Medium

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
SME	250,0 ml
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Mineralienelixier nach Wolfe 10x / pH6,5 / neu + Titriplex	1,5 ml
Resazurin, 0,1%ig	1,0 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,5 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

3.10.1 Synthetisches Meerwasser SME

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
NaCl	27,7 g	473,99 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,0 g	28,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,5 g	27,1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,75 g	5,1 mM
KCl	0,65 g	8,7 mM
NaBr	0,1 g	0,97 mM
H ₃ BO ₃	0,03 g	0,49 mM
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,015 g	0,056 mM
KJ-Lsg., 0,05%ig	0,1 ml	0,30 µM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	

3.10.2 Mineralienelixier nach Wolfe 10x / pH 6,5 / neu + Titriplex

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
Titriplex 1 (Nitrilotriacetic acid)	15,0 g	78,50 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0 g	121,70 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,0 g	29,60 mM
NaCl	10,0 g	171,10 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g	3,60 mM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	1,8 g	6,40 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 g	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,8 g	6,30 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,1 g	0,40 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,1 g	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,1 g	0,53 mM
H ₂ O _{bidest.}	1000 ml	

3.11 Medium für *Methanogenium bourgense* (DSMZ 332)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NH ₄ Cl	1,0 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,4 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g
Cystein-HCl x H ₂ O	0,5 g
Na-Formiat	5,0 g
Na-Acetat	1,0 g
Trypticase Pepton (BBL)	1,0 g
Hefeextrakt (Difco)	1,0 g
Na ₂ CO ₃	1,5 g
Resazurin	1,0 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,2 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Die Substrate (bis auf Na_2CO_3 und Na_2S) wurden eingewogen und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf pH 6,7-7 eingestellt. Anschließend wurde das Medium mind. 10 min gekocht und gleichzeitig mit N_2 durchgast. Es wurde in der Anaerobenkammer in Serumflaschen (24 h äquiliibriert) abgefüllt und mit 2 bar H_2/CO_2 (80:20, w/w) begast. Na_2CO_3 und Na_2S wurden sterilfiltriert und kurz vor dem Animpfen zugegeben.

4. Sterilisation

4.1 Sterilisation der Medien

Aerobe und anaerobe, schwefelfreie Medien wurden im Autoklaven 20 min bei 121°C und 2 bar Überdruck mittels gespanntem Heißdampf sterilisiert.

Schwefelhaltige Medien wurden im Autoklaven 1 h bei 110°C autoklaviert.

4.2 Sterilisation der Substrate und der Zusätze

In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöste Substrate und Zusätze wurden in ein steriles, mit Gummistopfen und Aluring verschlossenes Rollrand-Röhrchen (Gasphase N_2) sterilfiltriert. Dazu wurde ein Sterilfilter mit $0,22\ \mu\text{m}$ Porenweite (Millipore, Bedford, USA) verwendet.

4.3 Sterilisation der Glasgeräte und der Gebrauchsgegenstände

Glasgeräte, Zahnstocher, Pinzetten und Spritzen wurden 40 min bei 121°C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Anschließend wurden sie für einige Stunden im Trockenschrank bei 70°C getrocknet. Alternativ konnten Glasgeräte bei 140°C im Heißluftsterilisationsschrank über Nacht sterilisiert werden.

5. Mikroskopie

5.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Ansätze und Originalproben wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit dem Objektiv F 100/1,25 Öl durchgeführt. Die Mikroskopie von Biofilmen und Streamern erfolgte nach Zerkleinerung der Proben in einem Dentalschüttler (Silamat plus, Vivadent Dental GmbH, Ellwangen).

5.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Hilfe einer Thomazählkammer (0,02 mm Tiefe; Brand GmbH, Wertheim) bestimmt.

5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop Olympus BX60 (Olympus Optical Co., Japan) mit UV-Ausstattung (UV-Netzgerät: U-RFL-T). Die spezifischen Filtersätze für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff sind in folgender Tabelle dargestellt:

<i>Farbstoff</i>	<i>Anregungsfilter</i>	<i>Teilerspiegel</i>	<i>Sperrfilter</i>
Coenzym F ₄₂₀	BP 470-490	DM 500	BA 515
CY3	HQ 546/12 BP 530-550	Q 560 LP DM 570	HQ 585/40 BA 590
DAPI	BP 360-370	DM 400	BA 420
Live/Dead [®] Bac-Light [™]	BP 470-490	DM 500	BA 515
Rhodamin Green [™] , FITC	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 527/30
Texas Red [®]	D 585/10	Q 595 LP	HQ 645/75

Tab. 13: Fluoreszenz-Filtersätze des Olympus BX60 Phasenmikroskops

Die Zellen wurden bei 1250-facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv (Plan 100/1,25) mikroskopiert. Bei Hybridisierung mit zwei bzw. drei unterschiedlich markierten Oligonukleotiden wurde die Epifluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe sowohl mit der DAPI-Färbung als auch mit dem Phasenkontrastbild verglichen. Ein eindeutiges Ergebnis wurde erhalten, wenn nur eine der zwei bzw. zwei der drei Sonden-Markierungen eindeutig positiv waren, und sowohl mit DAPI als auch im Phasenkontrast an dieser Stelle eine Zelle zu erkennen war.

5.4 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung wurde nach der in Rodina (1972) beschriebenen Methode durchgeführt.

5.5 Elektronenmikroskopie

5.5.1 Probenvorbereitung

Für Suspensionspräparate wurden die Zellen in Serumflaschen mit 2% Glutaraldehyd (v/v) 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen 25 min bei 14.500 Upm abzentrifugiert (Sorvall RC-5C+, SS34-Rotor), in 1 ml Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt. Durch anschließende Zentrifugation (10 min bei 14.000 Upm) in einer Eppendorfcup-Zentrifuge (5417C, Eppendorf, Hamburg) wurden die Zellen erneut aufkonzentriert und in ca. 50-100 µl Überstand resuspendiert.

Vor der Gefrierätzung wurde genauso vorgegangen, allerdings unterblieb der Fixierungsschritt und die Zellen wurden in ca. 10-15 µl Überstand resuspendiert.

5.5.2 Herstellung von Suspensionspräparaten

Zunächst wurden die kohlebeschichteten Kupfergrids (TAAB G100/200, Plano, Wetzlar) beglimmt (Harrick Plasma Cleaner/Sterilizer, PDC-3xG, Harrick Scientific Corporation, New York, USA), um die hydrophobe Oberfläche des Grids zu hydrophilisieren. Dadurch wurde eine Benetzung mit wässriger Lösung ermöglicht. Auf die beglimmten Kupfergrids wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension aufgebracht. Nach etwa 1-2 min wurde die Flüssigkeit von der Rückseite des Grids mittels eines Filterpapiers abgezogen. Das Grid wurde anschließend 1-2 mal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Die hergestellten Suspensionspräparate wurden entweder negativ kontrastiert oder mit Schwermetall bedampft (s. II.4.5.3).

5.5.3 Kontrastierung von Suspensionspräparaten

Negativkontrastierung mit Uranylacetat:

Das Negativstaining erfolgte mit 3% Uranylacetat (w/v) nach Näther et al. (2003).

Schwermetallbedampfung:

Nach Lufttrocknung wurde das Präparat in einer Hochvakuumbedampfungsanlage (CFE 50, Cressington Ltd., Watford, UK) mit Platin/Kohle bedampft (1nm, Winkel: 15°).

5.5.4 Gefrierätzung

Für die Gefrierätzung wurde 1,4 µl der aufkonzentrierten Zellen auf einen Goldträger (Bal-Tec, Witten/Ruhr) aufgetragen und ohne Verzögerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Auf eine chemische Fixierung der Zellen wurde verzichtet. Die gefrorene Probe wurde direkt in eine auf -180°C vorgekühlte Hoch-Vakuumbedampfungsanlage (CFE

50, Cressington Ltd., Watford, UK) eingeschleust und auf -97°C erwärmt. Anschließend wurde die Probe mit einem -180°C kalten Messer gebrochen. Danach wurde das gefrorene Oberflächenwasser im Hochvakuum für 7 min sublimiert. Es folgte eine Bedampfung mit 1 nm Platin/Kohle (45°). Zur Stabilisierung des Präparats wurde eine weitere, senkrechte (90°) Bedampfung mit Kohle (10 nm) durchgeführt. Das Metall-Kohle-Replika wurde auf H_2SO_4 (70%, w/v) abflottiert und über Nacht inkubiert, um organische Substanzen abzulösen. Am nächsten Tag erfolgte eine zweimalige Umsetzung des Replikas auf quarzdestilliertes Wasser. Das Replika wurde schließlich auf ein beglimmtes, hexagonales Kupfergrid (G600 HH, Plano, Wetzlar) aufgebracht.

5.5.5 Digitale Bildverarbeitung am EM

Die Bildbearbeitung erfolgte durch PD Dr. Reinhard Rachel, Dipl. Biol. Daniela Näther und Anna Scherzinger. Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden am Transmissions-elektronenmikroskop Philips CM 12 (FEI, Eindhoven, Niederlande) bei einer Arbeitsspannung von 120 kV durchgeführt. Die Aufnahmen wurden digital mit einer CCD Kamera (Tietz GmbH, Gauting) angefertigt, die mit einem PC mit der TVIPS-Software (Tietz GmbH, Gauting) verbunden war.

6. Messungen im Biotop und Probenentnahme

6.1 Messung physikalischer und chemischer Parameter

6.1.1 Temperatur

Luft- und Wassertemperatur-Messungen erfolgten im Bereich des Quelltopfes und am Probenentnahmeort Str.6. Sie wurde Anfangs mit Hilfe eines zu einem Stabthermometer umgebauten Digitalthermometers (GTH 1150; Greisinger electronic GmbH, Regenstauf) durchgeführt, später mit dem digitalen Strömungsmessgerät MiniAir 2 mit Messkopf MiniWater 20 Micro (Schildknecht Messtechnik, Gossau, Schweiz), das über eine Temperaturmessfunktion verfügt.

6.1.2 pH-Wert

Der pH-Wert des Wassers wurde mit pH-Indikator-Papier (Neutralit; Merck, Darmstadt) bestimmt.

6.1.3 Sulfidgehalt

Die Bestimmung des Sulfidgehaltes erfolgte mittels eines Hydrogensulfid-Testkits (Merck, Darmstadt). Dabei wurde mit Methylenblau in einem Farbintensitätsvergleich die Quantität des Sulfids abgeschätzt.

6.1.4 Sauerstoff

Die Messung des gelösten Sauerstoffs im Quellwasser wurde mit dem Sauerstoffsensor Cellox 325 am Multifunktionsmessgerät MultiLine P4 (WTW, Weilheim) durchgeführt. Die Sonde wurde vor jeder Messung im Kalibrierungsgefäß geeicht. Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgte in mg/l oder % Luftsättigung an einer repräsentativen Stelle bis zum Erreichen eines konstanten Wertes.

6.1.5 Leitfähigkeit

Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgt direkt im Quellwasser mit der Sonde TetraCon[®] 325 des Multifunktionsgerätes MultiLine P4 (WTW, Weilheim).

6.2 Probenentnahme

Die Untersuchungen wurden an möglichst definierten Strukturen, wie z.B. weißlich/grünen Filamenten oder mit *Thiothrix* sp. besetzten Algen, durchgeführt. Die mit Pinzetten entnommenen Proben wurden vor Ort in neue DNase/RNase-freie Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe) überführt, in die Quellwasser vorgelegt wurde. Bei Proben für FISH wurde zusätzlich die entsprechende Menge an Fixierungslösung direkt vor Ort zugegeben. Für die Entnahme von Proben zur DNA-Isolierung wurden sterile, mit 5%iger Chlorbleichlauge behandelte Instrumente verwendet. Die Proben wurden in einer Kühltasche bzw. Kühlbox bei einer Temperatur von 4-10°C ins Labor transportiert und bei 4°C gelagert.

6.3 Dokumentation

Die Dokumentation der beprobten mikrobiellen Strukturen und der Probenentnahmestellen erfolgte mit einer Digitalkamera (Coolpix 990, Nikon Cooperation, Tokio, Japan bzw. Powershot G3, Canon, Tokio, Japan).

7. Isolierung und Aufreinigung von Umwelt-DNA

7.1 DNA-Isolierung nach Barns et al., 1994; modifiziert

7.1.1 Lösungen

DNA-Isolierungspuffer A:

NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 8,0	500 mM
Na ₃ Citrat	1 mM

Die Substanzen wurden in H₂O, hochrein (LiChrosolv[®]) gelöst.

DNA-Isolierungspuffer B:

NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 8,0	200 mM
SDS	4%

Die Substanzen wurden in H₂O, hochrein (LiChrosolv[®]) gelöst.

Puffergesättigtes Phenol:

Zur Neutralisation des sauren, wassergesättigten Aqua-Phenol[™] wurden 5 ml pH-Maker[™]-Lösung (pH 7,5) mit H₂O, hochrein, (LiChrosolv[®]) auf 50 ml aufgefüllt und mit dem Phenol gut vermischt. Nach Trennung der beiden Phasen wurde zur Kontrolle ein Aliquot der wässrigen Phase entnommen, mit H₂O_{bidest.} zweifach verdünnt und mit einem pH-Meter kontrolliert. Zur besseren Unterscheidung der beiden Phasen erfolgte eine Zugabe von 0,02 % (w/v) 8-Hydroxy-Chinolin, welches die Phenolphase gelblich färbt. Anschließend wurde mit Argon überschichtet, und das AquaPhenol[™] abgedunkelt bei 4°C aufbewahrt.

NaCl/CTAB-
Lösung:

NaCl	5M
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	100 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 µl

7.1.2 Durchführung

Für die DNA-Isolierung wurde zunächst die Originalprobe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (TZ, 13000 Upm, 10 min, RT). Nachdem der Überstand abgezogen wurde, wurde das Pellet in 250 µl DNA-Isolierungspuffer A resuspendiert und mit 250 µl DNA-Isolierungspuffer B versetzt. Nach vorsichtigem Mischen der Suspension durch Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde die Probe bei -85°C (Kelvinator) tiefgefroren und im Heizblock (Eppendorf Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg) bei 56°C aufgetaut. Nach diesem Schritt wurden die Proben mikroskopisch untersucht. Waren die Zellen noch nicht lysiert, wurde der Einfrier-Auftauvorgang bis zu zweimal wiederholt.

Für eine exakte Trennung von wässriger und organischer Phase wurde das Phase Lock Gel light (Eppendorf) verwendet. Das Phase Lock Gel fungierte als Barriere zwischen der organischen und der wässrigen Phase, so dass die DNA enthaltende, wässrige Phase dekantiert oder leicht mit der Pipette abgezogen werden konnte. Vor Verwendung des Phase Lock Gels wurde dieses ca. 20-30 s bei 14.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor, 15°C) zentrifugiert. Auf das so vorbereitete Gel wurden das Zell-Lysat und 500 µl Aqua-Phenol gegeben. Nach sorgfältigem Mischen schloss sich ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt (14.000 Upm, 15°C) an. Nach der Zentrifugation befanden sich die organische Phase und die Proteine unterhalb der Gel-Phase. Es erfolgte eine Zugabe von 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) im selben Reaktionsgefäß. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, 15°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Phase Lock Gel überführt. Nach der Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) und 5-minütiger Zentrifugation (14.000 Upm, 15°C) wurde die wässrige Phase (ca. 400 µl), die sich nach der Zentrifugation auf dem Gel befand, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol (mind. 1 h, RT) oder von 2 Volumina Ethanol (p.a.) und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) pro ml wässriger Lösung (mind. 2 h, -20°C) gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C+, SS34 Rotor, 20000 Upm, 30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in einem Volumen eiskalten, 70%igen Ethanol gewaschen und nochmals 30 min zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde über Nacht im Exsikkator getrocknet und schließlich in ca. 15 µl hochreinem Wasser (LiChrosolv®) gelöst.

7.2 DNA-Isolierung aus Algen

Die frisch gesammelten Algen wurden für mehrere Stunden in sterilem Moorwasser auf einem Schüttler (Gyratory® Shaker-G2, New Brunswick scientific, Edison, USA) gewaschen, um Fremdorganismen zu beseitigen. Dabei wurde das Wasser alle 30 min gewechselt. Die Algen-Filamente wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 400 µl Puffer A resuspendiert. Zur Zelllyse wurde 400 µl Puffer B zugegeben, und die Proben viermal bei -80°C eingefroren und bei 56°C aufgetaut. Um die Zellhüllen aufzulösen, wurde der Ansatz unter Zusatz von 1 mg Proteinase K für 1 h bei 65°C inkubiert. Um Proteine und Histone zu fällen, wurde 135 µl 5M NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde darauf unter Zusatz von 100 µl CTAB/NaCl-Lösung für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Lysat mit 1 Vol. Phenol ausgeschüttelt und 10 min. in einer Tischzentrifuge (Picofuge MC13, Heraeus

Instruments GmbH, Hanau, 13.000 Upm, RT) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und mit 1 Vol. Phenol:Chlorform:Isoamylalkohol (25:24:1) und darauf mit 1 Vol. Chlorform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol oder 2 Volumen Ethanol wie in II.6.1.2 beschrieben, gefällt.

7.3 DNA-Isolierung mit Reaktionskit

Die DNA-Isolierung mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

7.4 DNA-Aufreinigung

Nach der DNA-Isolierung mit der Methode nach Barns et al. (1994; modifiziert) aus bräunlichen Streamern der Probenentnahmestelle Str.6 (Sippenauer Moor) erhielt man DNA, die durch Verunreinigung mit Huminsäuren bräunlich gefärbt war. Um die PCR hemmenden Huminsäuren zu beseitigen, wurde die verunreinigte DNA auf mit Sephadex G200-120 und PVPP gefüllte Säulchen (PALL) aufgetragen und zentrifugiert. Die DNA war dann soweit aufgereinigt, um in der PCR eingesetzt werden zu können.

7.4.1 Lösungen

TE-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	20 mM
	EDTA, pH 8,0	2 mM

Die beiden Lösungen wurden in hochreinem Wasser (LiChrosolv®) hergestellt und vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.

7.4.2 Präparation von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP):

100 g PVPP wurden mit 1,3 l HCl (3M) versetzt und bei Raumtemperatur (RT) 18 h gerührt. Nach dem Absaugen über einen Büchnertrichter mit Cellulose-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Nr. 595) wurde das PVPP in 1,5 l K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer (60mM, pH 7,4) resuspendiert und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das PVPP erneut filtriert, in 1,5 l K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer (60mM, pH 7,4) resuspendiert und 30 min gerührt. Die Waschschrte mit Phosphatpuffer wurden drei- bis viermal wiederholt, bis die Suspension einen pH-Wert von pH 7,0 erreicht hatte. Nach einer letzten Filtration wurde das PVPP bei RT über Nacht getrocknet, autoklaviert und steril aufbewahrt.

7.4.3 Präparation der Säulchen

Alle verwendeten Geräte wurden für einige Minuten in 5%ige Chlorbleichlauge eingelegt und anschließend mit entionisiertem Wasser nachgewaschen. Die Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen durch Fremd-DNA zu verhindern. Ca. 0,7 ml Sephadex G 200-120 wurden mit 20 mg PVPP (gewaschen) in einem Becherglas vermischt. Zu dieser Mischung wurde steriler TE-Puffer (pH 8,0) gegeben, bis das Harz gut benetzt war. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C äquilibriert. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit möglichst wenig sterilem TE-Puffer soweit verdünnt, dass sie mit der 1000 µl-Pipette aufgesaugt werden konnte. Ca. 500 µl wurden auf die Nanosep MF Microconcentratoren aufgetragen und für ca. 15 min bei 3000 Upm in der Tischzentrifuge (Picofuge MC13, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) zentrifugiert. Der durchgetretene TE-Puffer wurde steril entfernt. Es wurde solange Suspension zugegeben und zentrifugiert, bis etwa 500 µl Harz in den Microconcentratoren vorhanden war. Die Säulchen waren nun für die DNA-Aufreinigung bereit und konnten bei 4°C gelagert werden. Vor Benutzung wurden 200 µl TE-Puffer auf die Säulchen gegeben und für 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Der durchgetretene TE-Puffer wurde steril entfernt.

7.4.4 Durchführung

Pro Säulchen sollten nicht mehr als 200 ng DNA bzw. 100 µl DNA-Lösung aufgetragen werden. Die DNA-Probe wurde vorsichtig auf das Säulchen aufgetropft und anschließend für 15 min in der Tischzentrifuge bei 3000 Upm zentrifugiert. Die durchgetretene Flüssigkeit enthält die gereinigte DNA. Durch ein bis zwei weitere Waschschrte der Säule mit je 50 µl TE-Puffer konnte die DNA-Ausbeute erhöht werden.

7.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

7.5.1 Ethidiumbromid-Agaroseplatten-Methode

Herstellung der Ethidiumbromidplatten

Zusammensetzung:	Agarose	1%(w/v)
	Tris/HCl, pH 7,4	10 mM
	EDTA, Dinatriumsalz	1 mM
	Ethidiumbromid	5 µg/ml

Die Agarose wurde zunächst mit Tris/HCl und EDTA aufgekocht und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Nun erfolgte die Zugabe des Ethidiumbromids. Ca. 20 ml wurden in Plastikpetrischalen gegossen und 20 min bei 37°C im Dunkeln getrocknet. Die Platten wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung

Um die Quantität der gewonnenen DNA abschätzen zu können, wurde jeweils 1 µl von verschiedenen Konzentrationen einer Standard-DNA (DNA des *E. coli*-Phagen λ) (100 ng/µl, 50 ng/µl, 25 ng/µl, 12,5 ng/µl, 6,25 ng/µl, 3,125 ng/µl) und 1 µl von der Lösung mit der unbekanntem DNA-Konzentration auf die Ethidiumbromidplatte aufgetragen. Nach einer Einwirkdauer von ca. 20 min, konnte auf dem UV-Schirm (λ=302 nm) die Konzentration der DNA-Lösung durch einen Intensitätsvergleich mit den Standards bestimmt werden.

7.5.2 Photometrische Bestimmung

Plasmid-DNA-Lösung wurde 1:20 mit H₂O, hochrein (LiChrosolv[®]), verdünnt. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) in einer 100 µl Quarzküvette (Hellma GmbH, Mühlheim) bei λ=260 nm bzw. 280 nm gegen H₂O, hochrein (LiChrosolv[®]) im Spektralphotometer DU640 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ konnte die Reinheit der Nukleinsäuren abgeschätzt werden (Maniatis et al., 1989; Tab. 14). Die Konzentration der Lösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD}_{260} \times \text{spez. Konzentration.}$$

<i>Nukleinsäure</i>	<i>Spezifische Konzentration (OD₂₆₀ = 1)</i>	<i>OD₂₆₀/OD₂₈₀</i>
Genomische DNA	50 µg/ml	1,8
DNA-Oligonukleotide	20 µg/ml	1,8
Plasmid-DNA	20 µg/ml	1,8-2

Tab. 14: Konzentrationsbestimmung nach Maniatis et al., 1989

8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

8.1 Lösungen

Nukleotid-Mix:

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100 mM)	10 µl
H ₂ O, hochrein (LiChrosolv [®])	360 µl

TAE-Puffer (1x):

Tris	40 mM
Natriumacetat	20 mM
EDTA (Säure)	2,5 mM
Mit Essigsäure (99,7% (w/v)) pH 8,3 einstellen.	

Auftragspuffer:

Ficoll	25% (w/v)
Tris/HCl, pH 8,0	40 mM
EDTA, Dinatriumsalz	20 mM
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

Die Substanzen wurden in H₂O hochrein (LiChrosolv[®]) gelöst

Ethidiumbromidbad:

Ethidiumbromid	2-4 mg
H ₂ O, entionisiert	1000 ml

8.2 Primer

<i>Primer</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Primersequenz (5'-3')</i>	<i>Zielsequenz/ rRNA Nucleotid- position*</i>	<i>Referenz</i>
8aF	<i>Archaea</i>	TCY GGT TGA TCC TGC C	8-23	Burggraf et al., 1992
28aF	<i>Crenarchaeota</i>	AAT CCG GTT GAT CCT GCC GGA CC	28-51	Schleper et al., 1997
344aF	<i>Archaea</i>	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	345-364	Burggraf et al., 1997
1119aR	<i>Archaea</i>	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T	1101-1119	Burggraf et al., 1997
1406uR	universell	ACG GGC GGT GTG TRC AA	1406-1390	Lane, 1991
1512uR	universell	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT	1512-1491	Eder et al., 1999
457R	<i>Crenarchaeota</i>	TTG CCC CCC GCT TAT TCS CCC G	510-489	Schleper et al., 1997
457F	<i>Crenarchaeota</i>	CGG GSG AAT AAG CGG GGG GCA A	489-510	Diese Arbeit
9bF	<i>Bacteria</i>	GRG TTT GAT CCT GGC TCA G	9-27	Burggraf et al., 1992
516uF	universell	TGB CAG CMG CCG CGG TAA	516-534	Stetter und Burggraf, unpubliziert
519uF	universell	CAG CMG CCG CGG TAA TAC	519-537	Eder et al., 1999
M13F (-40)	-	GTT TTC CCA GTC ACG A	Lac-Operon	-
M13R	-	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	Lac-Operon	-
9eF	<i>Eukaryota</i>	CTG GTT GAT CCT GCC AGT A	9-28	Huber, unpubliziert
1242eR	<i>Eukaryota</i>	TCA GTG TAG CGC GCG TGC	1242-1224	Huber, unpubliziert
1525 eR	<i>Eukaryota</i>	CTG CAG GTT CAC CTA C	1525-1509	Huber, unpubliziert
EukG01F	<i>Rhodophyta</i>	CAC CTG GTT GAT CCT GCC AG	6-25	Saunders und Kraft, 1993
EukG04F	<i>Rhodophyta</i>	CAG AGG TGA AAT TCT TGG AT	686-705	Saunders und Kraft, 1993
EukG07R	<i>Rhodophyta</i>	AGC TTG ATC CTT CTG CAG GTT CAC CTA C	1538-1511	Saunders und Kraft, 1993
EukG14R	<i>Rhodophyta</i>	CCT TGG CAG ACG CTT TCG CAG	741-723	Saunders und Kraft, 1993

Tab. 15: Verwendete Primer, Spezifitäten, Sequenzen, Positionen und Referenzen
*Positionen beziehen sich auf die 16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al., 1978)

8.3 Durchführung

Für die Amplifikation bakterieller 16S rDNA wurde LD (Low-DNA)-Taq verwendet. Als Kontrolle wurden für jede Primer-Kombination eine Nullkontrolle (ohne Zugabe von DNA) und eine Positivkontrolle (Zugabe von DNA von *Pyrobaculum aerophilum* oder *Thermococcus celer* (archaeell) und *Aquifex pyrophilus* (bakteriell)) angesetzt.

Um Fehlpaarungen der Primer zu verhindern wurden die Reaktionsgefäße erst bei Erreichen von 93-94°C in den Thermocycler gesetzt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz bei einem der folgenden Programme inkubiert. Die PCR-Produkte wurden sofort bearbeitet oder für kurze Zeit im Kühlschrank bei 6°C gelagert.

Programm Standard 60 (bakteriell und archaeell)			
Nr.	Dauer	Inkubationstemperatur	Zyklen
1	1 min 30 s	96°C	1
2	30 s	96°C	10
	↓		
	30 s	60°C	
3	↓		25
	30 s	72°C	
	↓		
	1 min (+2 s)	94°C	
4	10 min	72°C	1
5	∞	6°C	

Tab. 16: Inkubationstemperaturen, Dauer und Zyklen im Thermocycler für Programm Standard 60

Programm Moor 50 (für <i>Crenarchaeota</i> -spezifische PCR; Schleper et al., 1997)			
Nr.	Dauer	Inkubationstemperatur	Zyklen
1	1 min	95°C	30
	↓ 1 min	↓ 50°C	
	↓ 2 min	↓ 72°C	
2	∞	6°C	

Tab. 17: Inkubationstemperaturen, Dauer und Zyklen im Thermocycler für Programm Moor 50

Programm Standard 55 (bakteriell und archaeell)			
Nr.	Dauer	Inkubationstemperatur	Zyklen
1	1 min 30 s	96°C	1
2	30 s	94°C	10
	↓ 30 s	↓ 55°C	
	↓ 1 min	↓ 72°C	
3	20 s	94°C	25
	↓ 30 s	↓ 55°C	
	↓ 1 min (+2 s)	↓ 72°C	
4	10 min	72°C	1
5	∞	6°C	

Tab. 18: Inkubationstemperaturen, Dauer und Zyklen im Thermocycler für Programm Standard 55

Programm Algen (für <i>Rhodophyta</i> -spezifische PCR; Saunders und Kraft, 1993)			
Nr.	Dauer	Inkubationstemperatur	Zyklen
1	4 min	94°C	1
	↓ 45s	↓ 55°C	
	↓ 2 min	↓ 72°C	
2	30s	94°C	36-38
	↓ 45s	↓ 55°C	
	↓ 2 min	↓ 72°C	
3	30s	94°C	1
	↓ 45s	↓ 55°C	
	↓ 6 min	↓ 72°C	
4	∞	6°C	

Tab. 19: Inkubationstemperaturen, Dauer und Zyklen im Thermocycler für Programm Algen

8.4 Überprüfung des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese

Für die Überprüfung des PCR-Produktes wurde ein 1%iges Agarosegel inkl. 10 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Alternativ konnte das Gel nachträglich in einem Ethidiumbromidbad (50 µl EtBr/ 500 ml H₂O_{bidest.}) für ca. 15-45 min gefärbt werden. Die Taschen des Gels wurden mit einer Mischung aus 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Auftragspuffer gefüllt. Gleichzeitig wurden 3 µl eines PCR-Standards aufgetragen (MBI Fermentas GmbH). Bei allen Pipettiervorgängen des PCR-Produktes wurden Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 30 min bei 85-90 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) ausgewertet.

8.5 Ganzzell-PCR

Bei der Ganzzell-PCR wurden anstelle isolierter DNA ganze Zellen eingesetzt. Im Thermocycler führte der Hitzeschock bei der Hot-Start-PCR zur Lyse der eingesetzten Zellen und dem Freisetzen der DNA. Mit dem Ansatz wurde eine Standard PCR (Programm Standard 60, siehe Tab. 16) durchgeführt.

8.6 Reamplifikations-PCR

Aus dem gereinigten PCR-Produkt konnte eine Nested-PCR angesetzt werden. Durch die Nested-PCR wurde die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich erhöht, da nahezu alle falschen vorher amplifizierten Kopien unberücksichtigt blieben. Das PCR-Produkt der ersten Amplifikation diente dabei in einer zweiten PCR als Matrize. Dazu wurden Primer eingesetzt, die innerhalb des ersten PCR-Produkts hybridisieren. Verwendung fanden crenarchaeelle Primer (28aF, 457R), die allein oder in Kombination mit einem archaeellen Primer (1119aR) eingesetzt wurden.

8.7 PCR-Screening

Mit plasmidhaltigen Zellen wurde eine Ganzzell-PCR durchgeführt, um nach der Klonierung die Insertgröße der Klone zu überprüfen. Dazu wurden die Primer M13 lacZ Forward[-40] und M13 lacZ Reverse verwendet, die an den flankierenden Bereichen der Multiple Cloning Site des Klonierungsvektors ansetzen.

9. Klonierung

9.1 Lösungen

X-Gal-Lösung: (Lagerung bei -20°C)	X-Gal	40 mg
	Dimethylformamid	1 ml
IPTG-Lösung: (Lagerung bei -4°C)	IPTG	24 mg
	H ₂ O, hochrein (LiChrosolv [®])	1 ml
Enzym-Mastermix:	<i>AluI</i> , <i>HhaI</i> , <i>HinfI</i> , <i>RsaI</i> (je 10 U/μl)	0,25 μl
	Puffer REact [®] 1 (10x)	1 μl

9.2 Reinigung des PCR-Produktes

Eine Aufreinigung des PCR-Produkts ist vor allem bei der Amplifikation von Umwelt-DNA nötig. Diese enthält häufig DNA-Bruchstücke, die bei der PCR zu kurze Amplifikate liefern können.

9.2.1 Reinigung über Microcon 100-Filter bzw. Montage PCR

Die zu klonierenden PCR-Produkte wurden gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe von Microcon 100-Filtern bzw. Montage PCR von ungebundenen Primern und Nucleotiden gereinigt. Die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte wurde mittels einer Ethidiumbromidplatte abgeschätzt.

9.2.2 Reinigung mittels Gelelektrophorese

Das zu reinigende PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese (90 min, 70V) über ein Agarosegel (0,8% (w/v) Low melting point Agarose, inkl. 50 μg EtBr pro 100 ml Gel) gereinigt. Die zu klonierende Bande wurde mit einer mit Chlorbleichlauge behandelten Rasierklinge ausgeschnitten. Das Agarosestückchen mit der enthaltenen DNA wurde im Heizblock (Dri Block[®] DB-2D, Techne, Cambridge) bei 70°C aufgeschmolzen und direkt in die PCR eingesetzt.

9.3 Durchführung

9.3.1 Klonierung mit dem Original TA Cloning® Kit

Die Klonierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Um ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1 zu erhalten, wurde die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes durch folgende Formel bestimmt:

$$X \text{ ng PCR-Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR-Produkt}) (50 \text{ ng pCR}^{\text{®}} 2.1 \text{ Vektor})}{(\text{Größe des pCR}^{\text{®}} 2.1 \text{ Vektors in bp: } \sim 3900)}$$

X ist die Menge des PCR-Produktes von Y Basenpaaren Länge.

Für den Ligationsansatz wurden folgende Substanzen in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

frisches PCR-Produkt (max. 6 µl)	X µl
10x Ligationspuffer	1 µl
pCR [®] 2.1 Vektor (25 ng/µl)	2 µl
Reinstwasser, steril	ad 9 µl
T4 DNA Ligase (4,0 Weiss units)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

9.3.2 Klonierung mit dem Qiagen® PCR Cloning Kit

Die Klonierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes wurde durch folgende Formel bestimmt:

$$\text{ng PCR-Produkt} = \frac{50 \text{ ng} \times \text{PCR-Produktgröße (bp)} \times \text{Molarverhältnis}}{3851 \text{ bp}}$$

Für den Ligationsansatz wurden folgende Substanzen in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

pDrive Cloning Vector (50 ng/µl)	1 µl
PCR-Produkt	1-4 µl
Destilliertes Wasser	variabel
Ligations Master Mix 2 x	5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

9.3.3 Sicherung der Klone und Amplifikation der Insertionsfragmente

Einzelne weiße Klone wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen, auf abgegrenzte Felder einer mit Ampicillin (100 µl einer 10 mg/ml-Lösung) bestrichenen LB-Platte überimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert und in Glycerinkulturen (siehe 9.5) gesichert.

Der gleiche Zahnstocher wurde darauf in 24 µl einer PCR-Lösung eingetaucht, die Taq-Polymerase, PCR-Puffer, Nukleotide und die Primer M13F (-40) und M13R in den

Konzentrationen einer Standard-PCR enthielt. Diese Ansätze wurden nun unter den oben angegebenen Bedingungen im Thermocycler (Programm Standard 60, siehe Tab. 16) inkubiert. Durch Gelelektrophorese wurde anschließend überprüft, ob die Klone wirklich ein Insert in ihren Plasmiden besaßen. Außerdem konnte eine Auslese derjenigen Klone vorgenommen werden, deren Insert nicht die richtige Länge aufwies.

9.4 Screening der Klone und Restriktionsverdau (ARDRA)

Um einen Hinweis auf Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Sequenzabfolge der Inserts zu erhalten, wurde das PCR-Produkt einem Restriktionsverdau unterzogen. Dazu wurden Endonukleasen benutzt, die folgende Schnittstellen aufwiesen:

<i>Restriktionsendonuklease</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Schnittstelle</i>
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↑GA-5'
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'-GCG↓C-3' 3'-C↑GCG-5'
<i>Hinfi</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'-G↓ANTC-3' 3'-CTNA↑G-5'
<i>RsaI</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'-GT↓AC-3' 3'-CA↑TG-5'

Tab. 20: Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, ihre Herkunft und Schnittstellen

Die Einteilung der Klone erfolgte mittels Restriktionsmuster (ARDRA = amplified rDNA restriction analysis, Vaneechotte et al., 1992): Für den Verdau wurde ein Enzym-Mastermix (siehe 9.1) hergestellt, von dem jeweils 2 µl zu dem PCR-Produkt pipettiert wurden. Der Verdau wurde für 3 h bei 37°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über Gelelektrophorese (85 V; ca. 70 min) durch ein 3%iges Agarose-1000-Gel, dem vor dem Gießen 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel zugegeben wurden. Als Standard wurde 1 µl einer 25 bp-Leiter (1 µg/µl) mit 2 µl Auftragspuffer aufgetragen. Das Agarosegel wurde auf dem UV-Schirm bei 302 nm Wellenlänge betrachtet und dokumentiert. Waren die Banden des Restriktionsverdaus zu schwach konnte das Gel in einem Ethidiumbromidbad (4 mg/l) für ca. 20-45 min nachgefärbt werden. Ein Klon von jeder „Mustergruppe“ wurde für die Plasmidpräparation ausgewählt.

9.5 Sichern der Klone in Glycerinkulturen

Alle unterschiedlichen Klone wurden in 10 ml LB-Flüssigmedium inkl. 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und für 15 h bei 37°C inkubiert. Jeweils 2-4 ml der bewachsenen Medien wurden steril abzentrifugiert (13.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Picofuge MC-13). Das Pellet wurde in 500 µl sterilem LB-Medium resuspendiert, mit 600 µl sterilem Glycerin (87%) versetzt und bei -80°C tiefgefroren (Kelvinator Heraeus HFU 686 Top, Heraeus Instruments GmbH, Hanau).

9.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde gemäß Herstellerangaben mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit isoliert.

9.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und der Plasmid-DNA wurde von der Firma Entelechon GmbH (Regensburg) bzw. der Firma Genart (Regensburg) durchgeführt. Die Sequenzierungsansätze wurden nach den Angaben der Firmen vorbereitet.

10. Sequenzdatenanalyse

Für die Analyse der 16S bzw. 18S rRNA-Gensequenzen wurde ein Alignment von ca. 11.000 homologen Gesamt- und Teilsequenzen, die größtenteils eine Länge von mehr als 1000 Nukleotiden aufwiesen, aus öffentlichen Datenbanken verwendet (ARB-Projekt, Ludwig und Strunk 1997; Ludwig, 1995). Die erhaltenen Gensequenzen wurden mit Hilfe der Funktionen des ARB-Programms in das bestehende Alignment eingepasst (Ludwig und Strunk, 1997). Zur Baumkonstruktion wurden die Methoden Distance Matrix, Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood (fastDNAm1) verwendet. Als Filter wurden Termini-, sowie spezifische Filter für Archaeen und Bakterien verwendet. Alle Klonsequenzen wurden vor der phylogenetischen Einordnung einer Analyse durch CHECK-CHIMERA (Ribosomal Database Project; Maidak et al., 2000) unterzogen, um mögliche Artefakte auszuschließen.

Bakterielle und archaeelle 16S rRNA Gensequenzen wurden bei der EMBL-Nukleotid-Sequenzdatenbank hinterlegt. Im Folgenden werden die Datenbankreferenznummern jeweils mit angegeben.

11. Ganzzellhybridisierung mit Oligonukleotiden

11.1 Auswahl der Oligonukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe

Oligonukleotidsequenzen mit der gewünschten Spezifität wurden entweder aus Veröffentlichungen übernommen (s. Tab. II.5) oder selbst konstruiert.

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Pos.*</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Markierung an 5'</i>
ARCH345 Rudolph, 2003	345	TTC GCG CCT GST GCR CCC CG	<i>Archaea</i>	RG oder CY3
ARCH915 Stahl u. Amann, 1991	915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Archaea</i>	RG oder CY3
ARCH1060 Burggraf, unpubl.	1060	GGC CAT GCA CCW CCT CTC	<i>Archaea</i>	RG oder CY3
EUB338/I Amann et al., 1990	338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Bacteria</i>	RG, CY3 oder Texas Red
EUB338/II Daims et al., 1999	338	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Bacteria</i>	RG oder CY3
EUB338/III Daims et al., 1999	338	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Bacteria</i>	RG oder CY3
Cren499R Burggraf et al., 1994	499	CCA GRC TTG CCC CCC GCT	<i>Crenarchaeota</i>	RG
Eury498R Burggraf et al., 1994	498	CTT GCC CRG CCC TT	<i>Euryarchaeota</i>	RG
75stR („Sitt 1“) Moissl, 2000	75	GCA AGC TTC CTA TCA TCG	„Sitt“-Gruppe	CY 3
TN1 Wagner et al., 1994	652	CTC CTC TCC CAC ATT CTA	<i>Thiothrix</i>	CY3
CF319a/b Manz et al., 1996	319	TGG TCC GTR TCT CAG TAC	<i>Cytophagales</i>	CY3
CF319 mod Diese Arbeit	319	TGG CCC GTA TCT CAG TGC	CFB-Isolate	CY3
CF729R Diese Arbeit	729	TCG CAA TTG ACG TTC TGG	Sip100	CY3
Cren174 Diese Arbeit	174	CTC GTC CAA CTA TGG AGA	4K6con	RG
Cren231a Diese Arbeit	231	AAC TGA TAG GAC GCA GTC	Str.6_6/K12	RG
Cren231b Diese Arbeit	231	CAT AAT CGG GAG CAA TCC	4K6con	RG

Cren324R Diese Arbeit	324	GGG CCT GGG CCC TGT CTC	Str.6_6/K4	RG
Cren487R Diese Arbeit	487	ACC CCT TAT TCG CCA GTG	Str.6_6/K12	RG
Cren588R Diese Arbeit	588	ACA AGG GAC TAA CTC AGC	Str.6_6/K4	RG
Cren625R Diese Arbeit	625	GTA TTG CCG GCA GCC CAT	Str.6_6/K12	RG
Cren630 Diese Arbeit	630	GGC AGT CTT CTT AGC AGA	4K6con	RG
Cren633R Diese Arbeit	633	GCT TTG CAG TAT TGC CGG	Str.6_6/K12	RG

Tab. 21: Verwendete Oligonukleotidsonden, Referenzen, Positionen, Sequenzen, Spezifitäten und Markierungen;

*Positionen beziehen sich auf die 16S rRNA von *E.coli* (Brosius et al., 1978)

Die hier aufgeführten Sonden ARCH345, ARCH915 und ARCH1060 wurden zusätzlich als ARCH-Mix, die Sonden EUB338/I, EUB338/II und EUB338/III als EUB-Mix eingesetzt.

11.2 Sondenkonstruktion

Die Sondenkonstruktion erfolgte mit den „probe search“- und „probe match“- Funktionen des ARB-Software Pakets. Damit können potentielle Sondensequenzen für bestimmte Zielsequenzen sowie die Spezifität der jeweiligen Sonden(-Sequenzen) angezeigt werden. Gleichzeitig wird die Anzahl der Fehlpaarungen der homologen Sequenzen der anderen Organismen ermittelt und dargestellt.

Da die Zugänglichkeit der 16S rRNA für Oligonukleotide aufgrund der Tertiärstruktur nicht an allen Bereichen gleich gut gewährleistet ist, wurden die selbstkonstruierten Sonden an Karten der Sekundärstrukturen der 16S rRNAs von *E. coli* und *Metallosphaera sedula*, in denen die gut zugänglichen Bereiche markiert sind (Fuchs et al., 1998; Behrens et al., 2002), überprüft.

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech, Ebersberg, bzw. Metabion, Martinsried, München, synthetisiert und mit CY3, RG oder Texas Red-Farbstoff gekoppelt. Die Fluoreszenz-Eigenschaften dieser Farbstoffe sind in der Tab. 22 dargestellt. Die Spezifität der gewählten Oligonukleotide wurde an den jeweiligen Mikroorganismen bzw. Originalproben mit empirisch ermittelten SDS- und Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer überprüft.

<i>Farbstoff</i>	<i>Absorption</i>	<i>Emission</i>
CY3	552 nm	565 nm
RG	502 nm	527 nm
Texas Red®	595 nm	615 nm

Tab. 22: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe, Absorptions- und Emissionswellenlängen

11.3 Beschichtung der Objektträger

Gelatine-Lösung:

Gelatine	0,1% (w/v)
KCr(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,01% (w/v)

Die Epoxydharz-beschichteten Objektträger wurden in einer Detergensenlösung gereinigt, mit entionisiertem Wasser gespült und in Schräglage getrocknet. Die Beschichtung erfolgte durch kurzzeitiges Eintauchen der Objektträger in 70°C warme Gelatine-Lösung. Nach Trocknung (RT) in Schräglage waren die Objektträger einsatzbereit. Durch den Zusatz des Konservierungsmittels KCr(SO₄)₂ sind die Objektträger ca. ein Jahr haltbar.

11.4 Fixierung der Zellen

Phosphat-Puffer (pH 7,2):

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,2M
--	------

Von beiden Chemikalien wurden zunächst 0,2 M Lösungen in H₂O_{bidest.} hergestellt. Die Na₂HPO₄-Lösung wurde anschließend gegen die NaH₂PO₄-Lösung bis zu einem pH-Wert von pH 7,2 titriert.

3x PBS-Puffer (pH 7,2):

NaCl	390 mM
Phosphat-Puffer, pH 7,2	30 mM

Fixierungslösung:

Paraformaldehyd	1,5 g
H ₂ O _{bidest.}	3,3 ml
NaOH, 5 M	15 µl
3x PBS-Puffer	1,65 ml
HCl, 2 M	10-15 µl

Das Paraformaldehyd wurde mit H₂O_{bidest.} und NaOH unter Rühren auf 60°C erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nach dem Abkühlen auf RT erfolgte die Zugabe von 3x PBS-Puffer. Mit 2 M HCl wurde ein pH-Wert von pH 7 eingestellt. Zuletzt wurde die Lösung mit Hilfe eines Cellulosefilters filtriert, um Präzipitate abzutrennen.

Standardmäßig wurde zur Zellfixierung die Zellkultur bzw. die Stücke der Filamentproben mit 1/10 Volumen frischer Fixierungslösung versetzt und vermischt. Nach Inkubation bei RT für 1 h bzw. bei 4°C über Nacht wurden die Zellen abzentrifugiert (Picofuge MC-13, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, 13000 Upm, 10 min, RT). Zellpellets wurden zur Beseitigung des Formaldehyds mit 1 ml 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit 1x PBS-Puffer

die gewünschte Zelldichte eingestellt (etwa 1×10^8 Zellen/ml). Nach Zugabe von einem Volumen Ethanol abs. war eine Lagerung der Zellen für mehrere Monate bei -20°C möglich. Bei fixierten Filamentproben, die keine Zentrifugation erlaubten, wurden mit einer sterilen Pinzette Stücke aus der Fixierungslösung entnommen und in 1x PBS-Puffer durch leichtes Schwenken gewaschen. Anschließend konnten diese Proben ebenfalls mit Ethanol haltbar gemacht werden.

11.5 Durchführung

11.5.1 Trägergebundene Hybridisierung

FISH wurde nach Amann et al., 1990a, durchgeführt.

Formamid, entionisiert:

Formamid	50 ml
Serdolit MB-1 (20-50 mesh)	5 g

Das Formamid wurde nach Zugabe des Serdolits 30 min bei RT gerührt und anschließend durch einen Cellulosefilter filtriert. Die Lösung kann portioniert in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert werden.

Hybridisierungspuffer:

NaCl	0,9 M
Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
Anschließend Zugabe von:	
SDS	0,005-1%
Formamid, entionisiert	0-35%

Waschpuffer:

Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
SDS	0,005-1%
NaCl	0,11-0,9 M

Die Salzkonzentration des Waschpuffers wurde der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers wie folgt angepaßt:

Formamid (Hybridisierungspuffer)	0%	10%	20%	30%
NaCl-Konzentration (Waschpuffer)	0,9 M	0,45 M	0,23 M	0,11 M

Die Bedingungen der Ganzzellhybridisierung wurden für jede Oligonukleotidsonde empirisch ermittelt. Neben dem Schmelzpunkt der Sonde beeinflussen die Formamidkonzentration des Hybridisierungs- und die Salzkonzentration des Waschpuffers das Bindungsverhalten der Sonde an die Zielsequenz. Als Näherungsformel für die Ermittlung der Formamidkonzentration wurde folgende Formel verwendet (Lathe, 1985; Sambrook, 1989; modifiziert):

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M(\text{Na}^+) + 0,4 \cdot (\%G + \%C) - 820/n - 0,5 \cdot (\% \text{Formamid})$$

Wobei gilt:

T_m	Schmelztemperatur des Oligonukleotids (in °C)
$M(\text{Na}^+)$	Konzentration monovalenter Ionen des Hybridisierungspuffers (in mol/l)
%G + %C	GC-Gehalt der Sonde
n	Anzahl der Nukleotide
%Formamid	Formamid-Anteil in % (v/v)

Je nach Zelldichte wurden zwischen 1-15 μl der fixierten Zellen/Proben auf die Felder der beschichteten Objektträger aufgebracht. Bei Filamentproben wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette kleine Stücke auf die Felder aufgebracht und mit zwei Pipettenspitzen gleichmäßig verteilt, ohne dabei die Gelatinebeschichtung zu verletzen. Die Proben wurden nun auf einem Heizblock (Dri-Block[®] DB-2D, Techne, Cambridge, Großbritannien) bei 42°C getrocknet und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50% (v/v), 80% (v/v), abs. Ethanol, jeweils für 3 min) dehydratisiert und nachfixiert. Nach dem Trocknen der Objektträger bei RT gab man auf jedes Feld 8 μl Hybridisierungspuffer und inkubierte die Objektträger waagrecht in einem Schraubdeckelreaktionsgefäß (Falcon Tube[™]) bei 46°C für 15 min (Hybridisierungsöfen OV 5, Biometra, Göttingen). Um das Verdunsten des Hybridisierungspuffers zu verhindern, wurde das Schraubdeckelreaktionsgefäß mit einem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ -getränktem Zellstofftuch ausgelegt. Anschließend wurde der Objektträger aus dem Röhrchen entnommen und auf einen 37°C Heizblock (Bachofner Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) gelegt, um einen Temperaturverlust zu verhindern. Darauf wurden zügig jeweils 1 μl Sondenlösung (50 ng/ μl) bzw. ARCH- oder EUB-Mix auf die Felder des Objektträgers gegeben. Die Hybridisierung wurde bei 46°C für 2 h durchgeführt. Danach wurden die Objektträger mit ca. 3 ml des auf 48°C vorgewärmten Waschpuffers abgespült und senkrecht in einem Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 45 ml Waschpuffer (48°C) für 15 min bei 48°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger mit entionisiertem kaltem Wasser abgewaschen. Nach der Trocknung mit Druckluft wurden sie in Citifluor AF-1 eingebettet, um die Photooxidation der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, und mit einem 24 x 50 mm Deckglas abgedeckt. So konnten die Objektträger mehrere Monate bei -20°C gelagert oder sofort mikroskopisch betrachtet werden. Nach der Hybridisierung wurde darauf geachtet, dass die Objektträger vor Lichteinstrahlung geschützt wurden.

11.5.2. DAPI-Färbung

DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol)-Lösung:

EDTA, Dinatriumsalz (100 mM)	50 µl
Na-Acetat (2M), pH 4,7	30 µl
DAPI (1mg/5 ml)	10 µl
Optional: SDS (10%)	10 µl

Bei der *in-situ*-Hybridisierung von neuen Umweltproben wurden die Objektträger nach dem Hybridisieren zusätzlich noch mit DAPI gefärbt, um Zellen, die eventuell nicht mit den verwendeten Sonden hybridisieren, zu erkennen.

Vor der Einbettung in Citifluor AF-1 wurden dazu 10 µl einer 1:10 mit Waschpuffer verdünnten DAPI-Lösung pro Feld aufgetragen. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Objektträger mit entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet.

11.5.3 Hybridisierung in Suspension

10x Standard Saline Citrat (SSC):

NaCl	0,15 M
Na ₃ -Citrat	1,5 M

Hybridisierungspuffer:

NaCl	0,9 M
SSC	1x
Tween 20 oder SDS	0,001%-1% (v/v bzw. w/v)
Formamid (entionisiert)	0-50 %

Waschpuffer:

NaCl	0,9 M
SSC	1x
Tween 20 oder SDS	0,001%-1% (v/v bzw. w/v)

Die Tween 20 bzw. SDS-Konzentration des Waschpuffers wurde an die des Hybridisierungspuffers angepasst.

Die fixierten Zellen wurden in 50 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Nach 15minütiger Inkubation in einem 46°C warmen, mit Alufolie abgedunkelten Heizblock (Dri-Block[®] DB-2D, Techne, Cambridge, Großbritannien), wurden je Ansatz 200-500 ng der gewünschten Sonde(n) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 3h bei 46°C. Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend mit 1 ml 46°C warmen Waschpuffer verdünnt und weitere 15 min bei 46°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eiswasser gestoppt, die Zellen 15 min bei 14.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 4°C) zentrifugiert, und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in 20 µl Waschpuffer oder Citifluor

aufgenommen und konnte über Nacht bei 4°C gelagert werden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde wie in 5.3 beschrieben durchgeführt.

12. Bestimmung der Lebensfähigkeit mittels BacLight™-Färbung

Die Überprüfung der Lebensfähigkeit von Zellen wurde mit Hilfe des Lebend-Tot-Farbstoffs BacLight™ nach Angaben des Herstellers, jedoch auf Eis, durchgeführt. BacLight enthält zwei DNA-bindende Farbstoffe: Styro 9 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der durch intakte und beschädigte Membranen in die Zelle eindringen kann. Propidiumiodid kann nur durch beschädigte Membranen in die Zellen gelangen und verändert die Fluoreszenz von Styro 9 in Richtung des längerwelligen, roten Spektrums. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten lebendige Zellen nach Anregung durch UV-Licht grüne, tote Zellen dagegen rote Fluoreszenz.

13. Zellvereinzelung mit Hilfe der „optischen Pinzette“

Eine Möglichkeit zur Gewinnung von Reinkulturen stellt die Laservereinzelung mit Hilfe der „optischen Pinzette“ dar. Mit Hilfe eines Infrarot-Lasers und eines inversen, computergesteuerten Mikroskops (Axiovert 35, Zeiss; Nd:YAG-Laser; $\lambda=1064$ nm; Ausgangsleistung: 2,5 W) kann unter visueller Kontrolle eine Zelle vereinzelt werden (Huber 1995; Beck und Huber 1997). Die Zellen werden dabei in einem stark fokussierten Laserstrahl fixiert („optische Pinzette“) und abgesondert (Ashkin, 1987).

13.1 Vorbereitung der Laserkapillaren

Die Kapillaren wurden über einen Schrumpfschlauch durch Heißluft (Heißluftpistole, Metabo) an die Kanüle fixiert. Sie wurden anschließend in der Mitte mit Hilfe eines Diamantgriffels eingeritzt, um später an dieser Sollbruchstelle ein leichtes Abbrechen zu ermöglichen. Die so vorbereiteten Kapillaren wurden in Reagenzgläser gegeben, die mit Alukappen verschlossen werden, und für 24 h bei 145°C sterilisiert.

13.2 Durchführung

Kurz vor der Laservereinzelung wurde eine 9%ige Dithionitlösung hergestellt (maximale Lagerung unter Stickstoffatmosphäre: bis zu 3 h) und auf Eis gelagert. 10 μ l der Dithionit-Lösung wurden zu 990 μ l sterilfiltriertem (0,1 μ m-Filter) Medium zugegeben, um den Sauerstoff zu reduzieren. Dadurch wurde die durch den Laser induzierte Bildung von zellschädlichen Sauerstoffradikalen verhindert. Die bewachsene Kultur wurde analog

behandelt. Die Medien wurden während des Laservorgangs auf Eis gestellt. Die ersten 9 cm der Kapillare wurden mit sterilem Medium gefüllt, 1 cm wurde mit Mischkultur befüllt. Bei aeroben Ansätzen wurde die Kapillare im Laserlabor, bei anaeroben Ansätzen in der Anaerobenkammer (Gasphase $N_2/H_2 = 95: 5$ (v/v)) befüllt. Die Kapillare wurde in den Objektisch des Lasermikroskops eingespannt. Es wurde mit gekühltem Objektiv (ca. $10^\circ C$ am Objektiv) gearbeitet, um eine Erwärmung der Proben zu verhindern. Nach der erfolgreichen Vereinzelung wurde die Kapillare mit einer Zange an der Sollbruchstelle abgebrochen. Bei aeroben Ansätzen wurde der Flüssigkeitstropfen in die Kanüle aufgezogen und in zwei parallele Kulturmedien bzw. auf eine Agarplatte überführt. Bei anaeroben Ansätzen wurde der Flüssigkeitstropfen unter Argon anaerob in die Kanüle aufgezogen und in zwei parallele Kulturmedien überführt.

14. Immunologische Methoden

14.1 Produktion von spezifischen Antikörpern

Sip100-spezifische, polyklonale Antikörper wurden von der Firma Davids Biotechnologie, Regensburg, hergestellt. Für die Produktion SIP100-spezifischer Antikörper wurde zunächst Sip100-Zellen in 0,001% C-Org (normal 0,01%) gezüchtet, auf ca. 1×10^8 Zellen/ml aufkonzentriert und kühl gelagert. Die Zellen wurden sofort einem Huhn gespritzt. Für den zweiten und dritten Immunisierungsschritt wurden jeweils frische Zellen gezüchtet. Die Antikörper wurden mittels DabioPrepI aus 20 Immuneidottern gewonnen. Es wurde ein Serum (anti-Sip100-Serum) mit 21 mg/ml bereitgestellt. Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde ein Präimmunserum für dementsprechende Tests zur Verfügung gestellt.

14.2 Lösungen

PBST:

PBS (pH 7,4; siehe 11.4)	1x
Tween 20	0,05%

14.3 Immuno-FISH

FISH wurde wie in 11.5 durchgeführt, jedoch mit folgenden Modifikationen: Die Zellen wurden eine Stunde mit 1,5 % Paraformaldehyd (w/v) fixiert und die Ganzzellhybridisierung wurde mit je 100 ng der Fluoreszenzmarkierten Sonden pro Feld durchgeführt. Nach 35-minütiger Hybridisierung bei $46^\circ C$ folgte ein 15-minütiger Waschschrift bei $48^\circ C$.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden alle Arbeitsschritte bei 37°C mit vorgewärmten Lösungen in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. 16 µl PBS-Puffer inkl. 0,05% Tween 20 (PBST-Puffer; Blocking Schritt) wurden pro Feld des Objektträgers aufgetragen, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurde der PBST-Puffer durch 16 µl PBST-Puffer ersetzt, der den primären Antikörper enthielt. Die optimale Antikörperkonzentration wurde durch Verdünnungsreihen in PBST ermittelt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Objektträger für 15 min in PBST unter Schütteln gewaschen, mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Der sekundäre Antikörper (AffiniPure Rabbit Anti-Chicken IgY, FITC-markiert) wurde in PBST verdünnt (1:1.000 bis 1:10.000). Die Markierung wurde, wie für den ersten Antikörper beschrieben, mit 16 µl der Verdünnung durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschritten in PBST. Danach wurden die Zellen mit Citifluor (Citifluor, London; (England)) überschichtet und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

15. Immunomagnetische Isolierung von Mikroorganismen

Zur Zellvereinzlung mittels Kopplung an Antikörpern wurden die tosylaktivierten Dynabeads[®] M-450 (DynaL Biotech, Hamburg) als paramagnetische Partikel verwendet.

15.1 Lösungen

Puffer A: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4):

Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	2,62 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,42 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Puffer D: PBS (pH 7,4) mit 0,1% (w/v) BSA:

NaCl	0,88 g
BSA	0,1% (w/v)
0,01 M Phosphat-Puffer, pH 7,4	ad 100 ml

Puffer E: 0,2 M Tris pH 8,5 mit 0,01% (w/v) BSA:

Tris	2,42 g
H ₂ O _{bidest.}	80 ml
Einstellen des pH-Wertes auf pH 8,5 mit 1M HCl	
BSA	0,01% (w/v)
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
BSA muss steril und frei von Endotoxinen sein	

15.2 Waschen der Dynabeads

Die Dynabeads wurden im Gefäß resuspendiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge Dynabeads in ein 1,7 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Puffer A versetzt und resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde für eine Minute in den Magnetpartikel-Konzentrator (Dynal MPC) überführt, und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde danach aus dem Dynal MPC entfernt und der Waschschrift 3-4mal wiederholt. Die Dynabeads wurden in 1 ml Puffer A resuspendiert.

15.3 Koppeln der Antikörper an die Dynabeads

Den gewaschenen, in Puffer A resuspendierten Dynabeads wurden 5 µg reine Antikörper/ 10^7 Dynabeads zugegeben (gewünschte Konzentration: $4-10 \times 10^8$ Dynabeads/ml). Nach 1-2-minütigem Vortexen wurde der Ansatz für 16-24 Stunden bei 37°C unter leichtem Rollen (50 UpM) inkubiert. Die Dynabeads durften sich dabei nicht absetzen. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß für 2-3 min in den Magnethalter überführt, und der Überstand vorsichtig entfernt. Die Dynabeads wurden anschließend viermal gewaschen (2x in Puffer D für 5 min bei 4°C; 1x in Puffer E für 4 bzw. 24 h bei 37°C, um mit Tris freie Tosylgruppen zu blockieren; 1x in Puffer D für 5 min bei 4°C). Die mit den Antikörpern gekoppelten Dynabeads konnten zur Zellvereinzlung eingesetzt werden. In den gewünschten Konzentrationen in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt konnten sie für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

15.4 Zellvereinzlung mit Dynabeads

Proben mit den gewünschten Zellen wurden aufbereitet und auf 4°C gekühlt. Die Zahl der Zielzellen wurde abgeschätzt, und die passende Menge an Dynabeads (minimal vier Dynabeads/Zielzelle und $1-2 \times 10^7$ Dynabeads/ml Probe) direkt zugegeben. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf einem Roller bei 4°C. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde anschließend für 2-3 min in den Magnethalter überführt. Der Überstand wurde dann mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Das Gefäß wurde aus dem Magnethalter entfernt, und die Zellen in 500 µl Puffer B resuspendiert. Der Waschschrift wurde 5-10x wiederholt, wobei nach jedem zweiten Waschschrift das Eppendorf-Reaktionsgefäß gewechselt wurde, um eine Kontamination mit an den Wänden anhaftende Fremdzellen zu verhindern. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in einem passenden Puffer aufgenommen.

15.4.1 Zellvereinzelung mit zwei verschiedenen Antikörpern

Bei dieser Methode wurden zuerst Anti Chicken Antikörper an die Dynabeads gekoppelt. Anschließend wurden an die sekundären Antikörper die zellspezifischen Antikörper gekoppelt. Die Dynabeads mit den zwei gekoppelten Antikörpern konnten nun zur Zellvereinzelung eingesetzt werden.

15.6 Zellvereinzelung mit einem Antikörper

Bei dieser Methode wurden die zellspezifischen Antikörper direkt an die Dynabeads gekoppelt und zur Zellvereinzelung eingesetzt.

16. Zellvereinzelung mit Hilfe des Laserkatapults

Eine weitere Methode der Zellvereinzelung wurde mit einem Laserkatapult (Palm, Bernried) durchgeführt, das aus einer Lasereinheit und einem inversen Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fluoreszenzausstattung bestand. Dabei wurden die standardmäßig eingesetzte Trägerfolie sowie verschiedene andere Folien auf ihre Fluoreszenzeignung getestet, als auch Schnittversuche mit dem integrierten UV-Laser (260nm) durchgeführt. Die Folien wurden mit farblosem Nagellack oder mit Tesafilm auf einem Objektträger (Dicke 0,17 mm) fixiert. Anschließend wurden die Proben aufgebracht. Zusätzlich wurden Poly-Lysin beschichtete Objektträger als Trägermaterial verwendet. Die Zellen wurden im Mikroskop betrachtet und mittels des Laserkatapults vereinzelt.

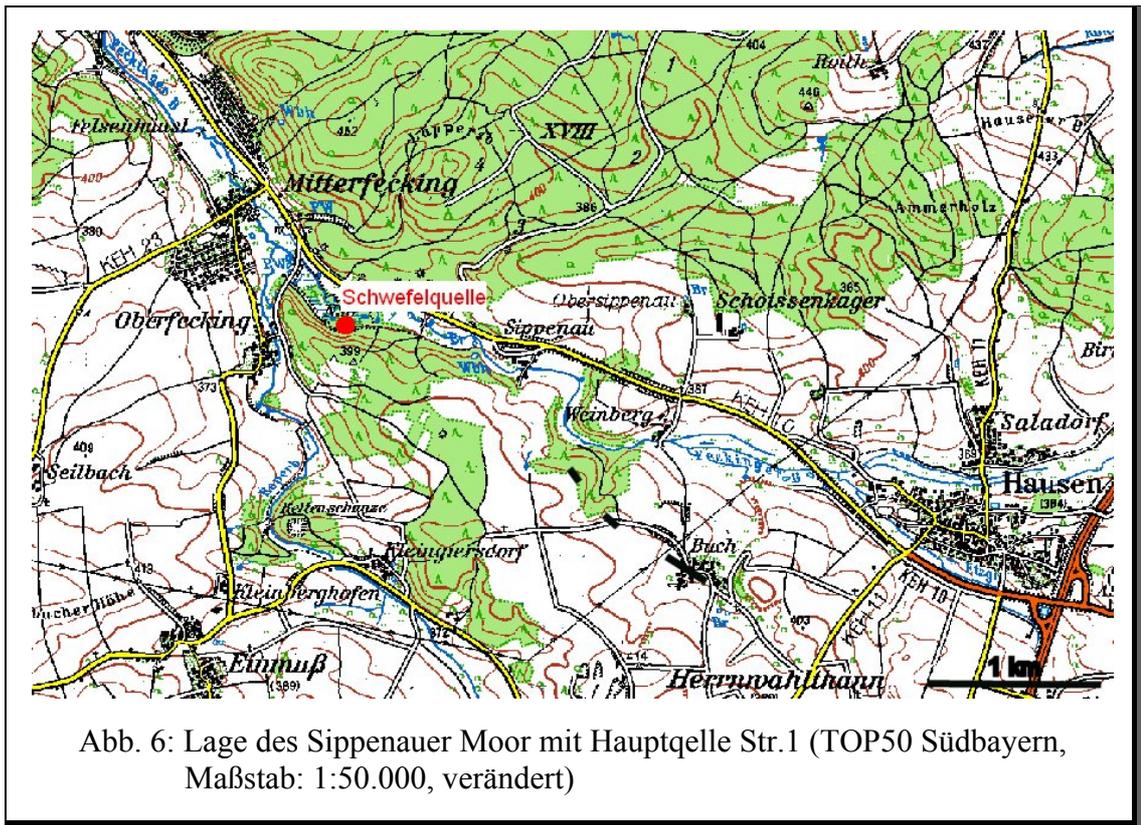
17. Zellvereinzelung mit Hilfe des Zellsorters

Die Versuche zur Zellvereinzelung mittels Zellsorter wurden am lehrstuhleigenen Durchflußcytometer MoFlo MLS (Dako-Cytomation, Hamburg) durchgeführt. Die zu vereinzelnenden Zellen wurden 30 min mit 1,5 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in eine Flüssighybridisierung (siehe 11.5.3) mit der Sip100 spezifischen FISH-Sonde eingesetzt. Anschließend wurden vom Durchflußcytometer Mikrotröpfchen erzeugt, die einzelne Zellen enthielten. Mit der Sip100-spezifischen Sonde gefärbte Zellen wurden durch UV-Licht und verschiedene Fluoreszenzfilter detektiert. Darauf wurden sie durch elektrische Spannung abgelenkt und in sterile Gefäße vereinzelt. Durch die Einstellung verschiedener Parameter (Düsengröße, Druck) wurde das Gerät auf unterschiedliche, zu vereinzelnende Zellen und Farbstoffe abgestimmt.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Verteilung der Archaeen im Sippenauer Moor

Das Sippenauer Moor befindet sich ca. 20 km südlich von Regensburg, im Landkreis Kelheim, am Feckinger Bach zwischen Sippenau und Mitterfecking (Abb. 6).



1.1 Beschreibung der Probenentnahmeorte

Die Hauptquelle (A) bildet zusammen mit den Nebenquellen (B1 und B2, Abb. 7a) einen kleinen Bachlauf, der nach ca. 5 m in den großen Quelltopf mündet. Dem Quelltopf schließt sich ein kleiner Wasserfall an, von dem der „Mineralbach“ mit einer Breite von ca. 0,5-1,5 m ausgeht. Im Bereich des Mineralbachs sind mehrere kleine Wasserfälle und große Steine zu finden, an denen das sulfidische Quellwasser mit Sauerstoff angereichert wird. Dort bilden sich an Steinen, Ästen, dem Bachbett und anderem festen Material mikrobielle Beläge und Filamente, die meist weiß, weiß-grün, weiß-grau oder weiß-braun erscheinen. Oft flotierten Streamer (Büschel von fädigen Mikroorganismen) und Filamente von bis zu 30 cm Länge (Abb. 7b) im gesamten Bereich des Mineralbaches. Trotz der relativ konstanten chemischen

und physikalischen Parameter des Quellwassers (Tab. 23) zeigte die Biomasseproduktion im Bereich des Mineralbaches große Schwankungen. Die Beschaffenheit und Quantität der mikrobiellen Matten, Filamente und Algen war stark von jahreszeitlichen und klimatischen Änderungen abhängig. Die Probennahme von unterschiedlichen mikrobiellen Filamenten, Biofilmen, Matten, Sedimenten und Oberflächenwasser (Abb. 7 und 8, Probenentnahmeorte Str. 1 und Str.6) erfolgte im Bereich der Hauptquelle bis etwa 200 m stromabwärts des Bachlaufs des Sippenauer Moors. Der Bereich der Probenahme ist in Abb. 9 rot dargestellt.

<i>Parameter</i>	<i>Hauptquelle Str.1</i>	<i>Probenentnahmestelle Str.6</i>
Temperatur (C°)	10-11°C	8,9°C (Winter)-12,6°C (Sommer)
pH	6-6,5	6-6,5
S ²⁻ (mg/l)	0,5-1,0 mg/l	0,1-0,2 mg/l
O ₂ (mg/l)	1,4 mg/l	2,9 mg/l
Leitfähigkeit (µS/cm)	536 µS/cm	520 µS/cm
Strömungsgeschwindigkeit (m/s)	0,12-0,28 m/s	0,06-0,16 m/s

Tab. 23: Chemische und physikalische Parameter der Probenentnahmestellen Str.1 und Str.6

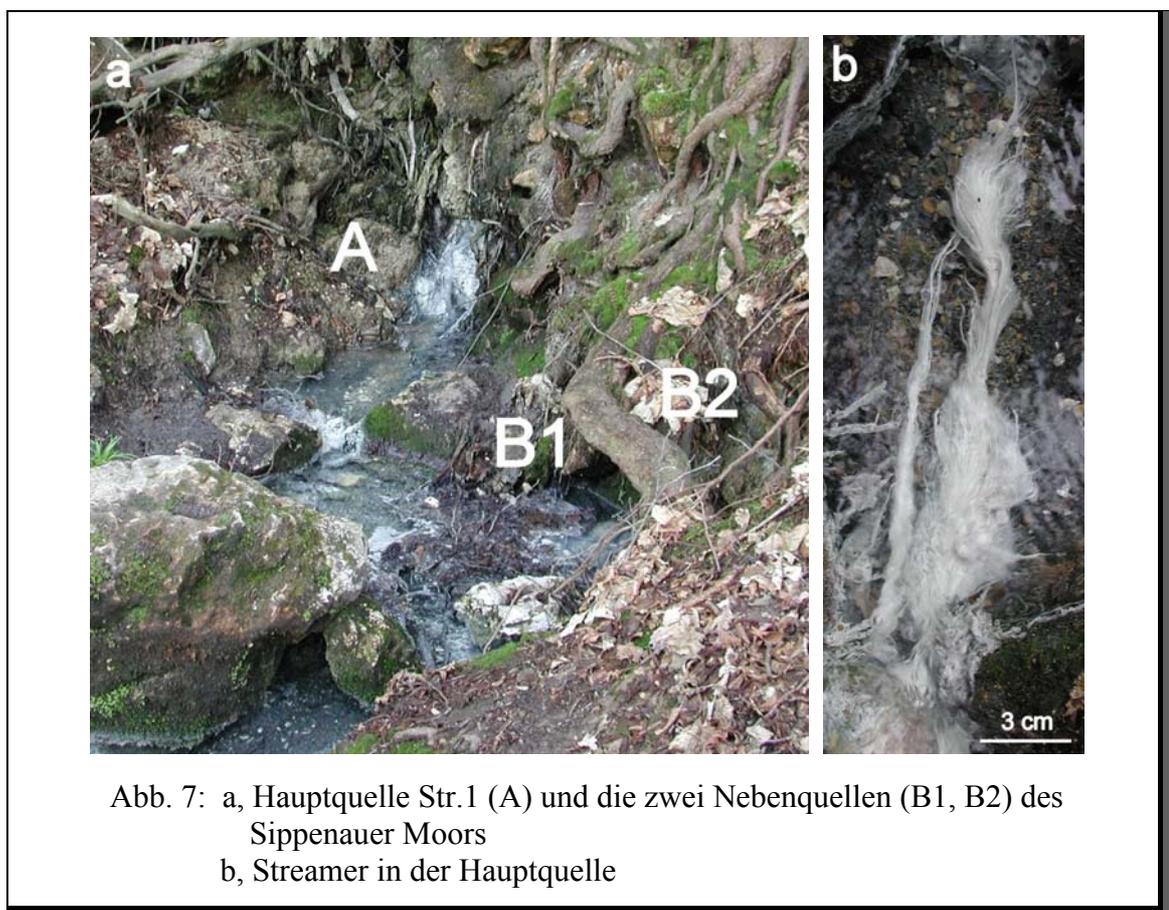




Abb. 8: Probenentnahmestelle Str.6

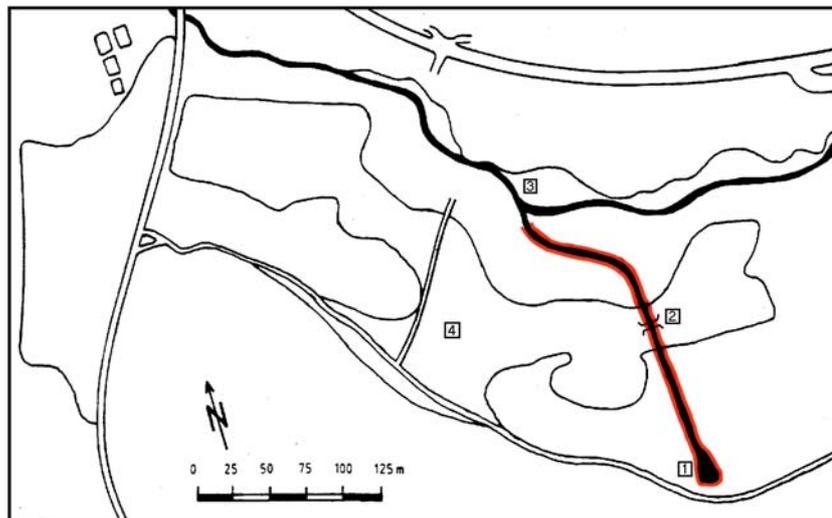


Abb. 9: Übersichtszeichnung des Sippenauer Moors (nach Warneke, 1992);

1 = Quellbereich mit sulfidhaltigen Quellen (Str.1)

2 = Holzbrücke bei Probenentnahmeort Str.6

3 = Zusammenfluß Mineralbach und Feckinger Bach

4 = Freie Moorfläche

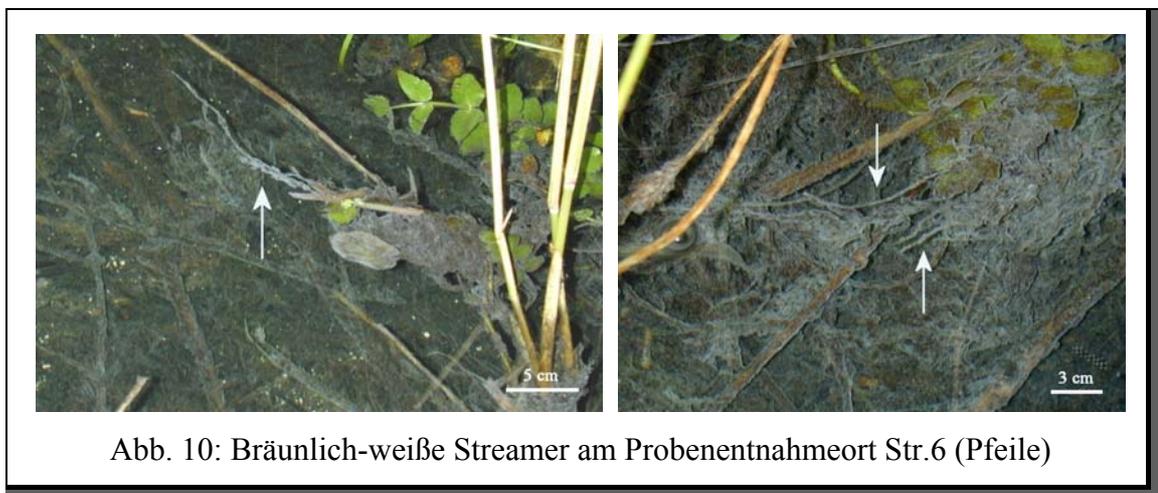
Der Bereich der Probenentnahme ist rot gekennzeichnet

1.2 Mikrobielle Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt

Über einen längeren Zeitraum wurden im Sippenauer Moor eine Vielzahl makroskopisch unterscheidbarer Beläge, Filamente, Algen, Streamer, sowie Sediment- und Wasserproben mittels FISH auf ihren Archaeengehalt überprüft. Dabei wurden zwei, mit bloßem Auge unterscheidbare, mikrobielle Zellverbände entdeckt.

1.2.1 Weißlich- oder bräunlich-grüne Streamer

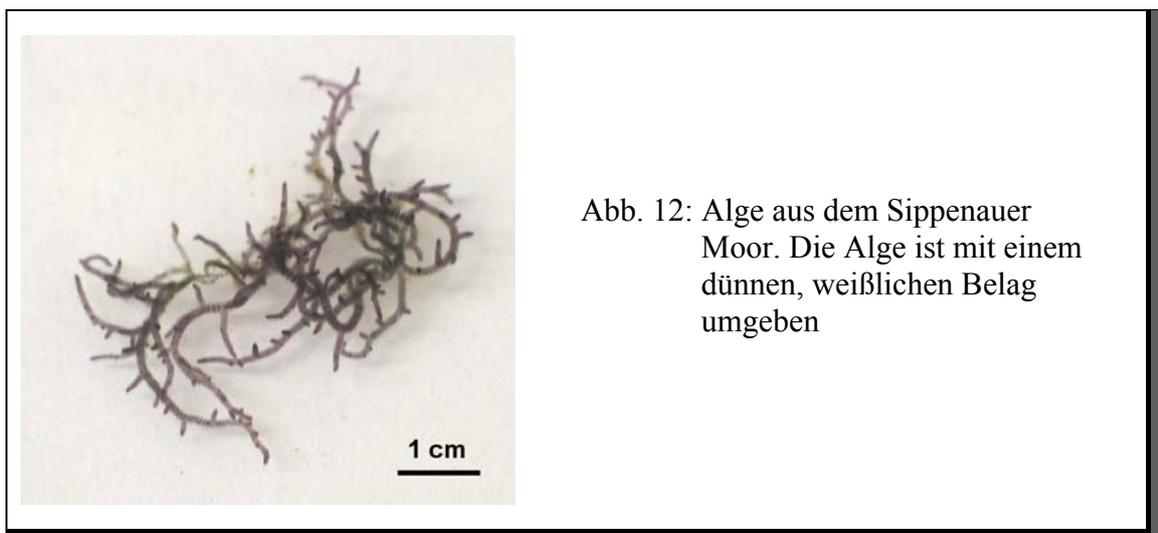
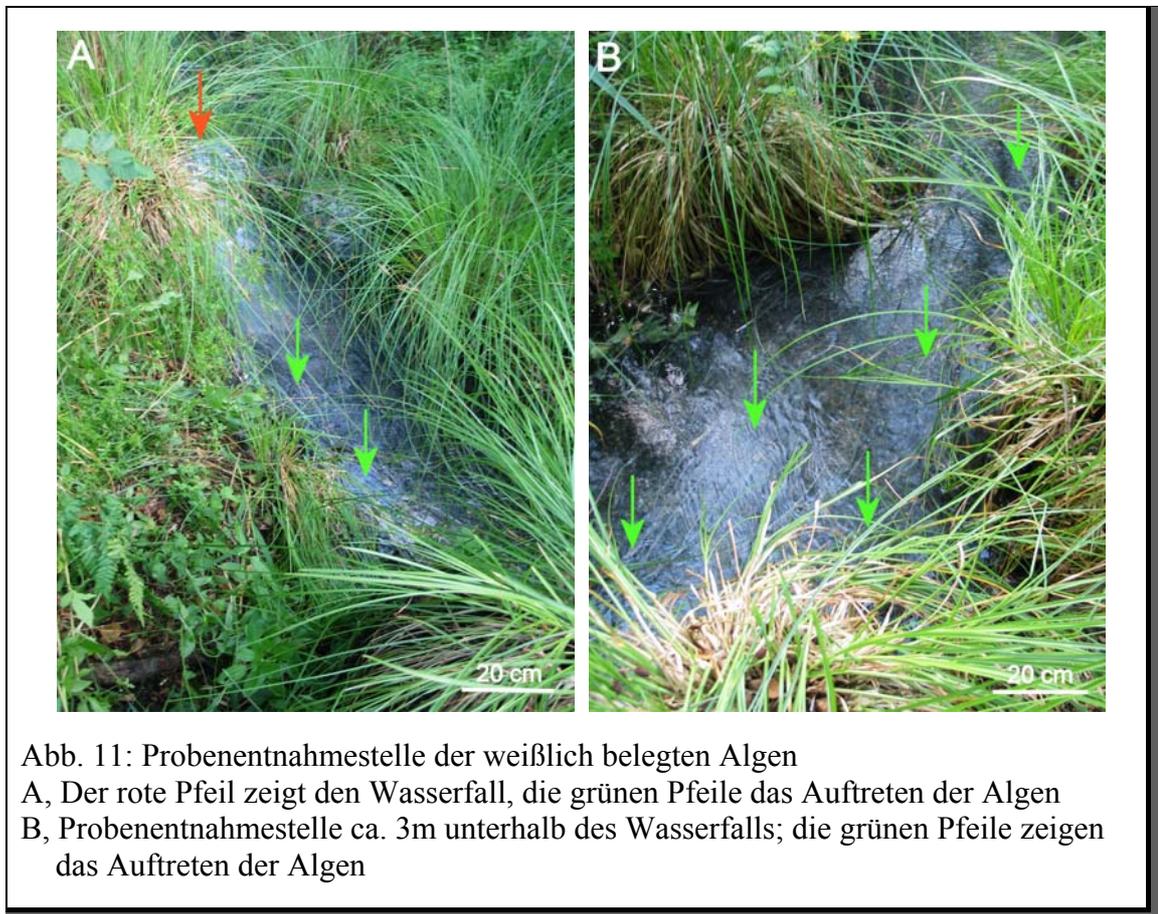
Am Probenentnahmeort Str.6 konnten weißlich- oder bräunlich-grüne Streamer identifiziert werden, die an festen Oberflächen (z.B. Ästen, Algen, Schilf oder Steinen) angeheftet waren und frei im Bachlauf flotierten (Abb. 10). Die Länge dieser Strukturen betrug bis zu 30 cm. Diese Streamer konnten über einen Zeitraum von sieben Jahren am Probenentnahmeort Str.6 nachgewiesen werden, wobei ihre Anzahl großen Schwankungen unterlag. Innerhalb dieser Strukturen wurden vereinzelt Ansammlungen von bis zu 100 stäbchenförmigen Archaeen gefunden, die in einem charakteristischen 90°-Winkel an Bakterien angeheftet waren (Einleitung, Abb. 5).



1.2.2 Weißlich-grünlich gefärbte Algen

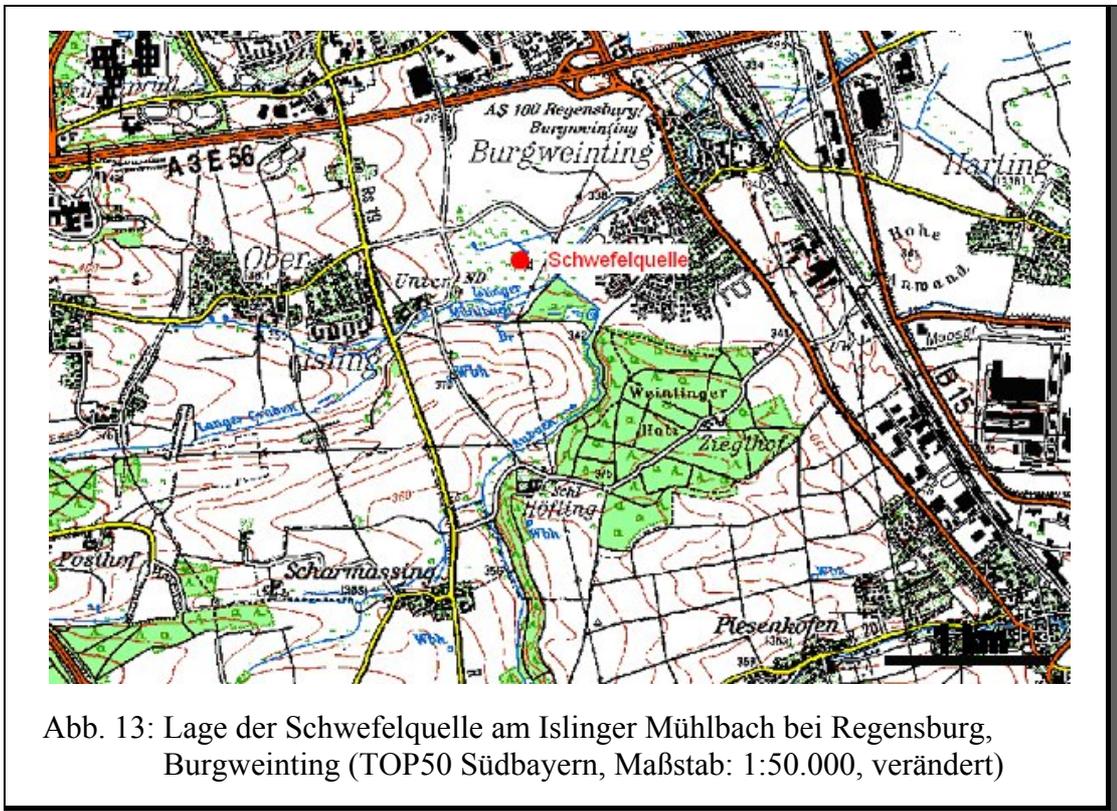
Etwa 10 m oberhalb des Probenentnahmeortes Str.6, direkt unterhalb eines kleinen Wasserfalls (Abb. 11), wurden dunkelgrün gefärbte Algen entdeckt, die komplett mit einem weißlichen Belag überzogen waren (Abb. 12). Die Algen waren überwiegend an Ästen oder Steinen am Grund des Mineralbachs angeheftet und flotierten frei in der Strömung. Das Auftreten der Algen war auf den späten Herbst bis in den Frühling hinein beschränkt. Von Mai bis Oktober konnten so gut wie keine Algen nachgewiesen werden. Innerhalb dieser

Strukturen wurden, ebenso wie in den Streamern vereinzelt Ansammlungen von bis zu 100 stäbchenförmigen Archaeen gefunden, die in einem charakteristischen 90°-Winkel an Bakterien angeheftet waren (Abb. 5).



2. Untersuchung zur Verteilung von Archaeen im Islinger Mühlbach

Die Schwefelquelle am Islinger Mühlbach liegt südlich von Regensburg, zwischen dem Stadtteil Burgweinting und Oberisling (Abb. 13).



2.1 Beschreibung der Probenentnahmeorte

Bei der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach tritt das Quellwasser aus einer unter Bäumen gelegenen, gebohrten Quelle aus, die mit einem stabilisierenden Eisenrohr (\varnothing ca. 22 cm) gefasst ist (Abb. 14). Zusammen mit einer anderen Quelle bildet sie zunächst den Graben in der Au, der nach ca. 400 m in den Islinger Mühlbach mündet. Im gesamten Bereich des Islinger Mühlbachs herrschen relativ konstante chemische und physikalische Parameter (Tab. 24). Bereits kurz nach der Austrittsstelle des Baches sind verschiedene mikrobielle Matten (überwiegend grau-weiß bzw. grün, teils auch rosa) sichtbar. In einem Bereich von ca. 10 m entlang des Bachlaufes sind mikrobielle Beläge und kleine Streamer mit perlenartigen Verdickungen zu erkennen. Im Bereich von etwa 8-10 m unter der Quelle war der Grund des Bachlaufes manchmal fast komplett mit weißen Belägen überzogen. Etwa 10 m unterhalb der Quelle, nach einem kleinen

Wasserfall, nahmen die weißlich gefärbten Filamente ab, und es zeigten sich bräunlich-grüne Streamer (Abb. 15).

<i>Parameter</i>	<i>Quelle Islinger Mühlbach</i>
Temperatur (C°)	10-11°C
pH	6-6,5
S ²⁻ (mg/l)	~0,1 mg/l
O ₂ (mg/l)	1,31 mg/l
Leitfähigkeit (mS/cm)	601 µS/cm

Tab. 24: chemische und physikalische Parameter des Islinger Mühlbachs



Abb. 14: Quelle des Aubachs; der Pfeil zeigt den Quellaustritt an

2.2 Mikrobielle Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt

2.2.1 Bräunlich-grüne Streamer

Die bräunlich-grünen Streamer florierten frei im Bachlauf (Abb.15). Sie waren überwiegend an kleinen Ästen, Schilf oder Laub befestigt. Diese Streamer wurden im Laufe von sieben Jahren regelmäßig nachgewiesen, wobei ihre Färbung und mikrobielle Zusammensetzung starken Schwankungen unterlag. Innerhalb dieser Streamer wurden vereinzelt stäbchenförmige Archaeen nachgewiesen, die in einem charakteristischen 90°-Winkel an Bakterien angeheftet waren (Koch, 2001). Neben diesen stäbchenförmigen Archaeen konnten

bisweilen auch archaeele Kokken und rechteckige stäbchenförmige Archaeen gefunden werden. Letztere bildeten teilweise Filamente und Bündel.

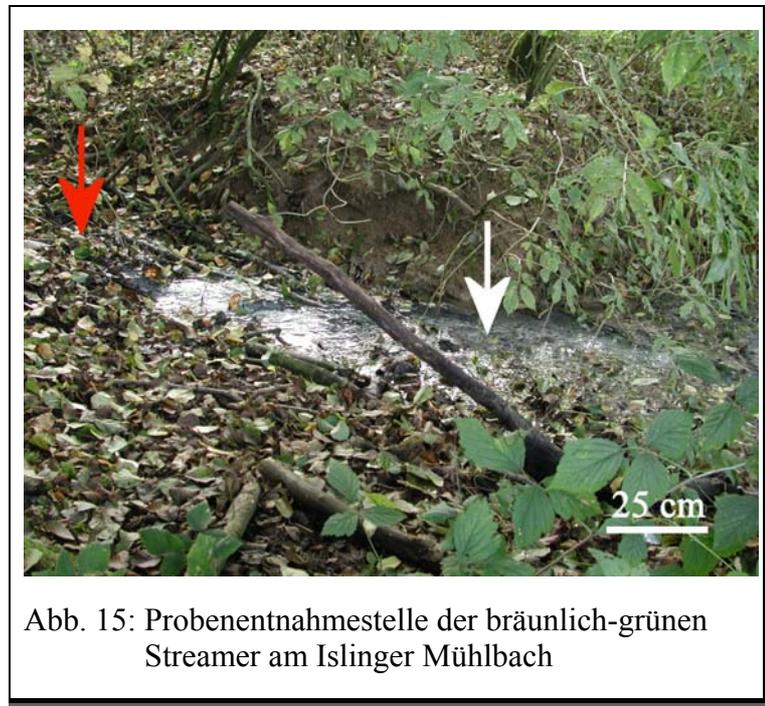


Abb. 15: Probenentnahmestelle der bräunlich-grünen Streamer am Islinger Mühlbach

2.2.2 Weiße Biofilmmatten

Im Bereich von ca. 6-10 m unterhalb des Bohrlochs befanden sich am Grund des Bachlaufs zeitweise weiße Biofilmmatten, die wie ein dichter Schleier Sediment und abgesunkene Blätter überdeckten (Abb. 16). Diese Matten waren reinweiß und wurden im Laufe von vier Jahren nur sehr vereinzelt beobachtet. In diesen Matten wurden rechteckige, stäbchenförmige Archaeen nachgewiesen, die Filamente oder Bündel bilden konnten. Vereinzelt wurden auch archaeele Kokken gefunden.



Abb. 16: Weißlich gefärbte Biofilmmatten im Islinger Mühlbach

3. FISH-Untersuchungen der neuen crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft

Mit der neuen crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft wurden mit verschiedenen Sonden und Sondengemischen FISH-Untersuchungen durchgeführt. Im Hinblick auf spätere PCR-Analysen sollte getestet werden, mit welchen Sonden die *Crenarchaeota* ein positives Hybridisierungssignal liefern. Bei einem positiven FISH-Signal sollte die 16S rRNA an derselben Position auch für PCR-Primer zugänglich und zu diesen komplementär sein. Die FISH-Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt (Tab. 25).

<i>Eingesetzte Sonden</i>	<i>Hybridisierungssignal der stäbchenförmigen Organismen</i>
ARCHMix	+++
Arch 344	-
Arch 915	+++
Arch 1060	++
Cren 499	+
Cren 457R	++
Eury 498	-

Tab. 25: Bindungseigenschaften der eingesetzten FISH-Sonden:
 - = kein Hybridisierungssignal; + = schwaches Hybridisierungssignal;
 ++ = gutes Hybridisierungssignal; +++ = sehr gutes Hybridisierungssignal

Insgesamt wurde mit zwei archaeellen und zwei crenarchaeellen Sonden ein positives FISH-Signal erhalten.

4. Phylogenetische Untersuchungen

Um das Vorhandensein von *Crenarchaeota* im Sippenauer Moor über eine FISH-unabhängige Methode zu bestätigen, wurden 16S rDNA-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden mikrobielle Strukturen verwendet, die die crenarchaeelle/bakterielle Lebensgemeinschaft in einem höheren Anteil enthielten (s. II.1.2).

4.1 Phylogenetische Untersuchungen an weißlich-grünen Streamern

Phylogenetische Untersuchungen wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit (Koch, 2001) an den weißlich-grünen Streamern mit archaeellen bzw. crenarchaeellen Primerkombinationen durchgeführt. Die erhaltenen crenarchaeellen Klonsequenzen konnten alle innerhalb der „Marine Group I“ bzw. der „Freshwater and Marine Benthic Group“

(Veteriani et al., 1998, 1999) eingeordnet werden (Abb. 17). Die Sequenz Str.6_6/K12 trat bei allen verwendeten Primerkombinationen mit einem Anteil von 27-51% als dominierende Sequenz auf.

4.2 Phylogenetische Untersuchungen an weißlich bewachsenen Algen

Weißlich bewachsene Algen stellten eine weitere Struktur innerhalb des Biotops Sippenauer Moor dar, die in höherem Ausmaß die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft enthielt (FISH-Untersuchungen). Phylogenetische Untersuchungen wurden mit den Primern 8aF-1406uR und dem PCR-Programm Standard 60 (Tab. 16) durchgeführt. Eine anschließende Nested-PCR wurde mit dem crenarchaeellen Primer 28aF, dem archaeellen Primer 1119aR und dem PCR-Programm Moor 50 (Tab. 17) durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gereinigt (s. II.9.2.1) und in die Klonierung eingesetzt.

Insgesamt wurden 85 Klone analysiert. Über ARDRA wurden 13 verschiedene Restriktionsmuster (Tab. 26) erhalten. Die fünf Inserts der häufigsten Muster wurden sequenziert. Alle erhaltenen Klonsequenzen konnten den *Crenarchaeota* zugeordnet werden (Abb. 17).

<i>Klonanzahl</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
38	52%	Str.6_A46
11	15%	Str.6_A52
8	11%	Str.6_A1
6	8%	Str.6_A4
2	2%	Str.6_A6
8 x je 1	Je ~1%	Nicht sequenziert

Tab. 26: Daten der Klonierung der Nested-PCR 28aF-1119aR

Bei FISH-Untersuchungen lieferten die *Crenarchaeota*-Zellen deutliche Hybridisierungssignale mit den Sonden 457R, Arch 915 und Arch 1060 (Tab. 25). Die Bindung der Sonden an die 16S rRNA funktioniert also. Aus diesem Grund sollte zusätzlich mit den entsprechenden Primern eine PCR durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde der vorhandene Primer Cren457R (Schleper et al., 1997) in einen Vorwärtsprimer (Cren457F; Tab. 15) umgeschrieben.

Die Amplifikation der archaeellen 16S rRNA erfolgte über den archaeellen Primer 8aF und den universellen Primer 1406uR, mit dem PCR-Programm Moor 50 (Tab. 17). Die Nested-PCR wurde mit dem Vorwärtsprimer Cren457F und den Rückwärtsprimern Arch934R bzw.

Arch1060R durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert. Von der Klonierung Cren457F-934R wurden 72 Klone analysiert. Über ARDRA wurden 12 verschiedene Restriktionsmuster erhalten (Tab. 27). Die Inserts der zwei am häufigsten vorliegenden Muster wurden sequenziert. Die erhaltenen Klonsequenzen konnten innerhalb der *Crenarchaeota* eingeordnet werden (Abb. 17).

<i>Klonanzahl</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
31	66%	934_K8
3	6%	934_K4
3 x je 2	Je ~4%	Nicht sequenziert
7 x je 1	Je ~2%	Nicht sequenziert

Tab. 27: Daten der Klonierung der Nested-PCR 457F-934R

Vom Klonierungsansatz Cren457F-1060R wurden ebenfalls 72 Klone analysiert. Über ARDRA wurden 16 verschiedene Restriktionsmuster erhalten (Tab. 28). Die Inserts der drei häufigsten Muster wurden sequenziert. Die drei sequenzierten Klone konnten innerhalb der *Crenarchaeota* eingeordnet werden (Abb. 17).

<i>Klonanzahl</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
26	43%	1060_K9
14	2%	1060_K32
5	8%	1060_K6
3 x je 2	Je ~3%	Nicht sequenziert
10 x je 1	Je ~2%	Nicht sequenziert

Tab. 28: Daten der Klonierung der Nested-PCR 457F-1060R

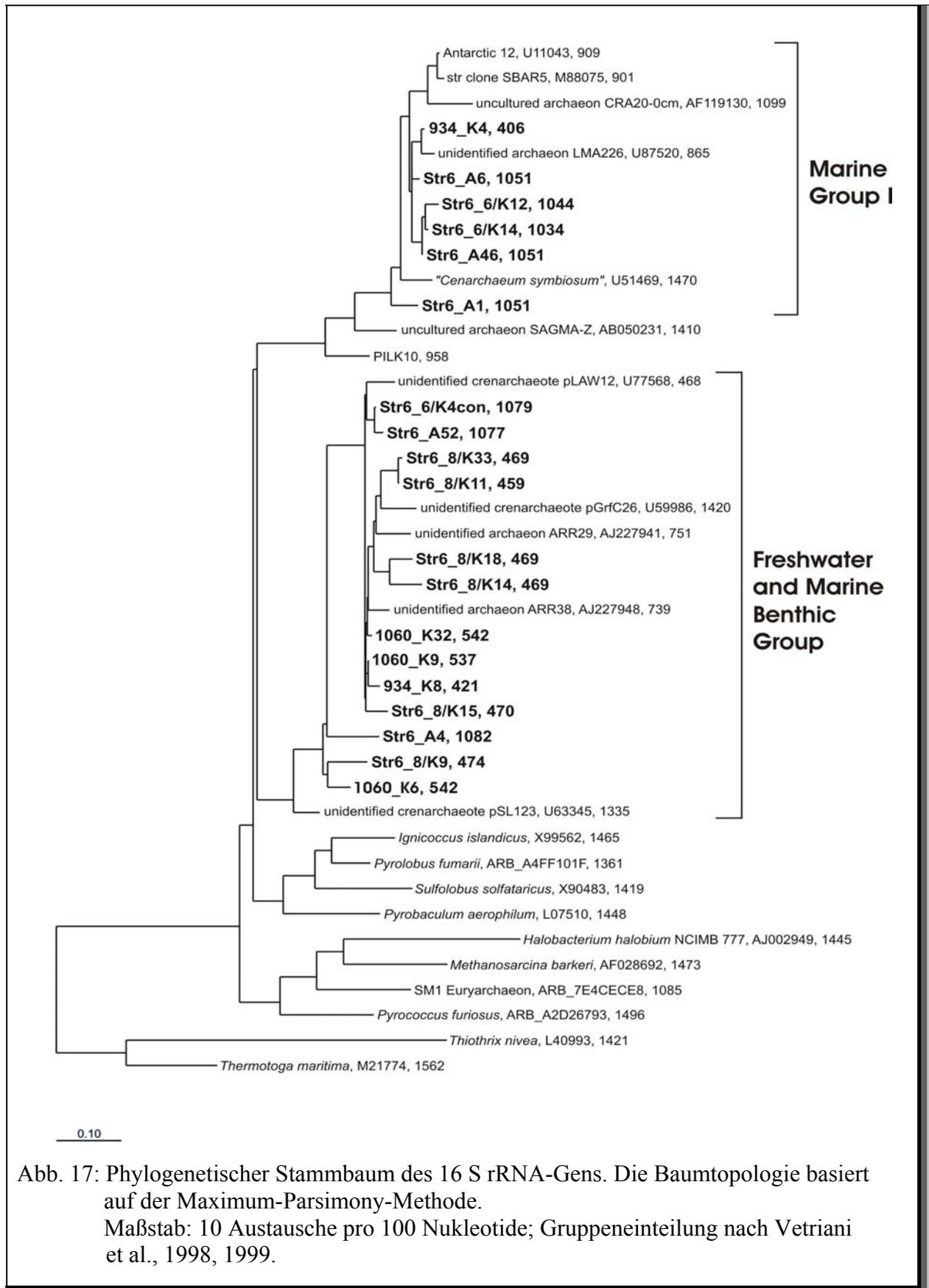


Abb. 17: Phylogenetischer Stammbaum des 16 S rRNA-Gens. Die Baumtopologie basiert auf der Maximum-Parsimony-Methode.
 Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide; Gruppeneinteilung nach Vetriani et al., 1998, 1999.

4.3 Sondenkonstruktion basierend auf den erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen

Basierend auf den erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der „Probe-Design“-Funktion des ARB-Programms und der Sondenbindestudien von *E. coli* und *Metallosphaera sedula* (s. II.11.2) neue FISH-Sonden konstruiert. Für die Klonsequenzen Str.6_6/K12, Str.6_6/K14 und Str.6_A46 wurden die Sonden Cren231, Cren487, Cren625 und Cren633 (Tab. 21) konstruiert, für die Klonsequenzen Str.6_6/K4con die Sonden Cren324 und Cren572 (Tab. 21). Die Formamid-Konzentration wurde für jeden Ansatz mit der Formel nach Lathe (II.11.5.1) bestimmt und empirisch ermittelt. Mit den neuen Sonden wurden FISH-Untersuchungen mit Originalproben von Str.6 mit unterschiedlichen Formamid-, Salz-, und Sondenkonzentrationen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der ARCH-Mix eingesetzt. Bei Verwendung des ARCH-Mixes wurden starke Hybridisierungssignale mit den stäbchenförmigen *Crenarchaeota* erzielt. Jedoch konnte mit keiner der neu konstruierten Sonden bei den morphologisch eindeutig zuzuordnenden *Crenarchaeota* oder anderen Zellen in den Originalproben ein positives Hybridisierungssignal erhalten werden. Auch die Verwendung von Sondenmischen aus bis zu drei der neuen Sonden brachte keine Verbesserung.

5. Anreicherungsversuche für die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft

Im Biotop Sippenauer Moor ist die Anzahl der crenarchaeell/bakteriellen Gemeinschaft stark variabel und von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig. Außerdem kann die spezielle Lebensgemeinschaft noch nicht in stabilen Laborkulturen gehalten werden. Aus diesem Grund war es von großem Interesse ein *in-situ* Kultivierungssystem zu entwickeln, um größere Mengen dieser spezifischen Population in einem reproduzierbaren Verfahren zu erhalten. Hierzu wurden mit unterschiedlichen Techniken Anreicherungs- und Kultivierungsversuche durchgeführt.

5.1 Verschiedene Anheftungsmaterialien

In Anlehnung an die erfolgreichen *in-situ* Kultivierungsversuche mittels Polyethylenetzen (Moissl et al., 2003) wurden unterschiedliche Materialien auf ihre Eignung überprüft. Zum Einsatz kamen Schnüre unterschiedlicher Zusammensetzung und Dicke (Polyamidschnüre, Hanfschnüre), sowie Nylonsehnen in verschiedenen Dicken (0,25 mm; 0,45 mm; 0,70 mm),

Filterpapiere (Cellulose-Filter, Whatman 3M Papier), Natur-Wollfäden, Natur-Bast, Polyethylenetzstückchen und Schilfblätter aus dem Sippenauer Moor. Vom Filterpapier wurden ca. 2-3 cm breite Streifen von etwa 10-20 cm Länge abgeschnitten, die am freien Ende mehrfach eingeschnitten wurden, um dünne, in der Strömung flotierende Filamente zu simulieren. Schilfblätter wurden benutzt, da häufig weißliche Biofilme an im Wasser flotierenden Blättern zu finden waren. Alle verwendeten Materialien wurden an Schaschlikspießen aus Holz befestigt und frei flotierend zwischen den verschiedenen gefärbten Filamenten und Streamern in unterschiedlichen Wassertiefen im Mineralbach des Sippenauer Moores überwiegend im Bereich des Probenentnahmeortes Str.6 inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben vom freien Ende abgeschnitten (ca. 2-3 cm Länge), in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt, sofort mit 3% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und gekühlt (4-10°C) ins Labor transportiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Dentalschüttlers schonend von den Anheftungsmaterialien gelöst und durch FISH mit Archaeen- (ARCH-Mix; s. II.11.1) und Bakterien-spezifischen (EUB-Mix; s. II.11.1) Sonden analysiert.

Keines der verwendeten Systeme führte zu der gewünschten Anheftung und konsequenten Kultivierung der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft.

5.2 Trichtersysteme

Weitere Anreicherungsversuche wurden mit neu konzipierten Transmembran-Glastrichtern durchgeführt. Diese wurden von der Glasbläserei der Universität Regensburg angefertigt. Ein Glasrohr (\varnothing 4,5 cm, Länge: ca. 10 cm) wurde auf beiden Seiten mit Porzellanfritten mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen (4, 20 oder 30 μm) verschlossen (Abb. 18). In der Rohrmitte wurde ein mit einem Gummistopfen und Alukappe verschließbarer Glashals angeschmolzen. Der Gummistopfen ermöglichte die Beimpfung mit Probenmaterial oder die Probenentnahme. An einer Breitseite des Rohres wurde ein konisch zulaufender Glastrichter mit einer Öffnungsweite von 12 cm und einer Länge von 14,5 cm angeschmolzen. Die Transmembrantrichter wurden 20 min bei 121°C sterilisiert und direkt vor Ort mit Probenmaterial beimpft.



Als Animpfmateriale wurden weißlich-braune oder weißlich-grüne Streamer bzw. weißlich bewachsene Algen verwendet, die die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft in größerer Anzahl enthielten. Anschließend wurde die Glaskammer mit sterilem Moorwasser aufgefüllt. In einem weiteren Ansatz wurde die Glaskammer mit einer Sip100-Suspension (s. III.10.4) in unterschiedlichen Konzentrationen ($\sim 10^4$ - 10^7 Zellen/ml) sowie unterschiedlichen Substraten (Carrageenan, Alginat) in verschiedenen Kombinationen zugesetzt. Das beimpfte Kultivierungssystem wurde mit der Öffnung gegen die Strömungsrichtung am Str.6 Standort inkubiert. Zu bestimmten Zeitabständen wurde jeweils eine Probe entnommen und nach Fixierung mit 3% Formaldehyd mittels FISH (s. II.11.5.1) analysiert.

Es zeigte sich, dass die Transmembran-Glastrichter für *in-situ* Untersuchungen geeignet sind. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte allerdings bis jetzt kein eindeutiges Wachstum der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft in diesen Systemen beobachtet werden, so dass die Versuche nach etwa einem Monat beendet wurden.

5.3 Entwicklung eines neuen *in-situ* Kultivierungssystems („ISKS“)

Für die direkte *in-situ* Kultivierung im Biotop Sippenauer Moor sollte ein System entwickelt werden, das einfach herzustellen ist, bei dem leicht Substratvariationen möglich sind, und das zu bestimmten Zeiten eine einfache Probennahme erlaubt. Außerdem sollte es direkt neben oder in den Streamern bzw. Algen im Bachlauf inkubiert werden können. Recherchen zu der teilweise an der Lebensgemeinschaft beteiligten Alge (s. III.13) ergaben, dass von dieser Alge verschleimende Galactane wie Agar und Carrageenan ausgeschieden werden. Diese und andere Biopolymere sollten auch in den *in-situ* Kultivierungssystemen („ISKS“) Anwendung finden. Die ISKS sollten außerdem ein geeignetes Befestigungssystem enthalten, mit dem sie direkt im Bachlauf befestigt werden können.

5.3.1 Formenbau

Für die Herstellung des neuen ISKS mussten zweiteilige Negativ-Formen erstellt werden (Abb. 19). Die Formen wurden aus zwei verschiedenen 2-Komponenten Epoxidharzen in Verbindung mit Glasfasergewebe laminiert. Nach dem Aushärten der Harze nach ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur waren die Formen fest und lösungsmittelbeständig. Durch integrierte Paßstifte und Verschraubungen konnten die Formhälften genau und fest miteinander verbunden werden. Die Kanäle für die Nylonschnüre wurden nachträglich eingefräst. Die Formen erlauben die Herstellung von je vier ISKS mit 5 bzw. 10 cm Länge und 0,8 cm Breite.



Abb. 19: Zweiteilige Form des neuen ISKS mit den Passstiften und Verschraubungselementen

5.3.2 Austesten der Substratkonzentrationen

Zu Anfang sollten die Substrate Agar, Carrageenan (ι , κ , λ) und Na-Alginat mit Konzentrationen von je 0,6 % eingesetzt werden. Vorversuche zeigten jedoch, dass unter diesen Bedingungen keine Polymerisation stattfand, da womöglich die Substrate untereinander ihre Vernetzung verhinderten. Nachfolgende Versuche wurden mit 1,8 % Agar und je 0,1 % der Carrageenane und Na-Alginat durchgeführt. Dabei erreichten die Systeme eine ausreichende Festigkeit für die Inkubation im Biotop. Die Konzentration der Carrageenane und des Na-Alginats wurde letztlich auf 0,15 % erhöht und als Standard weiterverwendet. Bei einigen Versuchen wurde die Agar-Konzentration auf bis zu 4% erhöht.

5.3.3 Herstellen des neuen *in-situ* Kultivierungssystems

Die beiden Formhälften so wie alle Verschraubungsteile und Passstifte wurden zur Sterilisation 30 min in 70% Ethanol eingelegt. Die Nylonfäden (je ca. 70 cm Länge) wurden in filtriertem Moorwasser für 40 min, die in filtriertem Moorwasser gelöste Polymermischung für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Formen wurden unter der Sterilbank getrocknet und mit den Verschraubungsteilen und Passstiften verschlossen. Die Integration der Nylonfäden in die Formen erfolgte ebenfalls unter der Sterilbank. Um dem Polymergemisch am Nylonfaden einen guten Halt zu geben, wurden in den Nylonfaden nachträglich alle 0,5-1 cm Knoten eingefügt. Nach dem Autoklavieren wurde die Polymermischung auf ca. 60°C abgekühlt und danach in die Formen gegossen. Nach 30 min bei Raumtemperatur konnten die Formen geöffnet werden. Die ISKS wurden in sterilem Moorwasser bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt (Abb.20).

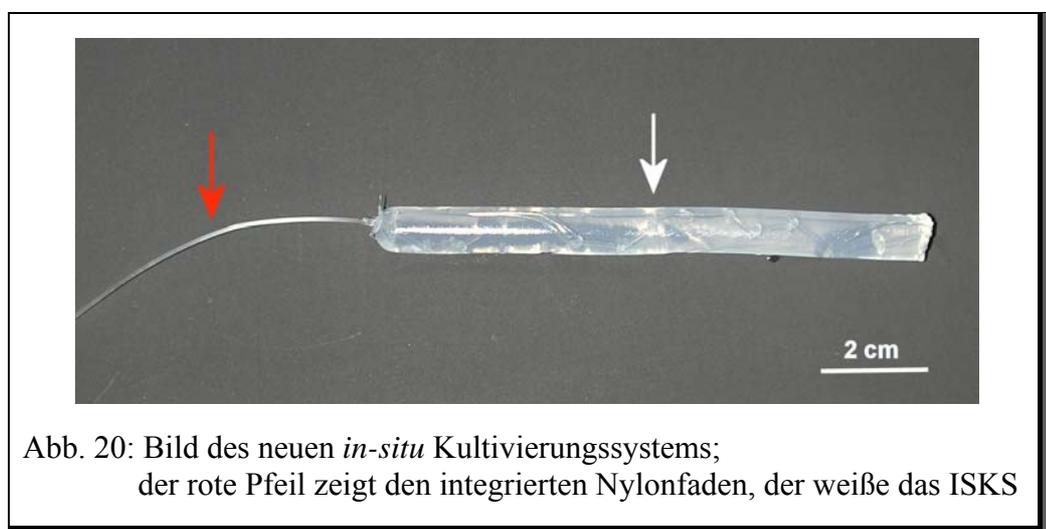
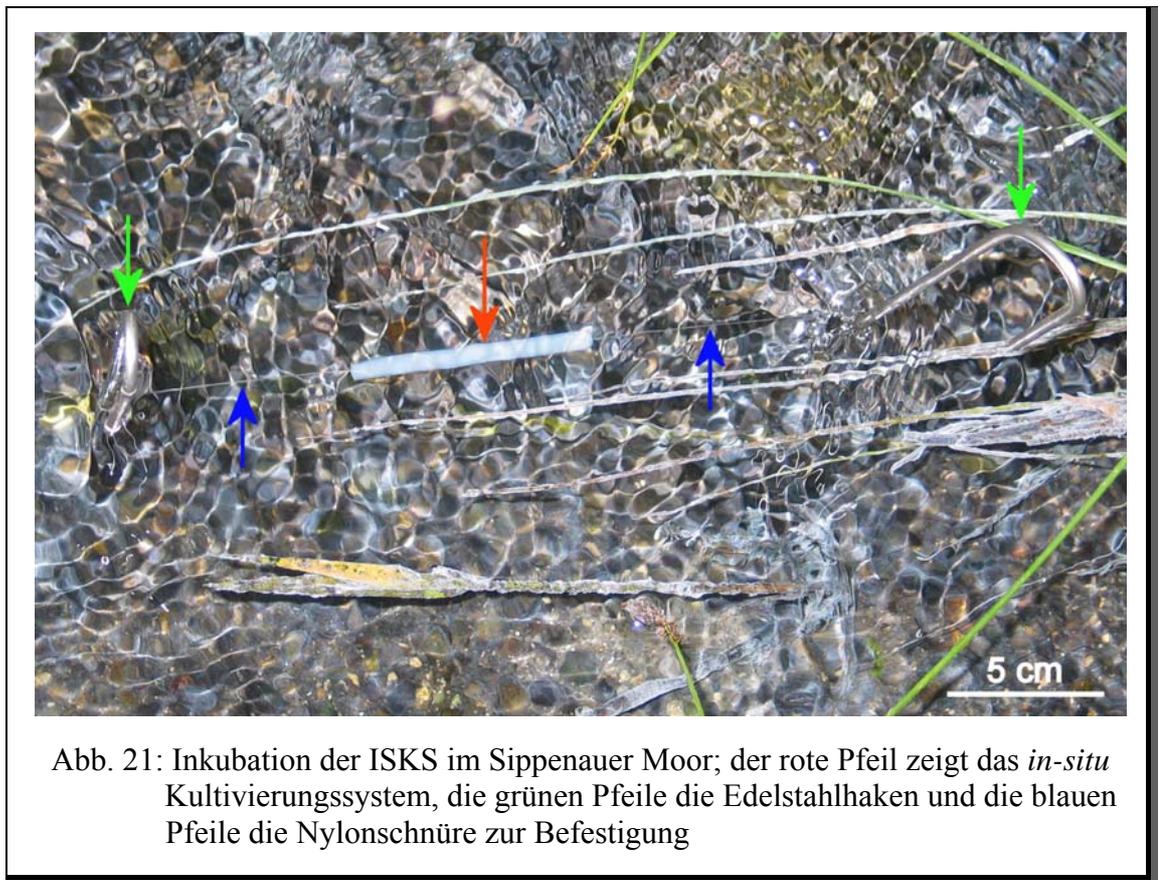


Abb. 20: Bild des neuen *in-situ* Kultivierungssystems;
der rote Pfeil zeigt den integrierten Nylonfaden, der weiße das ISKS

5.3.4 Inkubation im Biotop

Die ISKS wurden an den integrierten Nylonschnüren über Edelstahlhaken (Technische Werkstatt, Universität Regensburg) frei flotierend direkt zwischen den Streamern und Algenbüscheln im Mineralbach des Sippenauer Moors inkubiert (Abb. 21). Die Systeme konnten direkt über einen Edelstahlhaken im Bachlauf befestigt werden, so dass sie frei in der Strömung flotierten oder sie wurden zwischen zwei Haken eingespannt, wodurch die Höhe der Systeme in der Wassersäule reguliert werden konnte.



5.3.5 Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitung für FISH

Nach Inkubation der ISKS im Biotop wurden etwa alle zwei Tage Stücke von 1-1,5 cm Länge abgeschnitten, mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und unter gekühlten Bedingungen ins Labor transportiert. Zur Abtrennung der Organismen wurde die Oberfläche der Stückchen mit einer sterilen Rasierklinge abgeschabt oder das unbewachsene Innere der Systeme mit einem sterilen Röhrchen (Durchmesser 6 mm) ausgestochen und verworfen. Dadurch wurde der Agar-Anteil reduziert, um dessen negativen Einfluß bei der nachfolgenden FISH zu

vermindern. Die Probe wurde vorsichtig mit einer sterilen Pinzette oder dem Dentalschüttler zerkleinert, zentrifugiert und ein- bis zweimal mit 1x PBS gewaschen. Je nach Konzentration des Bewuchses wurden 5-25 µl der Suspension auf die Staining-Objektträger aufgetragen und eingetrocknet.

5.3.6 Der Lebenszyklus der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft

Mit Hilfe des künstlichen, stabförmigen *in-situ* Anheftungsmaterials ist es erstmals gelungen den Lebenszyklus und die zeitliche Abfolge der Entstehung der spezifischen crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft aufzuklären.

Nach Inkubation dieser künstlichen Anheftungsmaterialien im Mineralbach des Sippenauer Moors zeigte sich nach einer Woche ein weißlicher Organismen-Belag. Die FISH-Untersuchungen ergaben, dass es sich dabei um filamentöse Bakterien (*Thiothrix sp.*) handelt (Abb. 22: A; grüne Pfeile), die sich mit ihrem distalen „holdfast material“ an die künstlichen Anheftungsmaterialien anlagerten. Nach ca. 2 Wochen hefteten sich die ersten *Cytophagales*-Vertreter (s. III.10.4; Abb. 22: B; weiße Pfeile) im 90°-Winkel an die filamentösen *Thiothrix*-Filamente (grüner Pfeil). Nach weiteren 3-5 Tagen hatten diese *Cytophagales* stark in ihrer Anzahl zugenommen, waren elongiert und zeigten teilweise Teilungsstadien (Abb. 22: C+D; weiße Pfeile). Nach ca. 3-3,5 Wochen Inkubation hefteten sich die ersten *Crenarchaeota* (Abb. 22: E; rote Pfeile, *Crenarchaeota* sind grün gefärbt) im 90°-Winkel an die *Cytophagales* (weiße Pfeile). Innerhalb einer Woche kam es zu einer starken Vermehrung der *Crenarchaeota* (Abb. 22: F; rote Pfeile, *Crenarchaeota* sind grün gefärbt) so dass nahezu alle *Cytophagales* (weiße Pfeile) mit einem oder mehreren Archaeen befallen waren. Diese *Crenarchaeota* wuchsen scheinbar länglich aus und fragmentierten am Ende. Die kleinen, kokkoiden Tochterzellen hefteten sich erneut an die *Cytophagales* an. Nach ca. 4-5 Wochen konnten über FISH nur noch wenige *Cytophagales* und keine *Crenarchaeota* mehr nachgewiesen werden. Die ISKS waren zu diesem Zeitpunkt bräunlich gefärbt. Die Versuche wurden daraufhin abgebrochen. Alle Versuche wurden im Laufe von zwei Jahren mit den Standard-ISKS viermal durchgeführt und lieferten reproduzierbare Ergebnisse, was die zeitliche Abfolge der Organismen betraf. Versuche mit Substrat-Variationen ergaben dieselben Ergebnisse bezüglich Organismenzusammensetzung und zeitlichen Ablauf. Auch die Verwendung von Systemen, denen ca. 1×10^6 Sip100-Zellen/ml zugegeben wurden, brachten keine schnellere Anheftung von Bakterien oder *Crenarchaeota*.

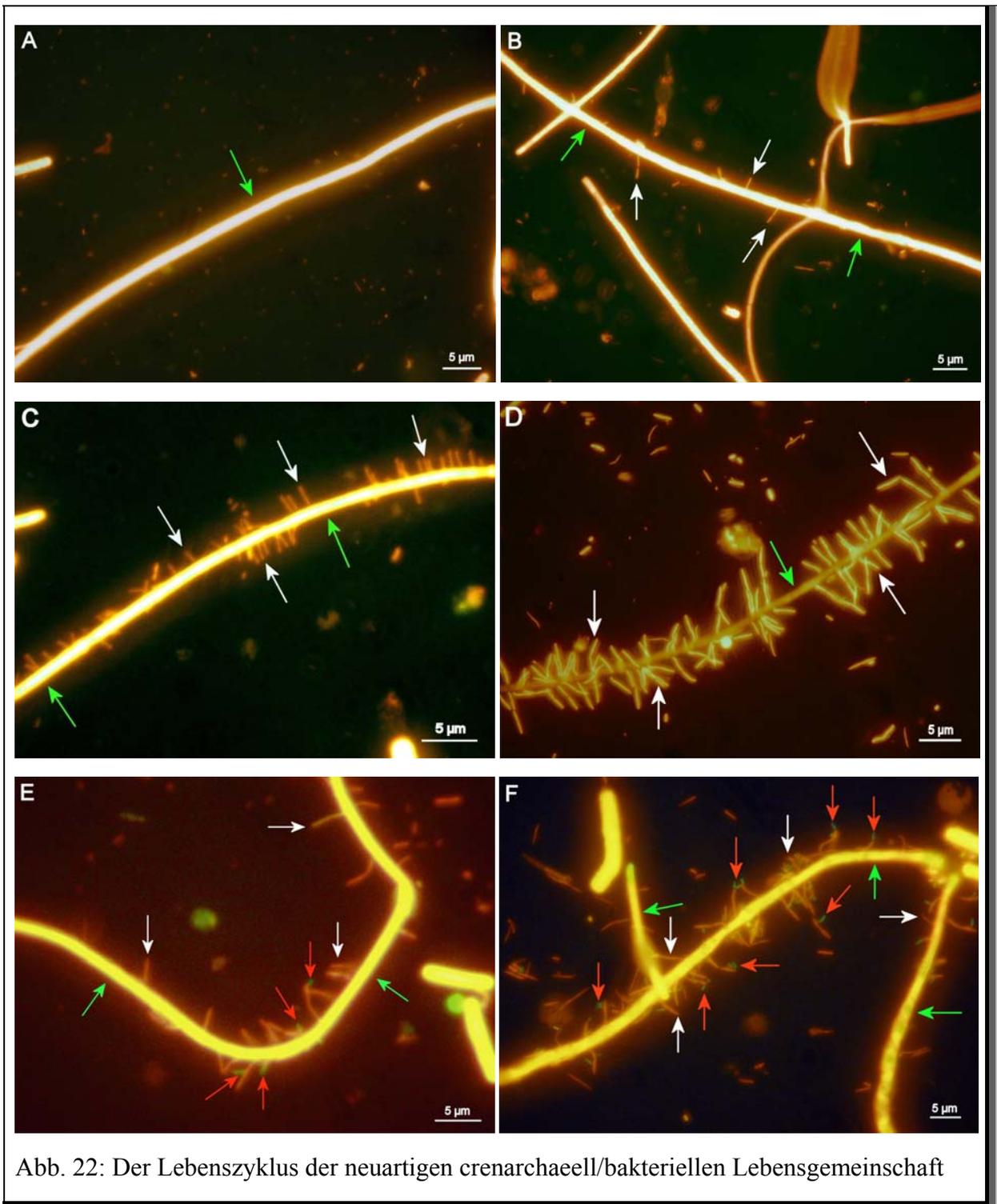


Abb. 22: Der Lebenszyklus der neuartigen crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft

6. Isolationsversuche der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft

Um die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft oder zumindest einen Partner der Lebensgemeinschaft des Sippenauer Moors zu isolieren, wurden unterschiedliche Isolationsansätze durchgeführt.

6.1 Plattierungen

„Streamer“, die vermehrt die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft beinhalteten (siehe III.1.2.1), wurden unter anaeroben, gekühlten Bedingungen aufgereinigt. Zunächst wurden sie mittels eines Dentalschüttlers (Silamat Plus S10, Vivadent) schonend zerkleinert. Größere Bestandteile wie *Thiothrix*-Filamente und Algen wurden durch mehrmaliges kurzes Zentrifugieren (Heraeus Picofuge MC-13; 13.000 Upm, 3-5 s) entfernt. Unterschiedliche Konzentrationen des trüben Überstandes wurden auf TT-Sip-Agarplatten ausplattiert, denen unterschiedliche Biopolymere und Substrate zugesetzt wurden (Tab. 11 und 12). Von morphologisch und farblich unterschiedlichen Kolonien wurden Drei-Ösen-Ausstriche durchgeführt. Diese wurden mindestens zweimal wiederholt, um Reinkulturen zu erhalten. Die erhaltenen Reinkulturen wurden auf flüssiges *Thiothrix*-Medium, das die gleichen Zusätze enthielt, überimpft.

6.1.1. Aerobe Anreicherungsversuche

Für aerobe Anreicherungsversuche wurden die gekühlten Proben im 10°C-Raum ausplattiert und inkubiert. Bei den aeroben Ansätzen wurden 27 unterschiedlich strukturierte und gefärbte Kolonien angereichert und über die Drei-Ösen-Methode in Reinkulturen überführt.

6.1.2 Mikroaerophile Anreicherungsversuche

Die Proben wurden gekühlt in der Anaerobenkammer aufgereinigt und auf anaerob hergestellte Platten ausplattiert. Danach wurden die Platten in einen Anaerobentopf überführt, dreimal mit N₂ begast (0,5 bar Überdruck). Anschließend wurde 0,5% (v/v) steriler Sauerstoff zugespritzt. Die Platten wurden bei 10°C inkubiert. Bei diesen Ansätzen wurden insgesamt 53 unterschiedlich strukturierte und gefärbte Kolonien angereichert und in Reinkultur überführt.

6.1.3 Anaerobe Anreicherungsversuche

Bei anaeroben Ansätzen wurde die Aufreinigung und Plattierung wie in III.6.1.2 durchgeführt, jedoch wurden die Anaerobentöpfe nur mit 0,5 bar N₂ begast. Inkubation erfolgte bei 10°C. Auf diese Weise wurden drei verschiedene Organismen angereichert, die sehr langsam wuchsen (mehr als drei Monate zur Ausbildung einer Kolonie). FISH-Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesen Organismen um Bakterien handelte, deren Morphologien nicht der des gesuchten Bakteriums entsprachen. Aufgrund der langen Generationszeiten wurden die Organismen nicht weiterbearbeitet.

6.1.4 Zuordnung der Isolate

Insgesamt konnten über die verschiedenen Plattierungen mehr als 80 Organismen kultiviert und in Reinkulturen überführt werden. Alle angereicherten Organismen wurden mittels FISH (ARCH-Mix; EUB-Mix, s. II.11.1) den Domänen *Bacteria* oder *Archaea* zugeordnet und in der Bakterienbank Regensburg konserviert. Bei vier Isolaten konnte mit keiner der verwendeten Sonden, selbst bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (0,05-1% SDS) ein positives Signal erhalten werden. Alle anderen Organismen konnten den *Bacteria* zugeordnet werden.

Ein Isolat (Sip37; lange stäbchenförmige Organismen, teilweise mit Filamentbildung) entsprach morphologisch dem gesuchten bakteriellen Partners des Crenarchaeons und wurde für weitere Versuche (s. III.6.2.4) verwendet.

6.2 Laservereinzlungen

Als plattierungsunabhängige Isolationsmethode wurden Zellen mit dem lehrstuhleigenen Lasermikroskop vereinzelt. Hierzu wurden frische Streamer- und Algenproben anaerob aus dem Sippenauer Moor entnommen, gekühlt ins Labor gebracht und unter anaeroben Bedingungen aufgereinigt (siehe III.6.1). Von den aufgereinigten Zellen wurde ein Teil für FISH-Untersuchungen (s. II.11) und Lebend-Tot-Färbungen (s. II.12) verwendet. Zeigten mehr als 90% der Zellen Lebensfähigkeit, wurde die Probe mit Dithionit (s. II.13.2) reduziert und für die Laservereinzlung verwendet. Es wurde versucht Dreierkombinationen aus *Thiothrix*-Filamenten mit angehefteten Bakterien, an denen wiederum die *Crenarchaeota* angehaftet waren, zu vereinzeln. Dies war nur in sehr wenigen Fällen erfolgreich, da die in *Thiothrix* eingelagerten Schwefelgranula vom Laserstrahl abgestoßen wurden, und die Zellen

somit abgelenkt wurden. Eine erfolgreiche Vereinzelnung war nur möglich, wenn der Laser an der Spitze der angehefteten Bakterien oder der *Crenarchaeota* ansetzte, und die *Thiothrix*-Filamente dadurch passiv mit vereinzelt wurden. In den meisten Fällen konnte jedoch nur die Zweierkombination aus Bakterium mit angeheftetem *Crenarchaeota* vereinzelt werden. Da die Sauerstoffbedingungen innerhalb der Streamer unbekannt waren, wurden Vereinzelnungen sowohl auf mikroaerophile als auch auf anaerobe Medien durchgeführt. Insgesamt wurden 65 Vereinzelnungen in Roll-Rändern und Serumflaschen durchgeführt und bei 10°C inkubiert.

6.2.1 Laservereinzelnungen auf mikroaerophile Medien

Die Medien wurden mit 0,5 % Sauerstoff versetzt. Insgesamt wurden 37 Vereinzelnungen in Rollränder (9x) und Serumflaschen (28x) durchgeführt. Es wurden 6 Reinkulturen (Sip100, Sip101, Sip102, Sip104, Sip105 und Sip106) erhalten, jedoch alle ohne anheftende *Crenarchaeota*.

6.2.2 Laservereinzelnungen auf anaerobe Medien

Bei 28 Laservereinzelnungen auf anaerobe Medien (Gasphase N₂) wurde eine Reinkultur (Sip103) erhalten, jedoch wieder ohne angeheftete *Crenarchaeota*.

6.2.3 Phylogenetische Untersuchungen zu den erhaltenen Reinkulturen

Von den insgesamt acht erhaltenen Reinkulturen (sieben über Laservereinzelnung, eine über Plattierung, s. III. 6.2.3 bzw III.6.1.4) wurde zunächst FISH mit Bakterien- und Archaeenspezifischen Sonden durchgeführt. Alle acht Isolate konnten den Bakterien zugeordnet werden. Anschließend wurde eine Ganzzell-PCR zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens durchgeführt (s. II.8; 9bF-1406uR). Die PCR-Produkte wurden einer ARDRA unterzogen. Es zeigte sich, dass die 16S rRNA-Gene der 8 Reinkulturen 5 verschiedene Restriktionsmuster aufwiesen. Sip100, Sip101 und Sip102 hatten identische Restriktionsmuster, ebenso wie Sip105 und Sip106. Die unterschiedlichen PCR-Produkte wurden sequenziert und in den 16S rRNA-Stammbaum eingeordnet. Alle vereinzeln Organismen konnten in die CFB-Gruppe (*Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*-Gruppe) eingeordnet werden (Abb. 23), wiesen jedoch einen relativ großen Sequenzabstand (von 14-24%) auf. Die Baumtopologie wurde durch unterschiedliche Berechnungsmethoden bestätigt.

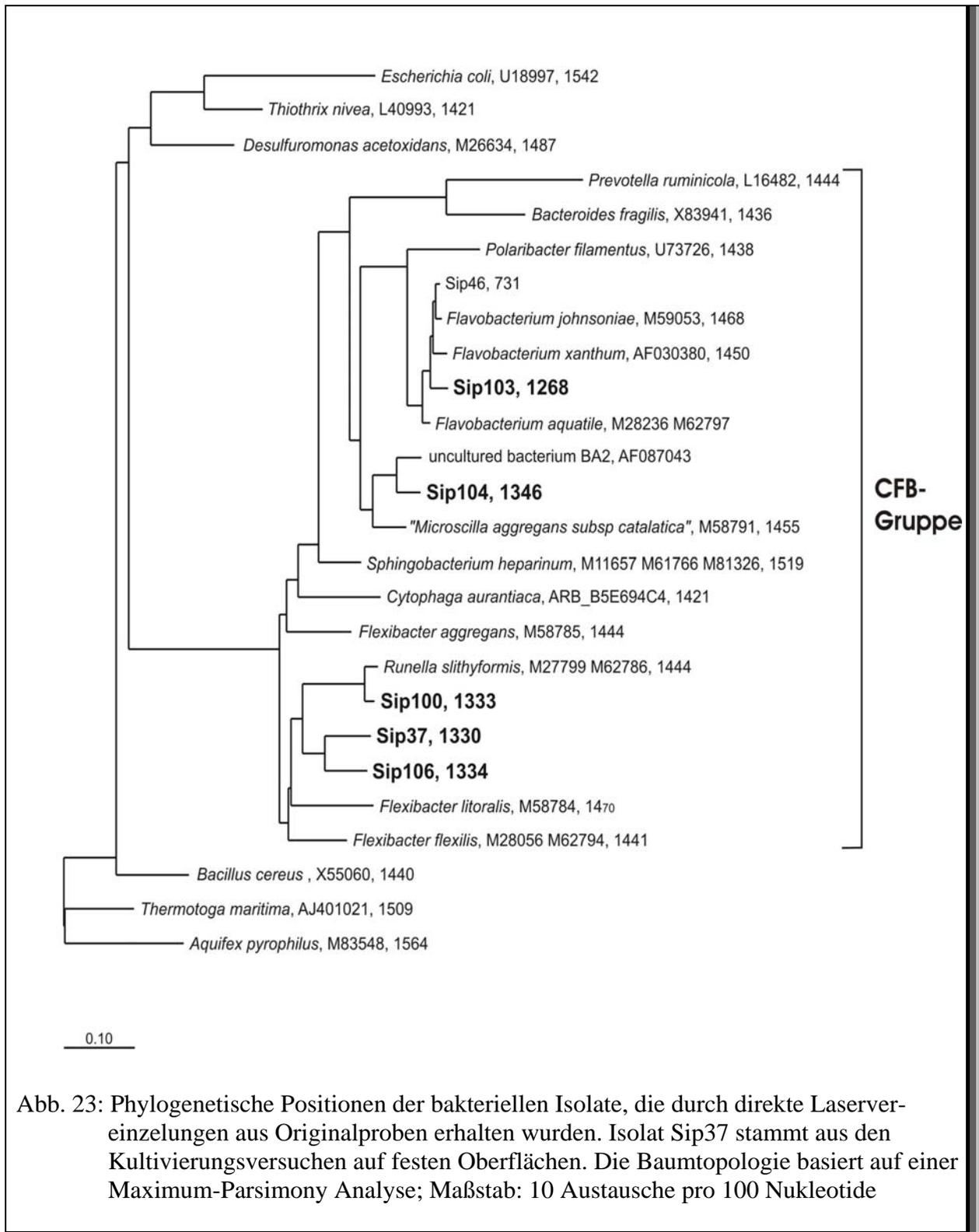


Abb. 23: Phylogenetische Positionen der bakteriellen Isolate, die durch direkte Laservereinzelungen aus Originalproben erhalten wurden. Isolat Sip37 stammt aus den Kultivierungsversuchen auf festen Oberflächen. Die Baumtopologie basiert auf einer Maximum-Parsimony Analyse; Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide

6.2.4 Laservereinzelung auf Medien mit vorgezuchteten Kulturen

Durch die Laservereinzelungen auf die verschiedenen Medien und den Plattierungen standen fünf Reinkulturen (s. 6.2.3) zur Verfügung, die die Morphologie des bakteriellen Partners des Crenarchaeons hatten. Die Reinkulturen Sip37, Sip100 und Sip106, die morphologisch am ehesten dem bakteriellen Partner entsprachen, wurden einige Tage in frischem Medium inkubiert. Auf diese gewachsenen Kulturen (ca. 1×10^6 Zellen/ml, in exponentieller Wachstumsphase) wurde nun die charakteristisch strukturierte Lebensgemeinschaft mit dem Lasermikroskop vereinzelt. Dadurch sollte den *Crenarchaeota* von Anfang an eine ausreichende Anzahl an Partnern zur Verfügung gestellt werden. Insgesamt wurden für den Organismus Sip100 neun, für Sip37 fünf und für Sip104 vier Laservereinzelungen durchgeführt. Jedoch trat auch nach 12 Monaten Inkubation in keinem Ansatz Wachstum des Crenarchaeons auf.

6.3 Anreicherungskulturen

6.3.1 Statische Anreicherungskulturen

Die Isolierung von fünf verschiedenen, morphologisch dem bakteriellen Partner des Crenarchaeons entsprechenden Bakterien (s. III.6.2.3.) ermöglichte Anreicherungen auf bereits gewachsene Kulturen dieser Organismen. Hierzu wurden Kulturen von Sip100, Sip103 und Sip104 für 24-28 h bei 10°C gezüchtet, um exponentiell wachsende Kulturen zu erhalten. Diesen Kulturen wurden unterschiedliche Mengen (100-500 μ l) aufgereinigter Streamerproben zugespritzt. Die Proben wurden vorher durch Filter mit unterschiedlichen Porengrößen (8 μ m, 5 μ m, 3 μ m, 1,2 μ m, 0,8 μ m, 0,45 μ m) filtriert, um große Filamente und Organismen zu beseitigen. Alle Versuchsansätze wurden mikroaerophil mit 0,5% O₂ bei 10°C inkubiert. Auch nach ca. 6 Wochen Inkubation konnten keine *Crenarchaeota* angereichert werden.

Nachdem der Stamm Sip100 als bakterieller Partner des *Crenarchaeons* bestimmt werden konnte (s. III.10.4) wurden verschiedene Anreicherungsansätze auf bereits gewachsene Sip100-Reinkultur durchgeführt.

Dazu wurden Medien mit verschiedenen C-Quellen (Agar, Carrageenane, Alginat), pH-Werten (6,0-7,5), Temperaturen (10°C, 20°C) und Sauerstoff-Konzentrationen (0-20%) verwendet. Zusätzlich wurde das Medium mit Sip100 beimpft und für 24-48 h bei 10 °C inkubiert, bevor die bereits bewachsene Kultur unter anaeroben Bedingungen mit frischen

Algenproben beimpft wurde. Nach ca. 14 Tagen Inkubation ist es dabei erstmals gelungen, kurzzeitig die *Crenarchaeta* auf den Bakterien in einer statischen Laborkultur anzureichern, und aktive Wachstumsstadien durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie (FISH) zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die *Crenarchaeota*-Zellen aktiv in diesen statischen Anreicherungskulturen vermehrten (Zunahme der Zellzahl der *Crenarchaeota*). Mit Zunahme der *Crenarchaeota* nahm jedoch die Zellzahl der Sip100-Zellen stetig ab. Innerhalb 24-48 Tagen waren fast alle Sip100-Zellen aus der Kultur verschwunden, und die *Crenarchaeota* konnten nicht mehr über FISH nachgewiesen werden. Zuspritzen von frischer Sip100-Kultur brachte keine Änderung. Die Sip100-Zellen wurden offensichtlich von den *Crenarchaeota* verstoffwechselt und lysiert, wie FISH-Untersuchungen (siehe Abb. 33) zeigten. Eine Kultivierung der *Crenarchaeota* ist somit nur mit geeigneten Mengen von Sip100-Zellen möglich. Ein Transfer der angereicherten *Crenarchaeota* war nur in sehr wenigen Fällen (< 10%) erfolgreich, und hier auch nur in der ersten Überimpfung. Eine zweite Überimpfung war in keinem der Fälle erfolgreich.

6.3.2 Variation des pH-Werts

Mit Hilfe dieser statischen Anreicherungskulturen konnten die ersten physiologischen Parameter des Crenarchaeons herausgearbeitet werden. Im gesamten verwendeten pH-Bereich von pH 6,0-7,5 war Wachstum nachweisbar.

6.3.3 Variation der Temperatur

Die gleichen Ansätze wurden bei 10°C und 20°C inkubiert. Es konnte nur bei 10°C aktives Wachstum der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft detektiert werden. Bei 20 °C wuchsen ausschließlich Bakterien.

6.3.4 Variation des Sauerstoffgehaltes

Nur in Kulturen mit Sauerstoffkonzentrationen von 5-10% konnte Wachstum festgestellt werden, was mit der Sauerstoffkonzentration im Sippenauer Moor (~7%) übereinstimmte. Bei 0-5% und 12,5-20% Sauerstoff trat nur Bakterienwachstum auf.

6.3.5 Variation der Belichtung

Bei Belichtungsversuchen wurde das Medium unter Zusatz von Agar, Carrageenanen und verschiedenen C-Quellen (C-Org-Mix) bei Sauerstoffkonzentrationen von 7,5-10% mit der Reinkultur des bakteriellen Partners angeimpft. Dazu wurde eine frische Algenprobe, die

gehäuft die neuartige Lebensgemeinschaft enthielt, gegeben. Die Kulturen wurden mit einer Halogen-Tageslichtlampe im Tages-/Nachtrhythmus (16 h/8 h) bestrahlt, um auch die Algen zum Wachstum anzuregen. Das Crenarchaeon zeigte stärkeres Wachstum als in den Kulturen ohne Algen. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die Algen einen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der neuartigen Lebensgemeinschaft haben. Jedoch konnte auch in diesen statischen Anreicherungen, trotz Zusatz von neuer Sip100-Reinkultur, die Kultur mit den *Crenarchaeota* nicht kontinuierlich aufrechterhalten werden. Wiederum waren die ersten Überimpfungen nur zu weniger als 10% erfolgreich und die zweiten Überimpfungen brachten keinen Erfolg.

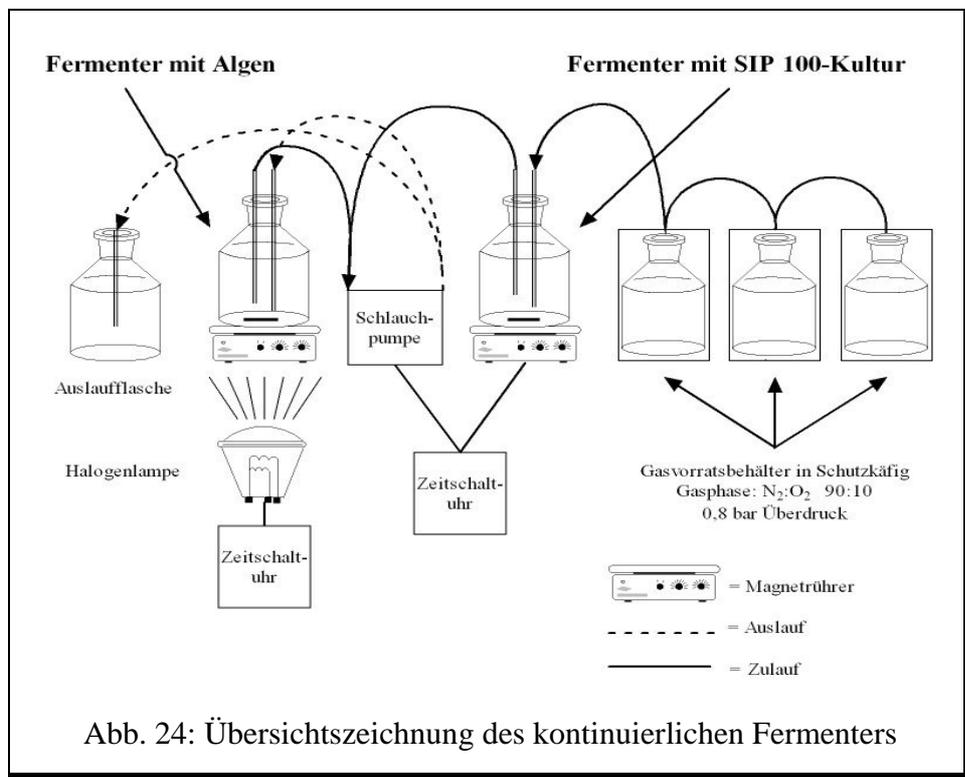
6.3.6 phylogenetische Untersuchungen an den angereicherten Kulturen

Aus den angereicherten Kulturen wurde für phylogenetische Analysen die Gesamt-DNA isoliert (Barns et al., 1994 modifiziert). Angeschlossene PCRs mit archaeellen und bakteriellen Primern brachten jedoch keine Ergebnisse. Grund hierfür sind wahrscheinlich Medienbestandteile wie Agar oder Carrageenan, die eine PCR hemmen können. Eine bereits erprobte Methode zur DNA-Reinigung über Sephadex/PVPP-Säulchen (Koch, 2001) war ebenfalls erfolglos. Durch die Aufreinigung über ein Low melting point-Agarosegel (1%) wurden die hemmenden Substanzen erfolgreich entfernt und zumindest bakterielle PCR-Produkte erhalten. Archaeelle PCR-Produkte konnten trotz zweimaliger Reamplifikation nicht erhalten werden. Wahrscheinlich war die isolierte archaeelle DNA-Menge zu gering, da der prozentuale Anteil der Archaeen in der Kultur sehr niedrig war.

6.4 Kontinuierliche Anreicherungskulturen im Fermenter

Um das Absterben der *Crenarchaeota* in einer statischen Kultur zu vermeiden, wurde versucht, das natürliche System in einem kontinuierlichen Fermenter (Abb. 24) nachzustellen. Hierzu wurde kontinuierlich neue Sip100-Lösung, Nährstoffe und Gas zugeführt. Altes Medium mit Stoffwechselendprodukten wurde kontinuierlich aus dem Fermenter entfernt. Diese Versuche wurden mit unterschiedlichen C-Quellen, Flüssigkeits- zu Gas-Verhältnissen und Medienfließgeschwindigkeiten durchgeführt. Der Fermenter enthielt 200-600 ml MM-Medium, pH 6,5, mit je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat und Glucose sowie 0,01x Vitamine nach Pfennig. Teilweise wurden dazu je 0,15% Carageenanen, Agar und Na-Alginat gegeben. Er wurde mit Sip100-Kultur beimpft und 48-72 h bei 10°C inkubiert. Ab einer Zellzahl von ca. 10^6 Sip100-Zellen/ml wurden frischen Algen-Proben, die anaerob aus dem Sippenauer Moor

entnommen und gekühlt ins Labor transportiert wurden, angeimpft. Der Fermenter war über eine Schlauchpumpe mit einem Vorratsbehälter (MM-Medium mit je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat und Glucose sowie 0,01x Vitaminen nach Pfennig; pH 6,5) verbunden, der eine exponentiell wachsende Sip100-Kultur enthielt. Dieser Vorratsbehälter war mit drei Gasflaschen verbunden, die ein Gasgemisch von $N_2:O_2$ 90:10 (vol/vol) enthielten. Wurde aus der Vorratsflasche Medium entfernt, strömte Gasgemisch durch das Medium nach, wodurch der Sauerstoffgehalt im Medium aufrechterhalten wurde. Die Fließgeschwindigkeit, mit der die wachsende Sip100-Kultur dem Medium zugeführt wurde, konnte über die Schlauchpumpe mit der Zeitschaltuhr variiert werden. So konnte Sip100-Kultur in unterschiedlichen Mengen (12,5-50 ml/Tag) kontinuierlich oder intervallweise dem Fermenter zugeführt werden. Der ebenfalls an die Zeitschaltuhr gekoppelte Magnetrührer sorgte für eine gleichmäßige Durchmischung der Sip100-Kultur. Wurde dem Fermenter Medium zugeführt, wurde im gleichen Maße Medium über die Schlauchpumpe in eine Auslaufflasche entfernt. Auf diese Weise wurde eine Anhäufung von wachstumshemmenden Stoffwechselendprodukten vermieden. Der Fermenter wurde mit einer an eine weitere Zeitschaltuhr gekoppelte Tageslicht-Halogenlampe im Tages-/Nachtrhythmus (16 h/8 h) bestrahlt, um die Algen zu Wachstum anzuregen.



Um die Organismenzusammensetzung zu überprüfen wurden in Intervallen von 24-72 h Proben aus dem Fermenter und der Auslaufflasche entnommen und über FISH mit Archaeen- und Bakterien-spezifischen Sonden analysiert. Bei fast allen Fermentern wurden nach dem Animpfen stäbchenförmige Archaeen nachgewiesen, die an Bakterien angeheftet waren. Bei einigen Fermentern nahm die Zellzahl der Archaeen im Laufe der Inkubation leicht zu, erreichte jedoch nie dieselbe Dichte wie in den statischen 20 ml Kulturen. Auch hier waren nicht genügend *Crenarchaeota* vorhanden, um in einer 16S-Genanalyse archaeelle PCR-Amplifikate zu erhalten. Nach ca. 4 Wochen wurden die Algen von Grünalgen überwachsen, und es bildeten sich dichte Organismenkluster, so dass die Versuche nach 4-6 Wochen abgebrochen wurden.

7. Zellvereinzlungen mit dem Laserkatapult

7.1 Vorversuche mit FISH auf verschiedenen Foliensystemen

Diese Versuche wurden zusammen mit Christian Rudolph durchgeführt. Bisher konnten nur Zellen mit dem Laserkatapult vereinzelt werden, die im Phasenkontrastmikroskop betrachtet wurden. Nun sollte ein System entwickelt werden, mit dem FISH-gefärbte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop des Laserkatapults vereinzelt werden können, und anschließend eine Amplifikation ihrer 16S rRNA möglich ist. Hierzu wurden Zellen einer Flüssighybridisierung mit speziellen archaeellen Phoslink-markierten FISH-Sonden, die eine spätere Amplifikation der 16S rRNA nicht behindern (Rudolph, 2003), unterzogen. Die hybridisierten Zellen wurden auf unterschiedlichen Foliensystemen aufgebracht, die mit Nagellack oder Tesafilm auf den Objektträgern befestigt waren, um die Hintergrundfluoreszenz der Folien zu testen. Um ein Abfließen der Zellsuspensionen und der Hybridisierungslösungen zu verhindern, wurden mit einem PAP-PEN (Kisker, Mühlhausen) kleine Felder markiert. Die standardmäßig verwendete Folie zeigte eine starke Eigenfluoreszenz und konnte deswegen nicht verwendet werden. Normale Haushaltsfolie („Toppits“, Melitta, Minden) und Triacetat-Folie (55µm, Fa. Bauer GmbH, Starnberg) waren durch ihre geringe Eigenfluoreszenz für die Hybridisierung geeignet, konnten jedoch nicht mit dem Laser geschnitten werden (Rudolph, 2003).

7.2 Vorversuche zur Amplifikationsfähigkeit hybridisierter Zellen

Es wurde ausgetestet, ob die für die FISH notwendigen Konzentrationen von SDS oder Tween 20 einen Einfluß auf die Amplifikationsfähigkeit der zellulären DNA haben. Hierzu wurden in PCR-Versuchen aufsteigende Konzentrationen von SDS (0%; 0,0025%; 0,005%; 0,01%; 0,1%) und Tween 20 (0%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1,0%) zugesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass SDS bereits ab Konzentrationen von 0,0025% die PCR stark hemmt. Bei Tween 20 wurde bis zu einer Konzentration von 1% ein PCR-Produkt erhalten, wobei ab einer Konzentration von 0,1 % eine leichte Hemmung verzeichnet wurde. Flüssigstains bei einem Tween 20-Anteil von 0,5-5% waren erfolgreich. Darauf wurden alle folgenden Flüssig-Hybridisierungen mit 0,5% Tween 20 durchgeführt.

7.3 Zellvereinzelung mittels Laserkatapult

Die Zellvereinzelungen wurden mit dem Laserkatapult der Firma Palm, Bernried, ohne eine vorgeschaltete FISH-Hybridisierung durchgeführt. Frische Streamer-Proben aus dem Sippenauer Moor, die gehäuft die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft enthielten, wurden zerkleinert und auf poly-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen. Nach dem Eintrocknen auf einem Wärmeblock (30°C) wurden die Zellen mit dem Laserkatapult bei 40facher Vergrößerung betrachtet. Durch die charakteristische Form der Lebensgemeinschaft konnten *Crenarchaeota*, Bakterien und *Thiothrix*-Filamente erkannt, markiert und isoliert werden. Insgesamt wurden ca. 50 *Crenarchaeota*, ca. 200 Bakterien, an denen die *Crenarchaeota* angeheftet waren, und größere Mengen von *Thiothrix*-Filamenten in je ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinzelte. Hierzu wurde der Laserimpuls kurz unterhalb der Zellen in den Glasobjektträger gelenkt, so dass kleine Glasstückchen mit den darauf angehefteten Zellen abgesprengt und in den Deckel des Reaktionsgefäßes geleitet wurden. Die vereinzelten Zellen wurden in 10 µl Wasser/Nonidet P40-Mischung aufgenommen und gekühlt ins Labor transportiert.

7.4 PCR-Ansätze mit den isolierten Zellen

Für die Amplifikation der 16S rRNA-Gene der vereinzelten Zellen wurden 50 µl PCR-Ansätze mit archaeellen (8aF-1406uR) oder bakteriellen (9bF-1406uR) Primerkombinationen durchgeführt. Von den archaeellen Ansätzen konnten selbst nach zwei Reamplifikationen keine positiven PCR-Produkte erhalten werden. Mit den bakteriellen Primern wurde ebenfalls

weder bei den Bakterien noch bei den Filamenten, selbst nach der 2. Amplifikation, ein positives Signal erhalten. Dies könnte auf eine Störung der PCR durch die Glasstückchen hindeuten.

8. Zellvereinzlung mit dem Zellsorter

Neben Isolationsversuchen mit der optischen Pinzette und dem Laserkatapult wurden Vereinzlungsversuche mit dem lehrstuhleigenen Durchflußzytometer (Abb. 25) durchgeführt.

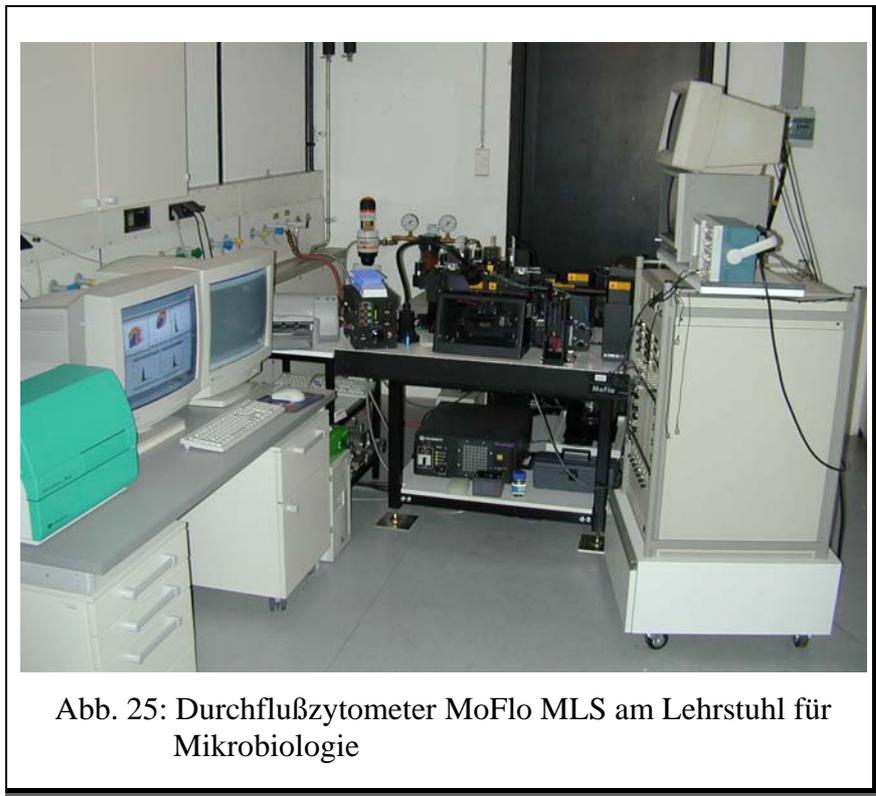


Abb. 25: Durchflußzytometer MoFlo MLS am Lehrstuhl für Mikrobiologie

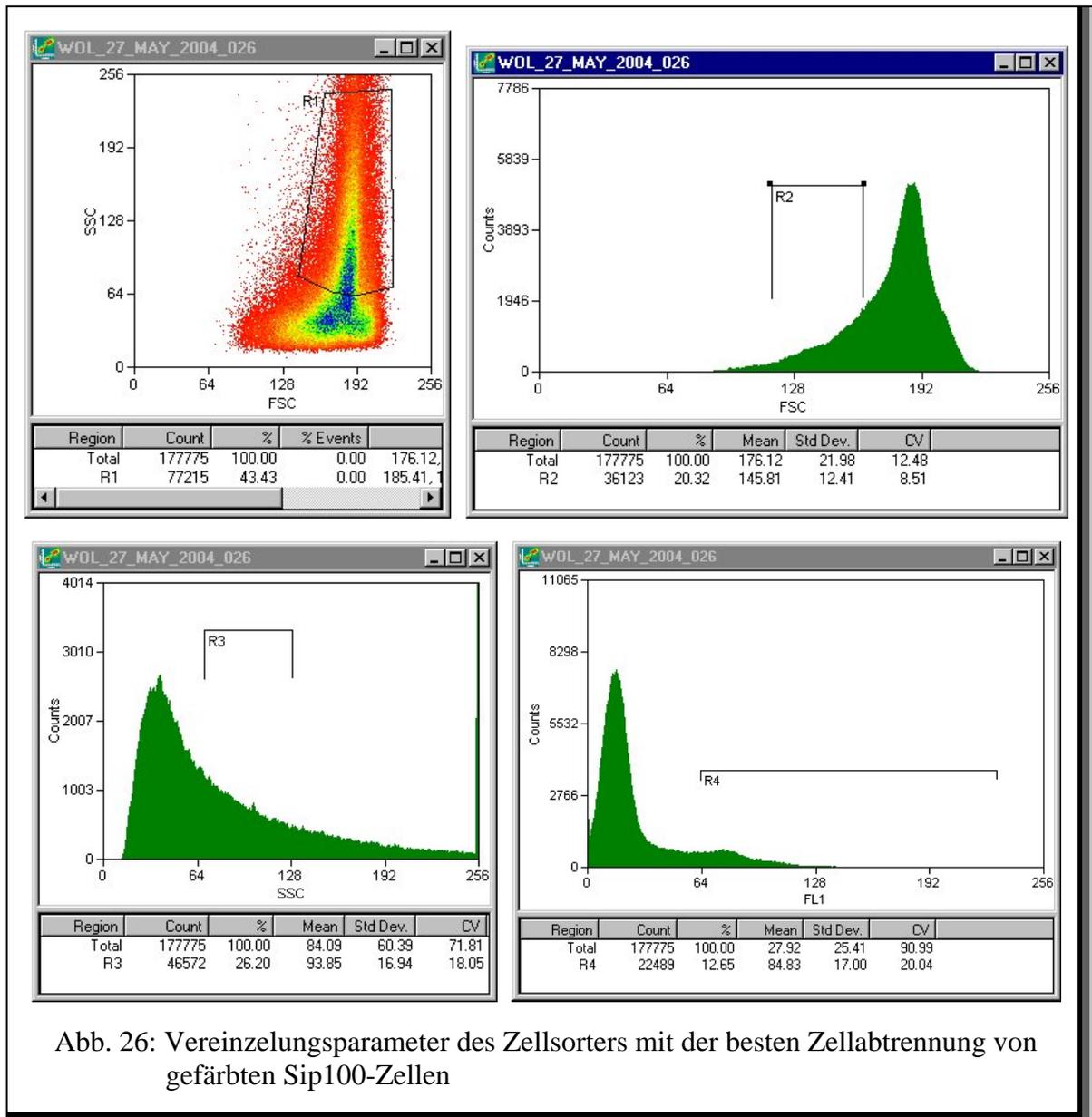
8.1 Vorversuche zur Zellvereinzlung mit dem Zellsorter

Die mit der Gensonde markierten Sip100-Zellen sollten mittels des Durchflußzytometers sortiert werden, und die daran angehefteten *Crenarchaeota* passiv mit vereinzelt werden. Die Proben wurden wie in III.6.1 beschrieben aufgereingt und anschließend einer Flüssighybridisierung mit der Sip100-spezifischen Sonde CF729 unterzogen. Auf eine Markierung der *Crenarchaeota* mit einer FISH-Sonde wurde verzichtet, da die gebundenen FISH-Sonden später eine Bindung der PCR-Primer verhindern hätten können.

Als Vorversuche wurden Mischungen der Sip100 Reinkultur und aufgereinigten Proben (1:1 bzw. 1:10) aus dem Sippenauer Moor eingesetzt. Durch Einstellung der verschiedenen Parameter am Durchflußzytometer sollten passende Einstellungen gefunden werden, um FISH-markierte Sip100-Zellen von den anderen Organismen isolieren zu können. Es zeigte sich, dass es nur mit der größten Düse des Zellsorters (70 µm) möglich war, Zellen zu vereinzeln, ohne die Düse zu verstopfen. Grund hierfür waren die trotz der Aufreinigung vorhandenen *Thiothrix*-Filamente. Durch erneute Zentrifugation für einige Sekunden bei 13.000 Upm sollten diese abgetrennt werden. Zudem wurde die Suspension mit 1x PBS verdünnt. Durch diese Maßnahmen konnte die Vereinzelnung von Sip100-Zellen verbessert werden, jedoch waren in den vereinzeln Sip100-Zellen noch starke Verunreinigungen durch andere Mikroorganismen zu finden. Auch das Problem mit dem Verstopfen der Düse konnte nicht beseitigt werden. Je Einstellung wurden ca. 10 µl Zellen sortiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Zusammensetzung analysiert. Es zeigte sich sehr schnell, dass die Parameter bei unterschiedlichen Proben sehr stark variierten, so dass keine allgemein gültigen Einstellungen möglich waren.

8.2 Zellvereinzelnung von fluoreszenzmarkierten Zellen

Die Originalproben aus dem Sippenauer Moor wurden nach der Fixierung mit dem Dentalschüttler zerkleinert und ein zweites Mal aufgereinigt. Nach der Hybridisierung wurde die Suspension etwas stärker mit 1x PBS verdünnt. Es wurden verschiedene Parameter ausgetestet (Abb. 26).



Es wurden unterschiedliche Schnittmengen der Parameter R1-R4 getestet und anschließend am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Schnittmenge aus R1 und R4 erwies sich am effektivsten. Damit konnten einige gefärbte Sip100-Zellen aus der Originalprobe abgetrennt werden. Diese waren jedoch durch Fremdorganismen verunreinigt. Bei den nachfolgenden Fluoreszenzuntersuchungen konnten jedoch keine Sip100-Zellen mit daran angehefteten *Crenarchaeota* nachgewiesen werden.

9. Immunomagnetische Isolierung von Zellen

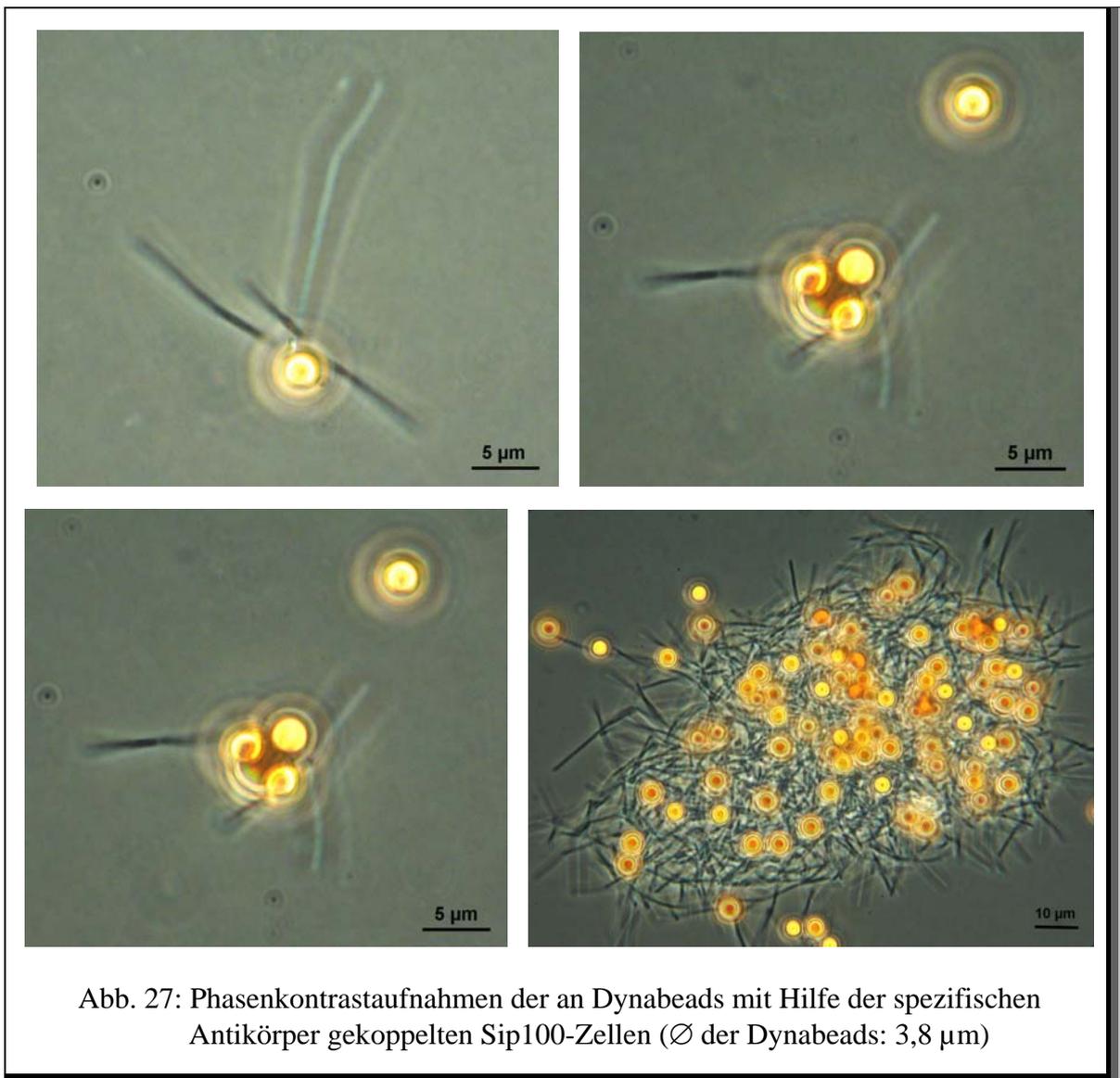
Spezifischen Antikörper gegen das Isolat Sip100, dem bakteriellen Partner des Crenarchaeons (s. III.10.4), ermöglichten die immunomagnetische Isolierung von Zellen. Bei dieser Methode werden zellspezifische Antikörper an paramagnetische Partikel (Dynabeads) gekoppelt. Dies kann sowohl direkt, als auch über sekundäre Antikörper erfolgen. Zielzellen können so durch einen starken Magneten von anderen Mikroorganismen abgetrennt werden.

9.1 Immunomagnetische Isolierung von Zellen mit primären und sekundären Antikörpern

Bei dieser Methode wurden an die Dynabeads zuerst sekundäre Anti-Chicken Antikörper gekoppelt. Danach wurden die primären gegen Sip100 gerichteten spezifischen Antikörper an die sekundären Antikörper gebunden. Die fertig gekoppelten Dynabeads wurden zu Portionen von 10^7 Dynabeads aufgeteilt und in 500 μ l Puffer A aufgenommen. Zum Testen der Spezifität wurden frisch gewachsene Sip100-Zellen abzentrifugiert (Microzentrifuge MC13; 13000 Upm; 10 min) und in 50-100 μ l 1x PBS resuspendiert. Die Zellen wurden zu den Dynabeads gegeben und ca. 1-2 h bei 4°C bei 50 Upm gerollert. Anschließend wurde die Kopplung mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass nur weniger als 5% der Zellen an Dynabeads gebunden waren. Ein weiterer Versuch mit 1-2 h Inkubation bei Raumtemperatur brachte auch keine Verbesserung. Selbst eine Erhöhung der Inkubationszeit auf ca. 20 h hatte keine positiven Auswirkungen.

9.2 Immunomagnetische Isolierung von Zellen mit primären Antikörpern

Bei dieser Methode werden die primären Antikörper direkt an die Dynabeads gebunden, und die Zielzellen damit vereinzelt. Hierzu wurden, wie in III.9.1 beschrieben, Vorversuche mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit einer Sip100-Reinkultur gemacht. Es fand eine wesentlich bessere Bindung der Zellen an die Dynabeads statt (Abb. 27). Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 20 h bei 4°C verbesserte die Bindung nur unwesentlich. Anschließend wurden 10 Waschschrte im Dynbead-Magnethalter (Dyna Magnetic Particle Concentrator (DynaMPC[®]), Dynal Biotech, Oslo, Norwegen) mit je 500 μ l Puffer B durchgeführt.



Nach den erfolgreichen Vorversuchen wurden aufgereinigte Originalproben aus dem Sippener Moor verwendet. Hier konnten nur sehr selten Sip100-Zellen vereinzelt werden. Teilweise wurden mit den Dynabeads auch kurze *Thiothrix*-Filamente oder Algenstückchen, an denen die Sip100-Zellen angeheftet waren, isoliert. Es konnten nur in sehr wenigen Fällen an den Sip100-Zellen angeheftete *Crenarchaeota* nachgewiesen werden, jedoch waren diese Proben durch andere Mikroorganismen verunreinigt. Mit den gefangenen Zellen wurden sterile Medien beimpft (100 μl vereinzelt Zellen/20 ml Medium; 1:100 Verdünnung davon) und bei 10°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Ansätze mikroskopisch und über FISH überprüft. In keinem der Ansätze konnte ein Wachstum von Sip100-Zellen und daran anhaftenden *Crenarchaeota* beobachtet werden.

10. Untersuchungen zum bakteriellen Partner des Crenarchaeons

10.1 Mikroskopische Untersuchungen

Insgesamt standen fünf Reinkulturen zur Verfügung, die morphologisch am ehesten dem bakteriellen Partner der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft entsprachen. Durch mikroskopische Vergleiche von Originalproben und den Reinkulturen in unterschiedlichen Wachstumsphasen konnten drei Organismen bestimmt werden (Sip37, Sip100, Sip106) die morphologisch dem bakteriellen Partner in den Originalproben am nächsten kamen.

10.2 FISH mit der CFB-spezifischen Sonde CF319a/b

Da es sich bei allen isolierten Bakterien um Vertreter der CFB-Gruppe handelt (Abb. 23), wurde versucht, mit einer bereits publizierten CFB-spezifischen FISH-Sonde (CF319 a/b; Manz et al., 1996) die isolierten Organismen und das Bakterium der Lebensgemeinschaft anzufärben. Es zeigte sich jedoch, dass weder die Reinkulturen noch der bakterielle Partner mit der FISH-Sonde ein Signal lieferten. Eine Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen ergab, dass die drei isolierten neuen Cytophagales-Isolate (Sip37, Sip100, Sip106) an zwei bzw. drei Positionen Basenaustausche zu den Sonden CF319a/b (Abb. 28) besitzen.

10.3 Konstruktion einer spezifischen FISH-Sonde für isolierte Vertreter der CFB-Gruppe

Die vorhandene Sonde CF319a/b wurde so modifiziert (Abb. 28), dass sie sequenzspezifisch für die drei isolierten Organismen ist. Mit Hilfe der „Probe Design“-Funktion des ARB-Programms (s. II.11.2) wurde die neukonstruierte Sonde CF319 mod. auf mögliche Bindungen mit anderen Organismen überprüft. Nach optimaler Anpassung der Hybridisierungsbedingungen (20-25% Formamid) zeigte die anschließende FISH mit den isolierten Organismen eine gute Färbung. Genauso lieferten die bakteriellen Partner aus der Originalprobe ein positives Hybridisierungssignal, wodurch einer der isolierten Organismen der gesuchte Partner der neuartigen Lebensgemeinschaft sein könnte (Abb. 29).

Sonde	3' bzw. 5'	Sequenz											3' bzw. 5'							
Sip37, Sip100, Sip106	5'	G	C	A	C	T	G	A	G	A	T	A	C	G	G	G	C	C	A	3'
CF319a	3'	C	A	T	G	A	C	T	C	T	G	T	G	C	C	T	G	G	T	5'
CF319b	3'	C	A	T	G	A	C	T	C	T	A	T	G	C	C	T	G	G	T	5'
CF319 mod.	3'	C	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	G	C	C	C	G	G	T	5'

Abb. 28: Vergleich der Zielsequenz der CFB-Vertreter mit den Sequenzen der einzelnen CFB-Sonden

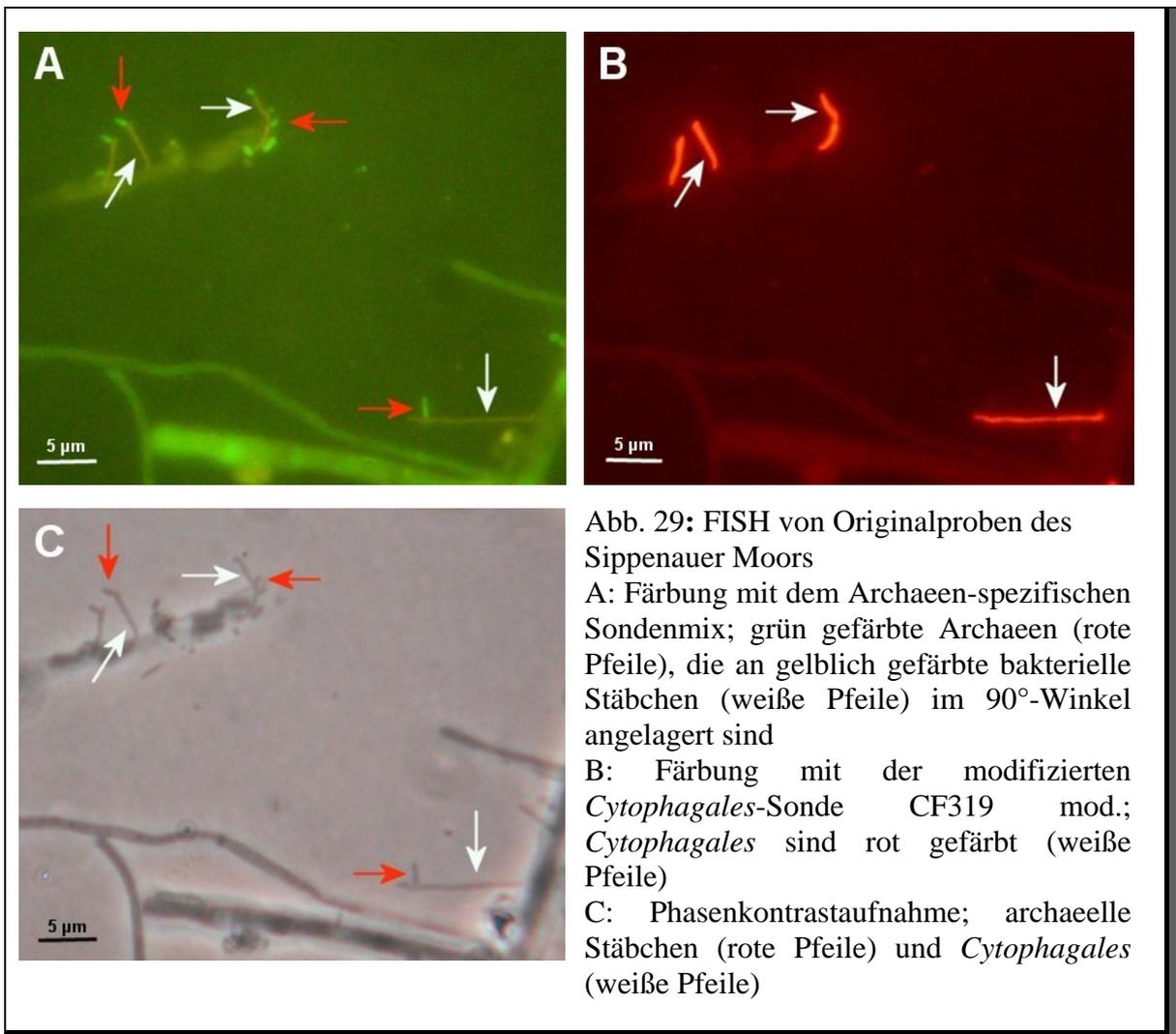


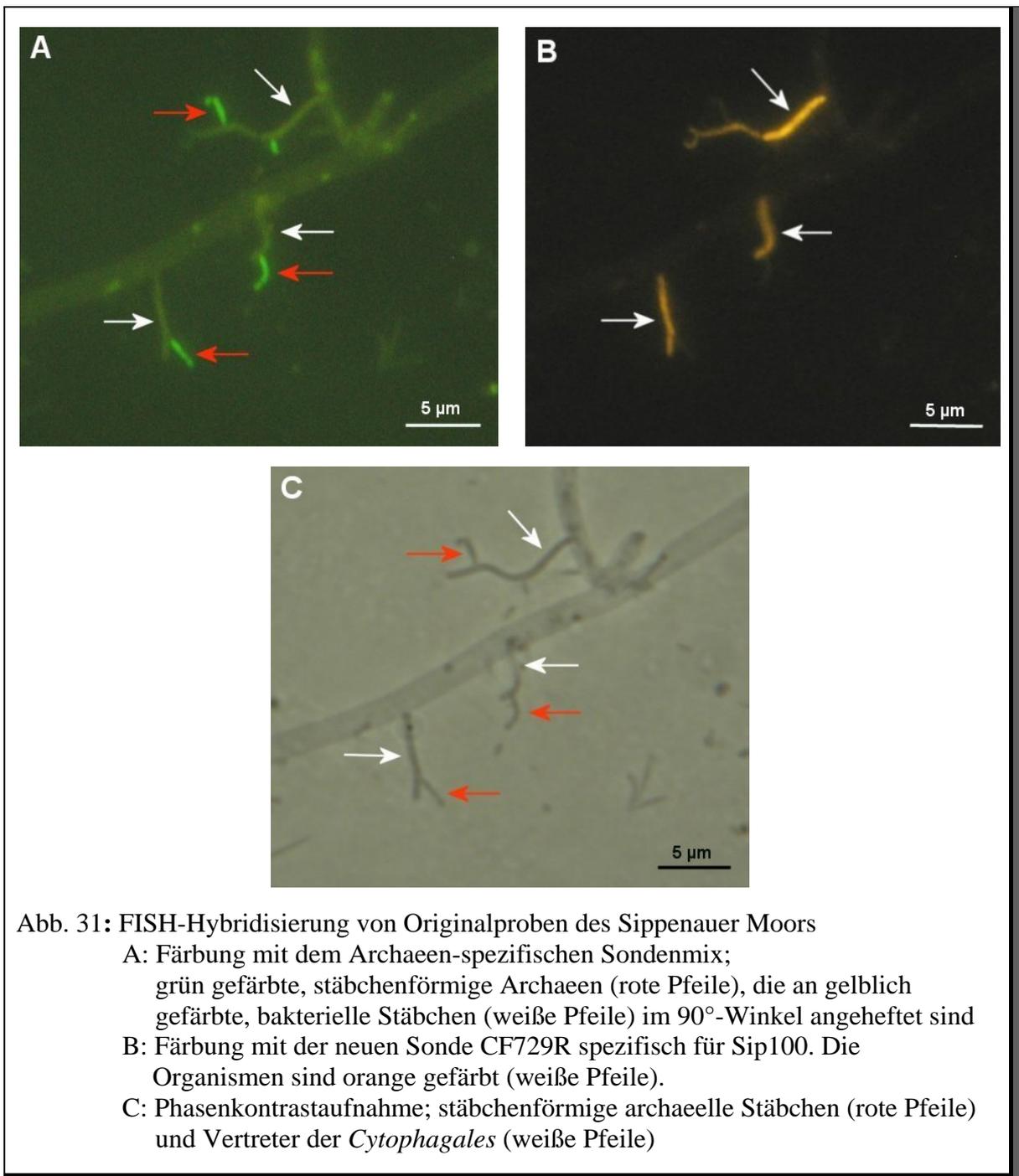
Abb. 29: FISH von Originalproben des Sippenauer Moors
 A: Färbung mit dem Archaeen-spezifischen Sondenmix; grün gefärbte Archaeen (rote Pfeile), die an gelblich gefärbte bakterielle Stäbchen (weiße Pfeile) im 90°-Winkel angelagert sind
 B: Färbung mit der modifizierten *Cytophagales*-Sonde CF319 mod.; *Cytophagales* sind rot gefärbt (weiße Pfeile)
 C: Phasenkontrastaufnahme; archaeelle Stäbchen (rote Pfeile) und *Cytophagales* (weiße Pfeile)

10.4 Konstruktion einer spezifischen FISH-Sonde gegen Sip100

Zur weiteren Untersuchung der CFB-Isolate wurde gegen das CFB-Isolat Sip100 eine spezifische FISH-Sonde (CF729R) konstruiert (Abb. 30). Mit Hilfe der „Probe Design“-Funktion des ARB-Programms (s. II.11.2) wurde die neukonstruierte Sonde CF729R auf mögliche Bindungen mit anderen Organismen überprüft. Selbst bei 3 Basenaustauschen erfolgte nur eine Bindung an das Isolat Sip100. Nach Optimierung der Hybridisierungsbedingungen (20% Formamid) zeigte sich, dass mit der neuen Sonde die anderen fünf CFB-Isolate sowie CFB-Positivkontrollen (*Microscilla aggregans* und *Flavobacterium aquatile*) kein FISH-Signal erbrachten. Bei FISH von Originalproben, in denen die spezifische Lebensgemeinschaft vorkommt, lieferte jedoch der bakterielle Partner der Lebensgemeinschaft mit der spezifischen Sonde ein positives Signal (Abb. 31). Dadurch wurde erstmals gezeigt, dass es sich bei dem Isolat Sip100 höchstwahrscheinlich um das gesuchte Bakterium aus der Lebensgemeinschaft handelt. Es wurde ebenfalls deutlich, dass Sip100 nur einen sehr kleinen Teil der im Biotop Sippenauer Moor vorhandenen CFB-Vertretern darstellt. Trotzdem finden sich *Crenarcheota* nur spezifisch an diese Zellen angeheftet.

Organismus bzw. Sonde	3' bzw. 5'	Sequenz	3' bzw. 5'
Sip100	5'	A G C G T T A A C T G C A A G A C C	3'
CF729R	3'	T C G C A A T T G A C G T T C T G G	5'

Abb. 30: Vergleich der Zielsequenz von Sip100 mit der neu konstruierten Sonde CF729R



10.5 Herstellung von Antikörpern gegen Sip100

Die Zellen des Isolats Sip100 wurden in Reinkultur mit 0,001% C-Org-Mix im Medium gezüchtet und durch Zentrifugation aufkonzentriert. Nach dreifacher Immunisierung eines Huhns im Zeitraum von 2-3 Monaten (Davids Biotechnologie, Regensburg) wurden spezifische Antikörper mit 21 mg/ml (insgesamt 25 ml) aus den Eiern erhalten.

10.6 Immuno-FISH mit Sip100, verschiedenen CFB-Vertretern und Originalproben

Um die Spezifität der erhaltenen Antikörper für das Isolat Sip100 zu verifizieren, wurde die Bindung der Antikörper an verschiedene, nahe verwandte Organismen (Sip37, Sip103, Sip104, Sip106, *Flavobacterium aquatile*, *Microscilla aggregans*) getestet. Bei keinem der anderen Mikroorganismen wurde, auch unter verschiedenen Hybridisierungsbedingungen, ein positives Signal erhalten. Auch bei Originalproben aus dem Sippenauer Moors wurde nur mit dem bakteriellen Partner der *Crenarchaeota* eine positive Antikörperreaktion beobachtet (Abb. 32). Dadurch wurde gezeigt, dass die erhaltenen Antikörper hochspezifisch für das Bakterium Sip100 sind.

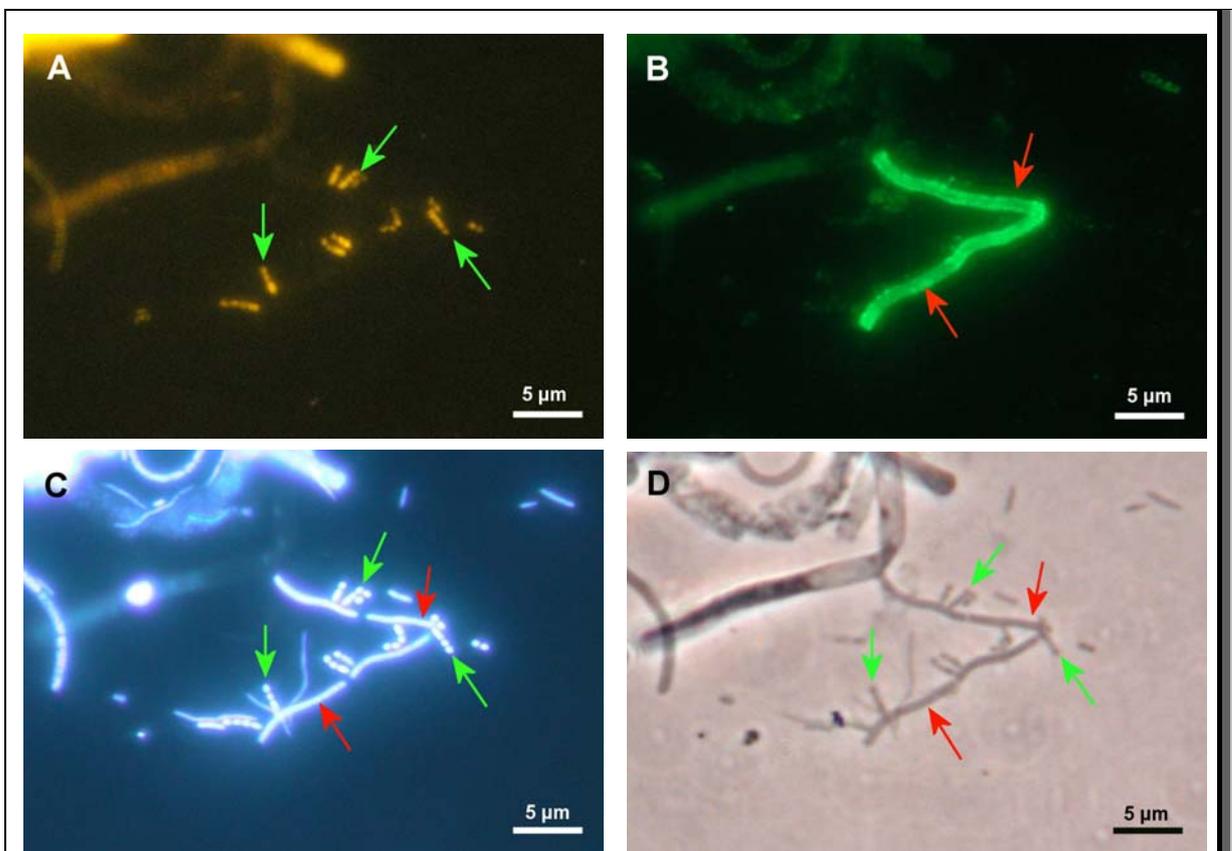


Abb. 32: Fluoreszenzaufnahmen einer Originalprobe des Sippenauer Moors

- A, Färbung mit einer Archaeen-spezifischen Sonde; Archaeen sind orange gefärbt (grüne Pfeile)
- B, Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern; Sip100-Zellen sind grün gefärbt (rote Pfeile)
- C, Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI; Zellen mit DNA sind blau gefärbt; Archaeen (grüne Pfeile), Sip100-Zellen (rote Pfeile)
- D, Phasenkontrastaufnahme; Archaeen (grüne Pfeile), Sip100-Zellen (rote Pfeile)

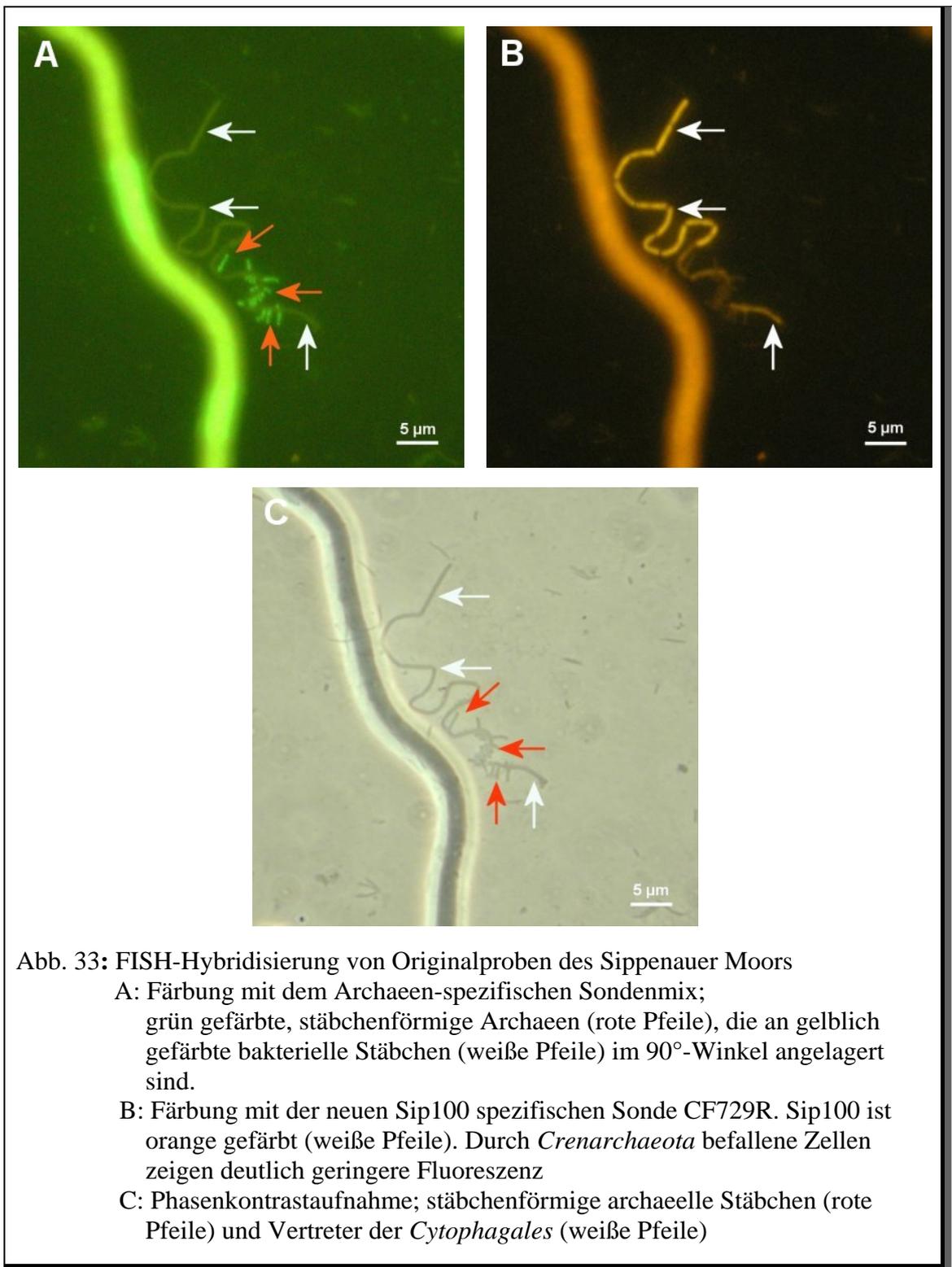
Durch zwei unterschiedliche Nachweismethoden (FISH mit Sip100-spezifischer Sonde und Immuno-FISH mit Sip100-spezifischen Antikörpern) wurde bewiesen, dass Sip100 der alleinige Partner des Crenarchaeons ist, obwohl er in der Natur einen sehr geringen Anteil der vorhandenen CFB-Vertreter darstellt.

11. Weiterführende Untersuchungen zur crenarchaeell/ bakteriellen Lebensgemeinschaft

11.1 Hinweise auf parasitären Stoffwechsel

Die Versuche zur Kultivierung (s. III.6.3.1) der neuartigen Lebensgemeinschaft gaben erste Hinweise darauf, dass die Bakterien essentiell für das Wachstum der *Crenarchaeota* sind und sie scheinbar als Wirt genutzt werden. Es wurde eine starke Abnahme der Bakterien mit vermehrtem Wachstum der *Crenarchaeota* beobachtet. Nach dem Verschwinden der Bakterien aus der Kultur konnten auch keine *Crenarchaeota* mehr durch FISH nachgewiesen werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit Abnahme der Vitalität der Zellen auch die Ribosomen abgebaut werden, so dass die FISH-Sonden nicht mehr binden können.

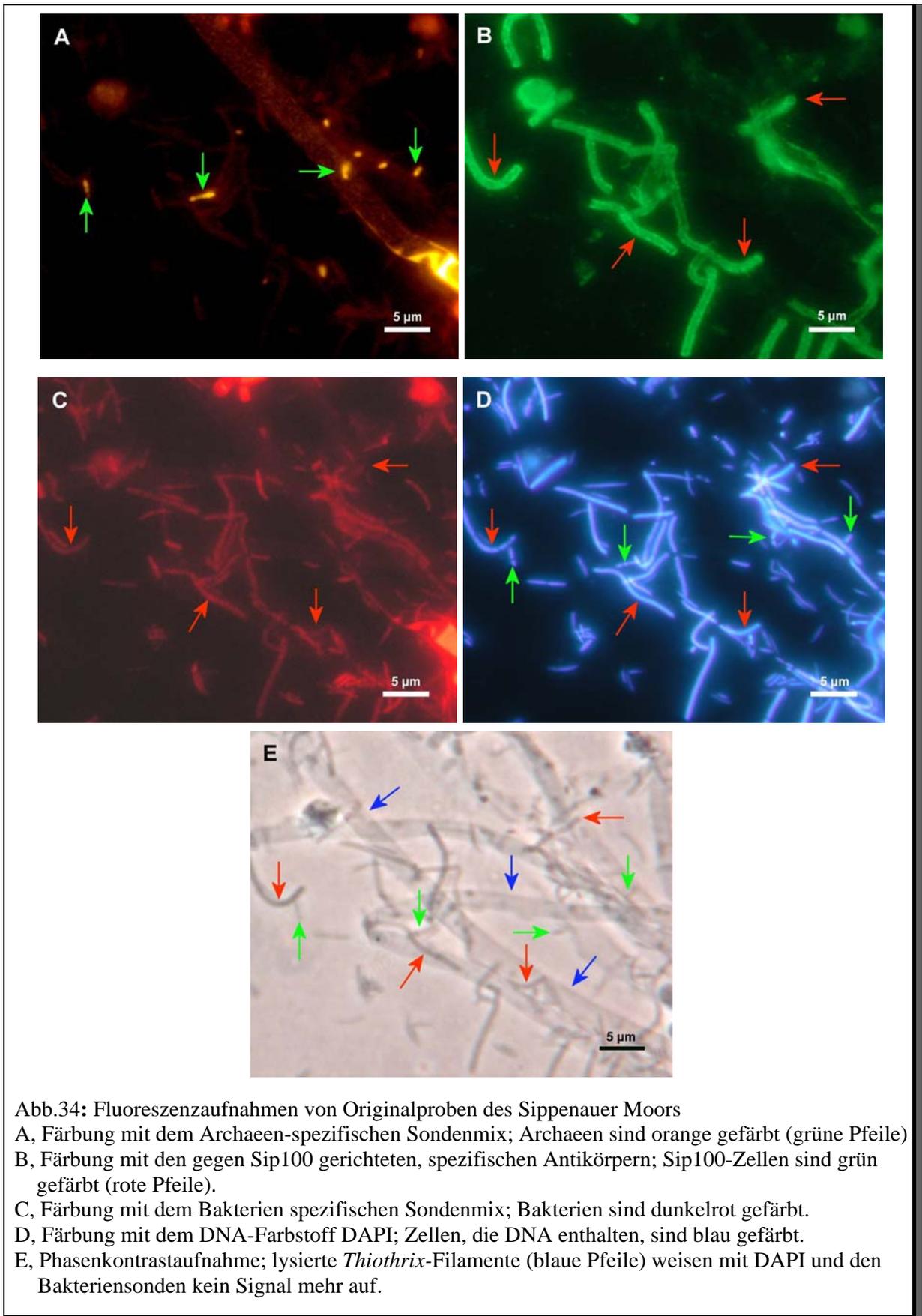
Zudem konnte gezeigt werden, dass FISH-gefärbte, befallene bakterielle Zellen im Gegensatz zu unbefallenen Zellen keine oder nur sehr leichte Fluoreszenz zeigten (Abb. 33). Dies ist, wie oben beschrieben, ein Anhaltspunkt dafür, dass die bakteriellen Zellen durch die anhaftenden *Crenarchaeota* geschädigt werden.

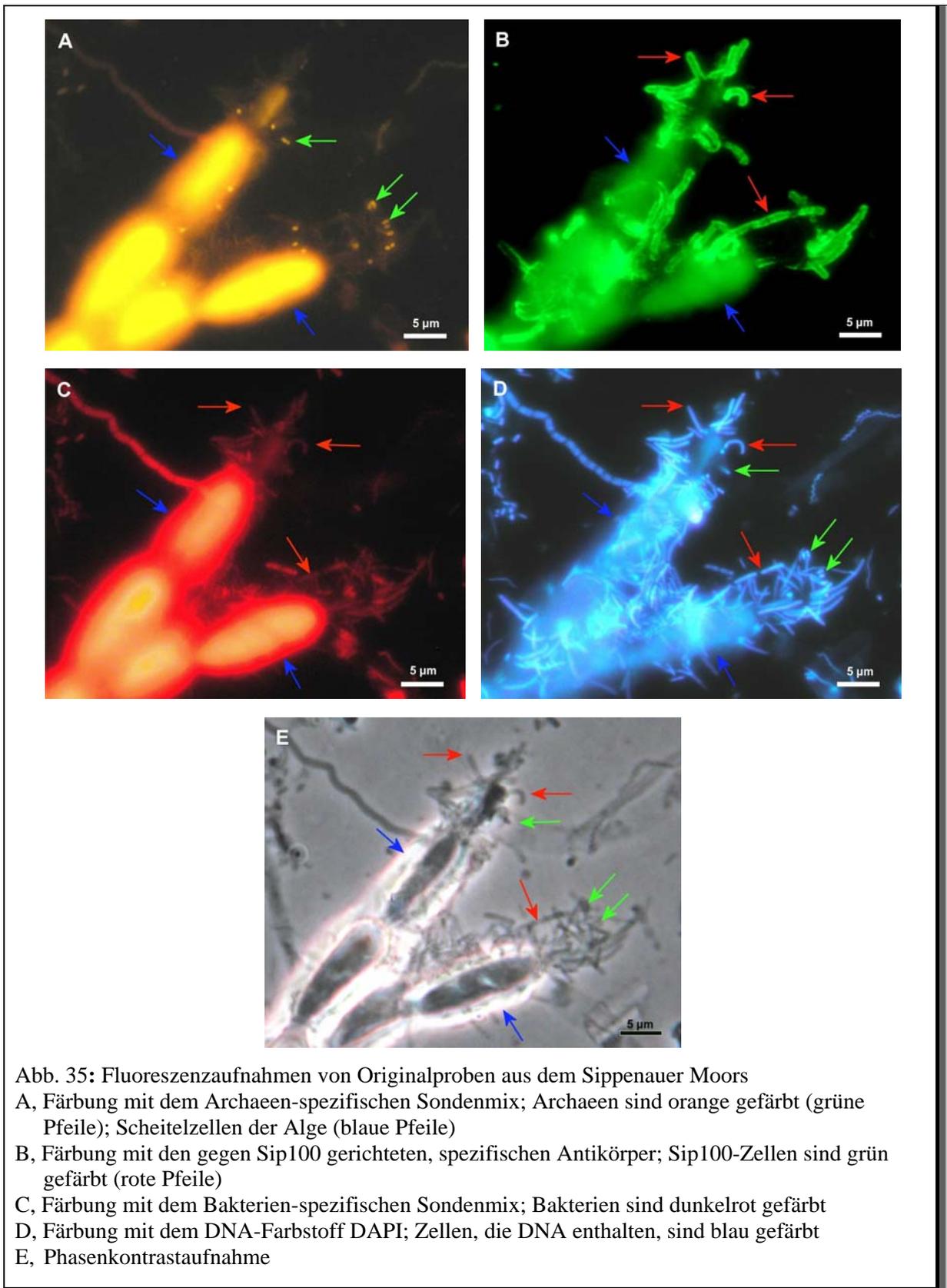


11.2 Erste Hinweise auf ein Drei-Domänen-System

Mit Hilfe der spezifischen Antikörper konnte erstmals gezeigt werden, dass die Sip100-Zellen sowohl an *Thiothrix*-Filamenten (Abb. 34) als auch an den Spitzen der Alge *Batrachospermum* sp. (Abb. 35) im 90°-Winkel angeheftet sein können. *Thiothrix* besitzt eine Scheide, die die Einzelzellen umgibt. Sip100 verstoffwechselt scheinbar Bestandteile der *Thiothrix*-Filamente, da stark befallene Filamente meistens sehr hyalin erscheinen und keine Einzelzellen mehr unterschieden werden können (Abb. 34, E). Zudem kann von befallenen Filamenten selbst mit DNA-Farbstoffen teilweise kein Signal mehr erhalten werden (Abb. 34, D).

Die Algen weisen Scheitelzellenwachstum auf, was eventuell die ausschließliche Anheftung der Sip100 Zellen an den vorderen Spitzen der Alge erklären könnte. Bei den Scheitelzellen handelt es sich um junge Zellen mit hoher Stoffwechselaktivität, durch die vermehrt Polymere abgegeben werden, die von den Sip100 Zellen verstoffwechselt werden könnten.





Bei der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft handelt sich also um ein drei-Organismensystem aus zwei Bakterien und einem Crenarchaeon bzw. um ein drei-Domänen-System aus einem Eukaryonten, einem Bakterium und einem Crenarchaeon.

12. Charakterisierung von Sip100

12.1 Phasenkontrastmikroskopie

Bei den Sip100-Zellen handelt es sich um lange (5-8 μm ; ca 0,8 μm Breite) gerade Stäbchen, die teilweise sehr lange (mehrere 100 μm) Filamente bilden können. Die Zellen lagern sich oft zu großen Clustern von mehreren hundert Zellen zusammen und können Rosetten aus mehreren Zellen ausbilden.

12.2 Kultivierung unter Standardbedingungen

Sip100-Zellen wurden standardmäßig bei 10°C in MM-Medium unter Zusatz von je 0,01% C-Org-Mix, Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig gezüchtet. Nach 3-4 Tagen wurden große, rosa gefärbte Flocken im Medium sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Kultur ihre maximale Endzellkonzentration von ca. $1\text{-}5 \times 10^7$ Zellen/ml erreicht. Eine genaue Bestimmung der Zellkonzentrationen war aufgrund der Aggregatbildung durch Sip100 nicht möglich.

12.3 Variation der Substrate

Sip100-Zellen wurden mit 0,001 % C-Org-Mix gezüchtet und anschließend auf verschiedene Substrate und Biopolymere überimpft (Tab. 11 und 12). Parallel dazu wurden die gleichen Versuche mit einer geringen Menge C-Org-Mix (0,001%) angesetzt, da unter Umständen kleine Mengen komplexer Zusatzstoffe die Verstoffwechslung von Biopolymeren stimulieren. Die Ansätze wurden für mehrere Monate inkubiert. Wachstum konnte ausschließlich bei Zusatz von C-Org-Mix und den einzelnen Bestandteilen des C-Org-Mixes (Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt und Brain Heart Infusion nachgewiesen werden.

12.4 Variation der Sauerstoffkonzentration

Dem Medium wurde kurz vor dem Animpfen von Sip100 steriler Sauerstoff in Konzentrationen von 0-20% (in 2,5%-Schritten) zugespritzt. Im Bereich von 2,5%-20% fand Wachstum von Sip100 statt. Im Bereich von 5-20% konnten keine Unterschiede in der

Endzellzahl und Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur festgestellt werden. In anaeroben Ansätzen fand kein Wachstum statt.

12.5 Variation des pH-Werts

Kurz vor dem Animpfen wurden bei den Medien pH-Werte von pH 4,0-9,0 eingestellt. Die Medien wurden aus der gleichen Stammkultur beimpft. Wachstum trat bei pH-Werten pH 4,5-8,0 auf, wobei das pH-Optimum bei pH 6,0-7,0 lag.

12.6 Variation der Temperatur

Aus den gleichen Vorkulturen wurden parallel Medien beimpft und bei Temperaturen von -2°C – 50°C inkubiert. Zu gleichen Zeiten wurden Proben entnommen und mikroskopiert. Wachstum konnte zwischen 0°C und 40°C festgestellt werden. Im Bereich von 8°C bis 37°C traten keine wesentlichen Unterschiede in der Endzellzahl und der Wachstumsgeschwindigkeit auf. Nur unter 6°C war langsames Wachstum festzustellen. Ab 40°C konnten zwar noch Zellen gesehen werden, eine Vermehrung erfolgte jedoch nicht mehr. Ab 45°C waren die Zellen teilweise hyalin oder lysiert.

12.7 Variation der Salzkonzentration

MM-Medium wurde mit NaCl-Konzentrationen von 0,05-0,6M versetzt. Die Medien wurden mit ca. 1×10^7 Sip100-Zellen beimpft und bei 10°C inkubiert. Selbst bei 0,05M Salz fand kein Wachstum statt. Lediglich im salzfreien Kontrollansatz wurde Wachstum beobachtet.

12.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Reinkultur Sip100 wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Es wurden sowohl verschiedene Kontrastierungsmethoden (Platin/Kohle-Bedampfung; Uranylacetat-Färbung) sowie Gefrierätzungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Sip100-Zellen eine sehr dicke Hülle um die einzelnen Zellen haben (Abb. 36). Über die Zusammensetzung der Hülle konnte jedoch keine Aussage gemacht werden. Bei den Gefrierätzungen wurde eine unregelmäßige Struktur in Längsrichtung der Zellen entdeckt (Abb. 37). Die Dicke der Hülle erklärt, warum die Sip100-Zellen mit Hilfe des Antikörper-FISH wesentlich dicker erscheinen als mit der DAPI-Färbung oder bei der Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 34). Zudem weisen die Zellen

an den Enden, an denen sie mit anderen Zellen verbunden sind, leichte Verdickungen auf, die eine Art „holdfast-material“ darstellen könnten (Abb. 36).

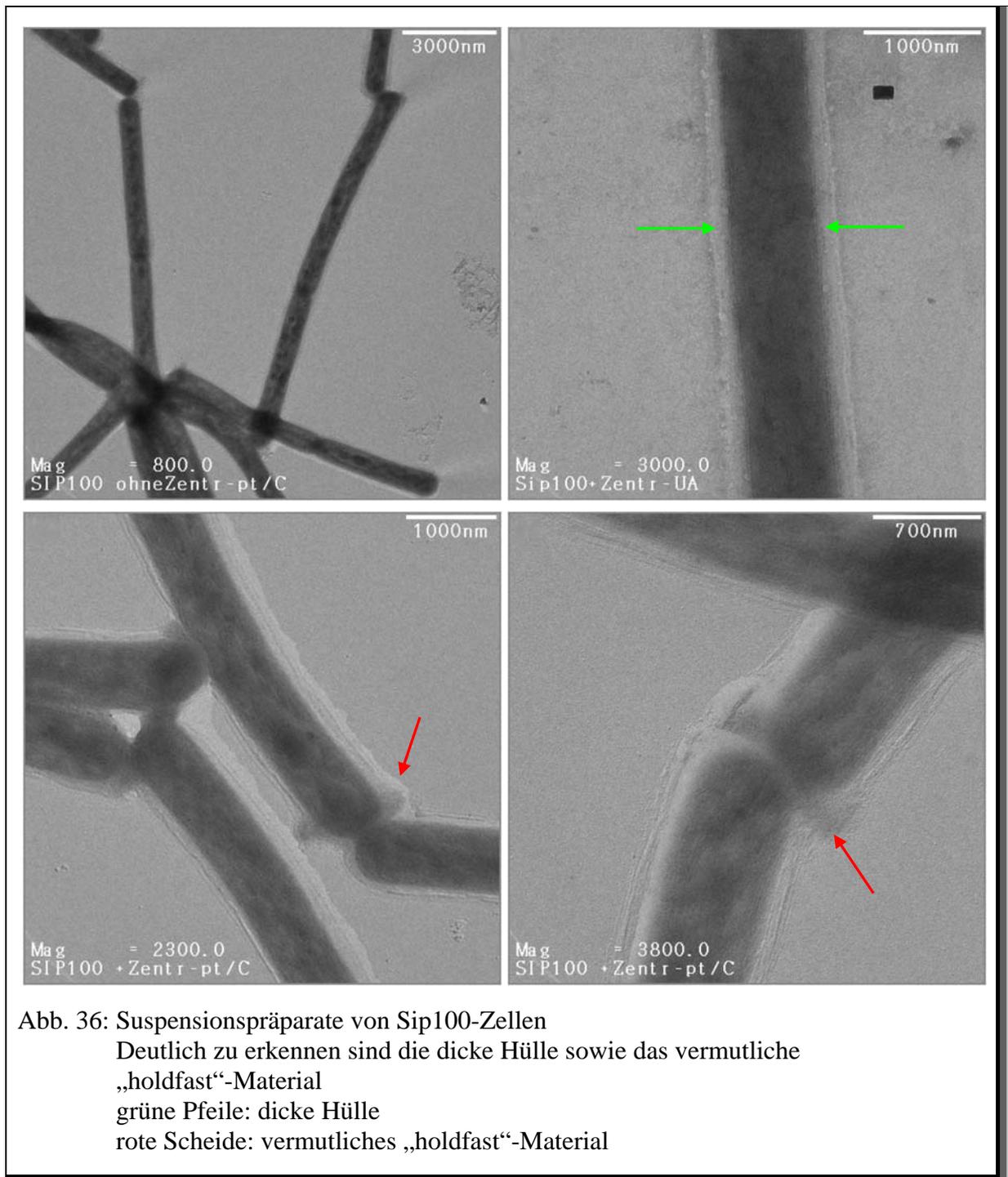


Abb. 36: Suspensionspräparate von Sip100-Zellen
Deutlich zu erkennen sind die dicke Hülle sowie das vermutliche „holdfast“-Material
grüne Pfeile: dicke Hülle
rote Scheide: vermutliches „holdfast“-Material

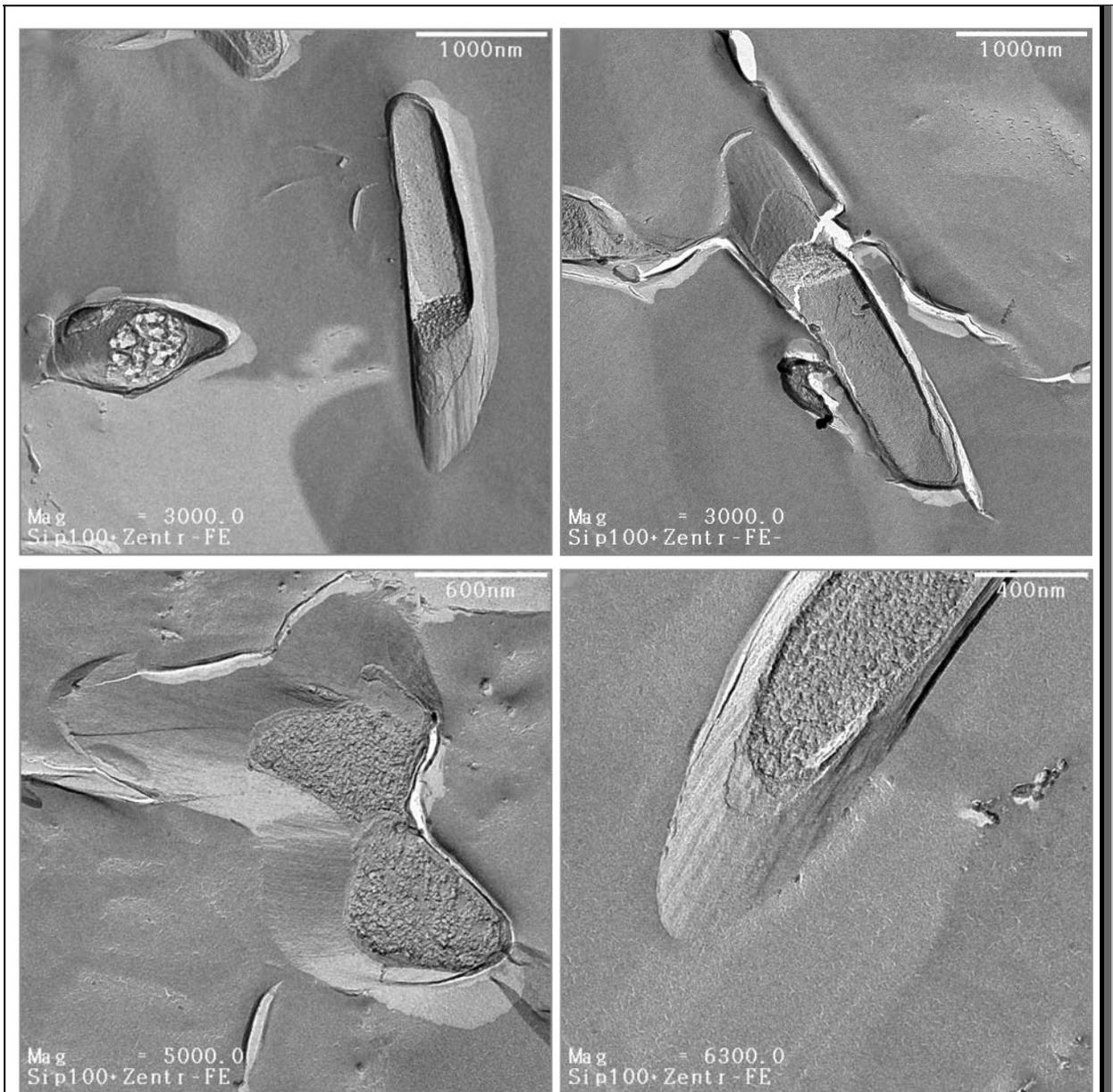


Abb. 37: Gefrierätzpräparate von Sip100-Zellen

Deutlich zu erkennen ist eine unregelmäßige Struktur in Längsrichtung der Zellen

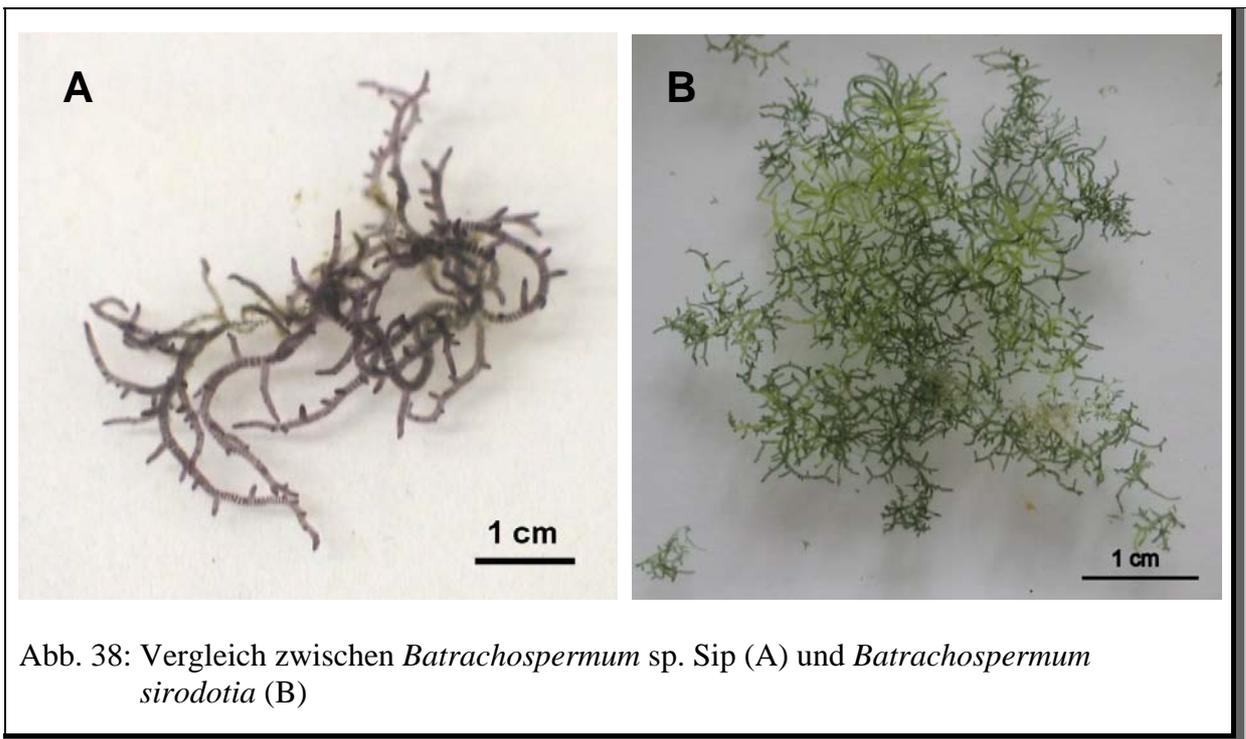
12.9 Kreuzkontaminationsversuche mit *Thiothrix nivea*

Die Sip100-Zellen waren in den Originalproben fast immer im 90°-Winkel an *Thiothrix*-Filamente angeheftet. Freie Zellen waren in den Originalproben nur selten durch FISH nachweisbar. Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob die Anheftung auch an andere *Thiothrix*-Arten stattfindet. Hierzu wurde *Thiothrix nivea* gezüchtet und exponentiell wachsende Sip100 Zellen zugesetzt. Außerdem wurden zu exponentiell wachsenden

Thiothrix-Zellen Sip100-Zellen zugegeben. Im Abstand von 48 h wurden die Kulturen mikroskopisch untersucht. Die beiden Organismen vermehrten sich zwar in den Kulturen, jedoch konnte auch nach einem Monat Inkubation keine aktive Anheftung der Sip100-Zellen an die *Thiothrix*-Filamente festgestellt werden.

12.10 Kreuzkontaminationsversuche mit der Alge *Batrachospermum sirodotia*

Da die Alge einen wesentlichen Bestandteil des Lebensraums darstellt, in dem die neuartige Lebensgemeinschaft vorkommt, wurde versucht, sowohl die Originalalge (*Batrachospermum* sp.) als auch die Reinkultur einer nahe verwandten Art (*Batrachospermum sirodotia*; Sammlung von Algenkulturen Göttingen) auf künstlichem Medium (MieB₁₂) im Labor zu züchten. *B. sirodotia* wies einen kleineren Filamentdurchmesser als die Originalalge auf und war auch sonst wesentlich feiner strukturiert (Abb. 38). Zur Anzucht der Originalalge wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt, jedoch konnte keine gut wachsende Algenkultur erhalten werden, weil Grünalgen der Begleitflora sich schneller vermehrten und die Froschlaichalge überwuchsen. Die Alge *Batrachospermum sirodotia* konnte unter Laborbedingungen (10°C bzw. 20°C; im Tages/Nacht-Zyklus mit einer Halogen-Tageslichtlampe bestrahlt) kultiviert werden. Vorversuche zeigten, dass Sip100 in dem Algenmedium ebenfalls langsam wachsen konnte. Um zu testen, ob Sip100 sich auch an *B. sirodotia* anheftet, wurde der Alge eine gut wachsende Sip100-Kultur zugesetzt. Zusätzlich wurden Algenfilamente in eine wachsende Sip100-Kultur überführt. Alle Versuche wurden bei 10°C und 20°C durchgeführt. Im Abstand von zwei Tagen wurden die Proben mikroskopisch überprüft. Nach einmonatiger Inkubation konnte in keinem der Versuche eine aktive Anheftung der Sip100- Zellen beobachtet werden.



13. Phylogenetische Untersuchungen an den Algen

Da die Algen anscheinend einen entscheidenden Einfluß auf das Wachstumsverhalten der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft haben, sollten diese genauer bestimmt und phylogenetisch eingeordnet werden.

13.1 Bestimmung der Gattung durch Mikroskopie

Eine erste Bestimmung der Algen wurde mikroskopisch von Dr. Besl (Lehrstuhl für Botanik, Universität Regensburg) durchgeführt. Er konnte die Alge bis auf die Gattung *Batrachospermum* (Froschlaichalge) bestimmen. Durch Recherchen im Internet und dem Botanik-Lehrbuch Strasburger konnte die morphologische Zugehörigkeit zu den *Rhodophyten* bestätigt werden. Es handelt sich bei dieser Alge um eine der wenigen Rotalgen, die in kalten Süßgewässern vorkommen. Die meisten Rotalgen sind marin. Diese Algen produzieren verschleimende Galactane wie Agar und Carrageen und weisen Scheitelzellenwachstum auf.

13.2 DNA-Isolierung, Sequenzierung und phylogenetische Einordnung

Für phylogenetische Untersuchungen, wurden Algenbüschel aus dem Bachlauf entnommen und im Labor mehrere Stunden auf einem Schüttler in sterilem Moorwasser gewaschen. Das Wasser wurde jede halbe Stunde gewechselt, um bakterielle Verunreinigungen und eukaryontische Mikroorganismen zu entfernen. Die DNA wurde wie in II.7.2 beschrieben isoliert. Die Amplifikation der 18S rRNA erfolgte mit den eukaryontischen Primern 9eF, 1242eR und 1525eR. Das erhaltene PCR-Produkt 9eF-1525eR wurde kloniert und einer ARDRA unterzogen.

Insgesamt wurden 35 Klone analysiert, welche über ARDRA und Sequenzierung neun unterschiedlichen 18S rRNA-Gensequenzen zuzuordnen waren (Tab. 29). Die erhaltenen Sequenzen konnten jedoch nicht der Rotalge zugeordnet werden.

<i>Klonanzahl</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>	<i>Nächster phylogenetischer Verwandter</i>
10	53%	Algen K2	<i>Cercomonas sp.</i>
2	11%	Algen K11	Unkultivierter Cercozoen-Klon
1	5%	Algen K1	<i>Cercomonas sp.</i>
1	5%	Algen K8	<i>Nais communis</i>
1	5%	Algen K18	<i>Microspora sp.</i>
1	5%	Algen K22	<i>Acinaeta sp.</i>
1	5%	Algen K25	Unkultivierter Cercozoen-Klon
1	5%	Algen K19	Nicht sequenziert
1	5%	Algen K32	Nicht sequenziert

Tab. 29: Daten der Klonierung 9eF-1525eR

Daraufhin wurden *Rhodophyten*-spezifische Primer (Saunders und Kraft, 1993; Tab. 15) verwendet. Hierzu wurde eine PCR mit den Primern EUKG01F, EUKG04F, EUKG07R und EUKG14R in der Kombination EUKG01F-EUKG14R und EUKG04F-EUKG07R unter Verwendung des Algen-spezifischen PCR-Programms (Tab 19) durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert, jedoch konnte nur mit dem PCR-Produkt EUKG01F-EUKG14R eine Sequenz erhalten werden. Die ca. 830 bp lange Sequenz wurde zur Einordnung in den 18S rRNA Stammbaum benutzt und bestätigte, dass es sich bei der Alge um eine *Batrachospermum*-Art handelt (Abb. 39). Die nächste verwandte Art ist

Batrachospermum gelatinosum mit einem phylogenetischem Abstand von ca. 0,36% (*Sirodotia suecica*: 0,72%; *Batrachospermum boryanum*: 0,84%; alle anderen 1-6%).

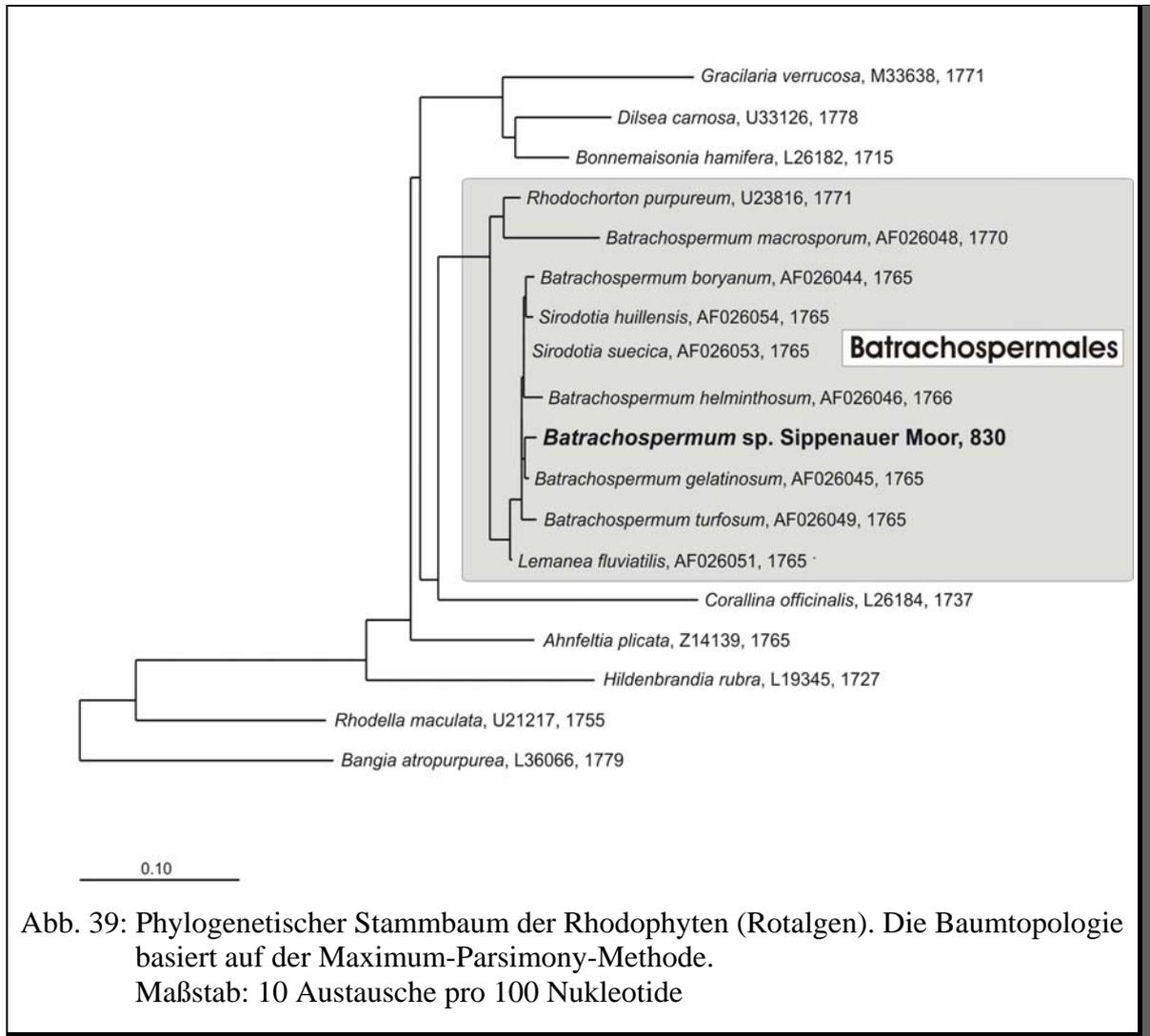


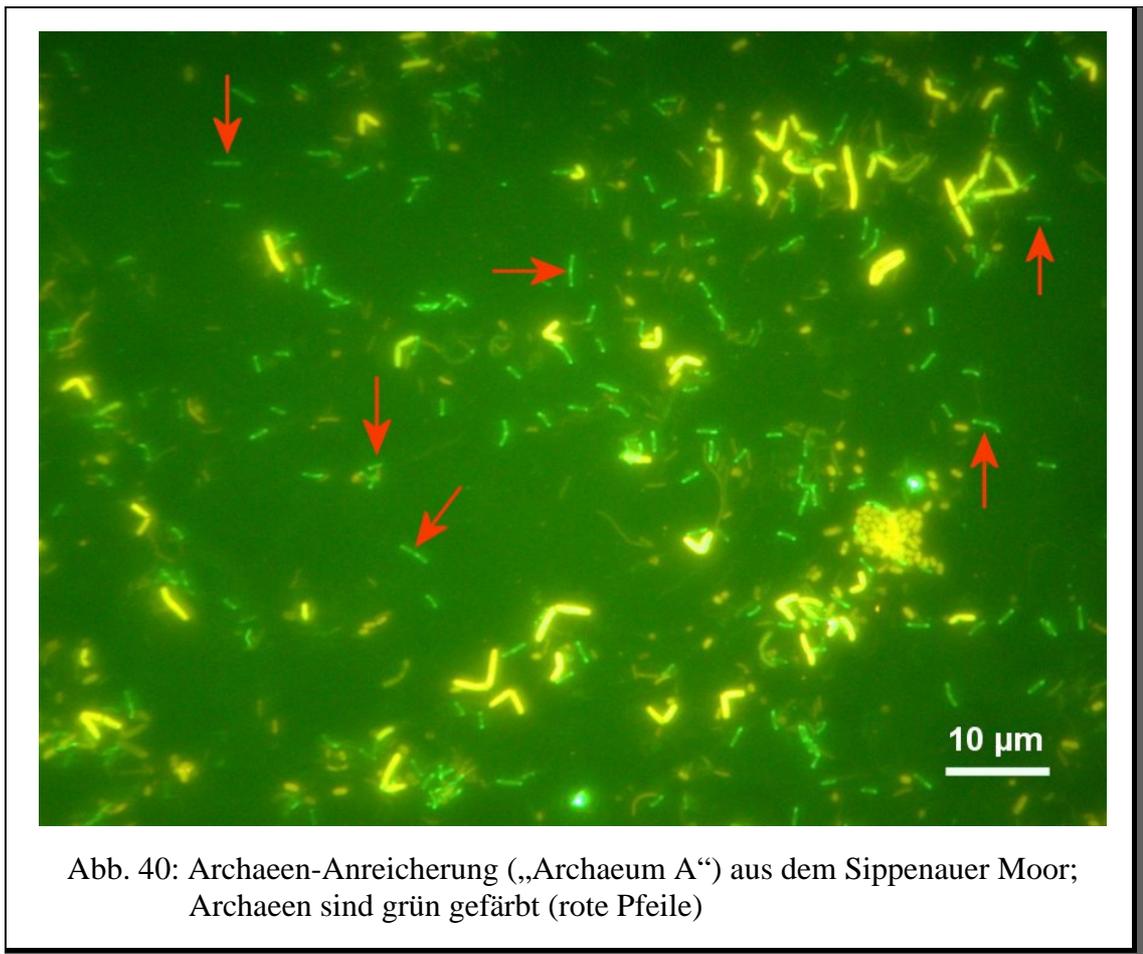
Abb. 39: Phylogenetischer Stammbaum der Rhodophyten (Rotalgen). Die Baumtopologie basiert auf der Maximum-Parsimony-Methode.
Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide

14. Anreicherung von Archaeen aus kalten sulfidischen Biotopen

Bei FISH-Untersuchungen an unterschiedlichsten mikrobiellen Matten und Filamenten wurden in den Biotopen Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach verschiedene archaeelle Morphotypen in sehr geringen Zellzahlen nachgewiesen. Durch Langzeitinkubations- und Kultivierungsstudien in Medien mit unterschiedlichen Substraten bei 10°C und 20°C wurden unterschiedliche mikrobielle Morphotypen angereichert. Bisher wurden bis zu acht verschiedene archaeelle Morphotypen nachgewiesen (Abb. 40-48), die durch FISH alle den *Euryarchaeota* zugeordnet wurden, aber bis auf einen bei 20°C kultivierten Vertreter nicht die typische Methanogenen-Fluoreszenz des Faktors 420 aufwies. Die erhaltenen Kulturen konnten über einen Zeitraum von ca. zwei Jahren in stabilen Laborkulturen teilweise mehr als zehn mal transferiert werden, wobei die Generationszeiten im Laufe weiterer Überimpfungen im Vergleich zu den ersten Anreicherungen abnahmen.

14.1 Anreicherung von Archaeen aus dem Sippenauer Moor

Für die Anreicherung von Archaeen aus dem Sippenauer Moor wurden aufgereinigte Streamer (siehe III.6.1) verwendet. Es wurden Verdünnungen von 10^{-2} - 10^{-8} in Moormedium hergestellt und bei 10°C und 20°C inkubiert. Zusätze waren standardmäßig je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig. Nach wenigen Wochen wurden viele unterschiedliche Morphotypen von Mikroorganismen nachgewiesen. Durch FISH-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei nahezu allen Organismen um Bakterien handelte. Nur sehr vereinzelt zeigten Stäbchen eine leichte Färbung mit dem Archaeenspezifischen Sondenmix. Nach etwa 6 Monaten Inkubation wurde eine Abnahme der Bakterien- und eine Zunahme der Archaeenpopulation beobachtet. Die Archaeen konnten in den Kulturen mit einem Anteil von 30-45% der Gesamtpopulation nachgewiesen werden (Abb. 40). Nach der ersten Überimpfung wuchsen die Archaeen wesentlich schneller als in der ersten Anreicherungskultur, so dass die Kulturen teilweise bereits nach 4 Wochen gut mit Archaeen bewachsen waren. Hierbei handelte es sich um Stäbchen von ca. 1,5 µm - 4 µm Länge und ca. 0,5 µm Durchmesser (Phasenkontrastmikroskopie), wobei längere Zellen in der Mitte teilweise leicht gebogen waren. Die Zellen färbten nur leicht und partiell mit dem archaeellen Sondenmix (Abb. 40; „Archaeum A“).



14.2 Anreicherung von Archaeen aus dem Islinger Mühlbach

Für die Anreicherung von Archaeen aus dem Islinger Mühlbach wurden weiße Biofilmmatten verwendet, die am Grunde des Bachlaufs Blätter und Sediment überzogen (III.2.2.2). Die Biofilmmatten wurden anaerob entnommen und anaerob und gekühlt (4-10°C) ins Labor transportiert. In der Anaerobenkammer wurden die Biofilme durch starkes Schütteln zerkleinert und kurz zentrifugiert (Picofuge MC-13, 10.000 Upm, 3-5 s), um größere *Thiothrix*-Filamente und Sediment abzutrennen. Mit dem trüben Überstand wurde Aubach-Medium mit verschiedenen Zusätzen angeimpft (Tab. 30).

<i>Ansatz</i>	<i>Substrate</i>	<i>Gasphase</i>
1	Je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂
2	Je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂
3	Je 0,01% Hefeextrakt, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂
4	Je 0,01% Hefeextrakt, Na-Thiosulfat und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂
5	Je 0,01% Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂
6	Je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂ + 0,5% O ₂
7	Je 0,01% C-Org, Na-Thiosulfat und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂ + 0,5% O ₂
8	Je 0,01% Hefeextrakt, Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂ + 0,5% O ₂
9	Je 0,01% Hefeextrakt, Na-Thiosulfat und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂ + 0,5% O ₂
10	Je 0,01% Na-Thiosulfat, Glucose und 0,01x Vitamine nach Pfennig	N ₂ + 0,5% O ₂

Tab. 30: Anreicherungsansätze aus dem Islinger Mühlbach

Nach wenigen Wochen Inkubation konnten wie bei den Ansätzen aus dem Sippenauer Moor viele unterschiedliche Morphotypen nachgewiesen werden. Durch FISH-Analysen wurde gezeigt, dass es sich bei fast allen Organismen um Bakterien handelt. Vereinzelt zeigten Kokken und Stäbchen eine leichte Färbung mit der Archaeen-spezifischen Sonde. Nach ca. 6 Monaten Inkubation hatte die bakterielle Population stark abgenommen, und es konnte eine Zunahme von Archaeen unterschiedlicher Morphologie verzeichnet werden. Insgesamt wurden etwa acht verschiedene archaeelle Morphotypen nachgewiesen (Abb. 41-48). Durch mehrfache Überimpfungen konnte die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten Archaeen im Vergleich zu den ersten Anreicherungen erhöht werden.

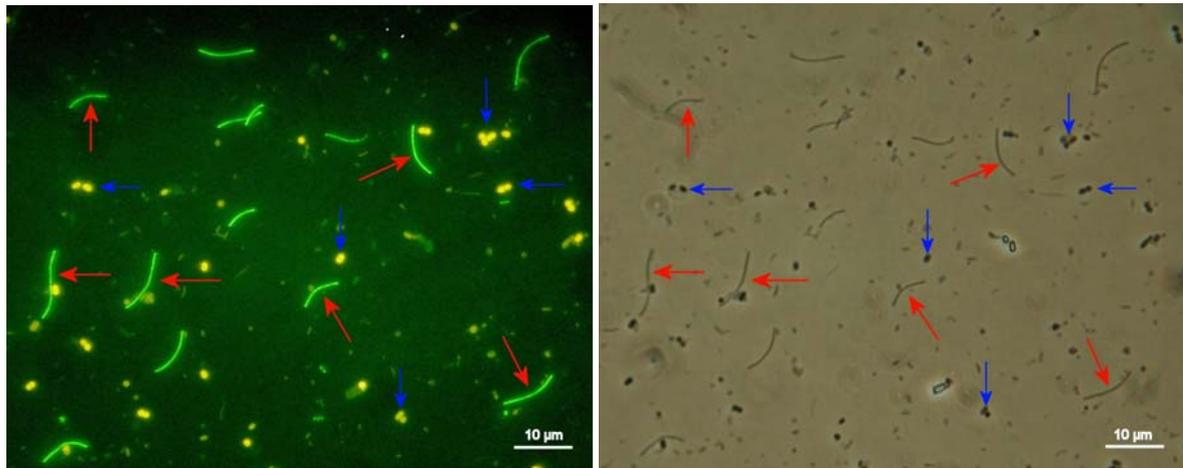


Abb. 41: Anreicherung von langen, dünnen Archaeen (rote Pfeile; „Archaeum B“), die mit einem Bakterium (IM4; s. III.14.11.2) in Kultur vorkommen (blaue Pfeile)

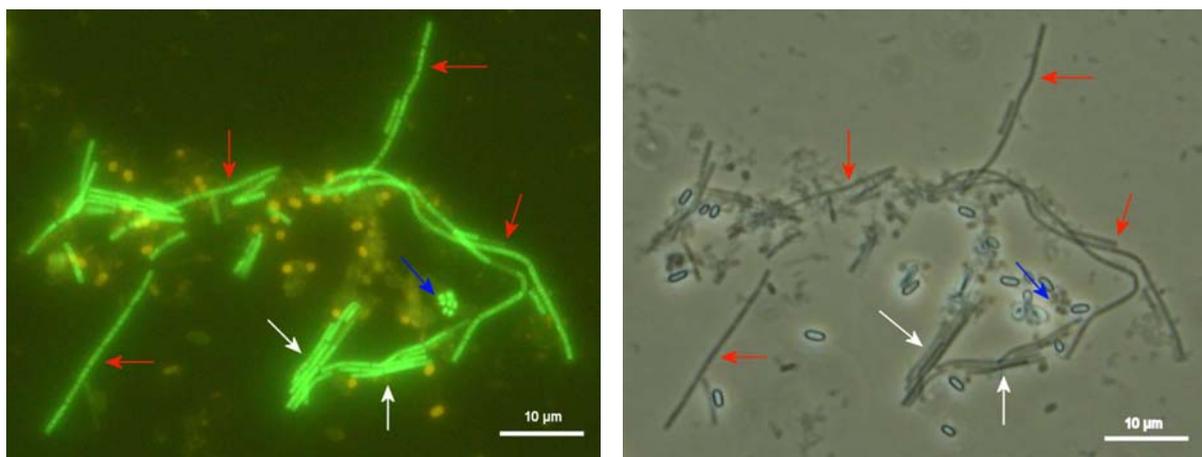
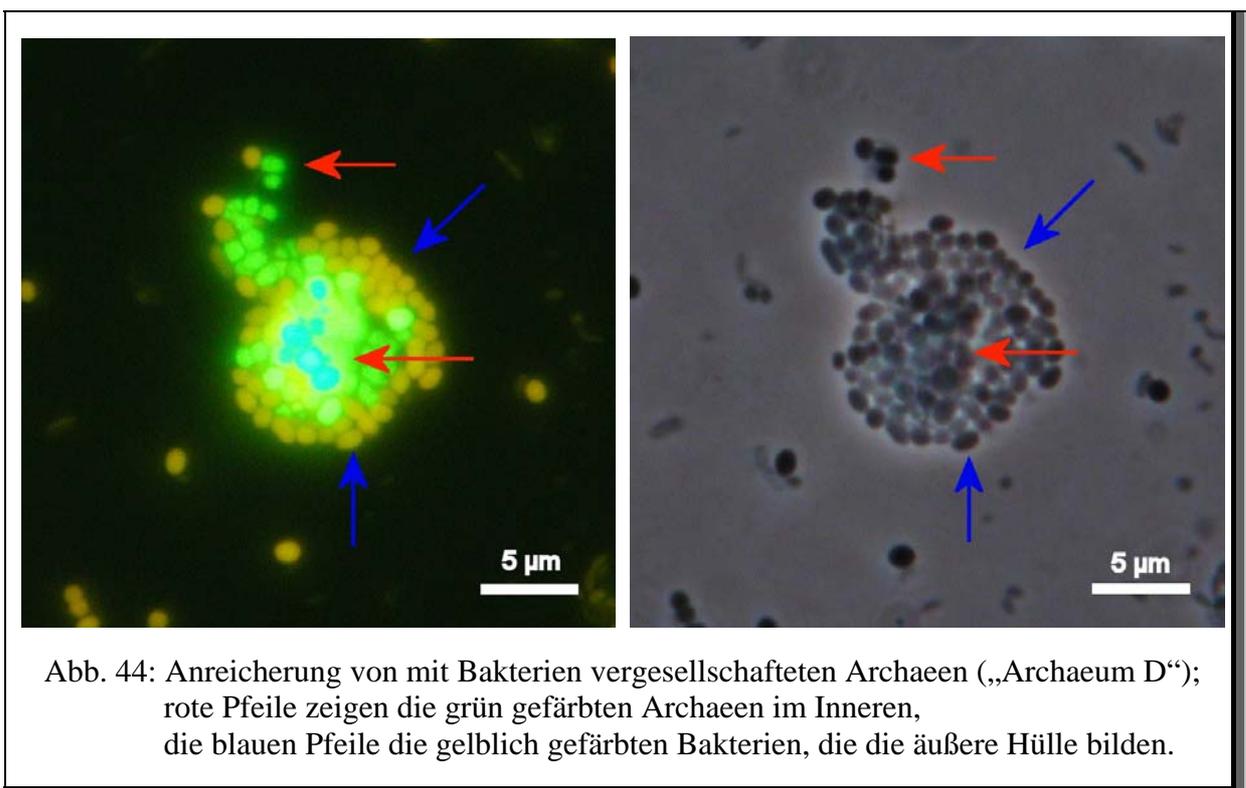
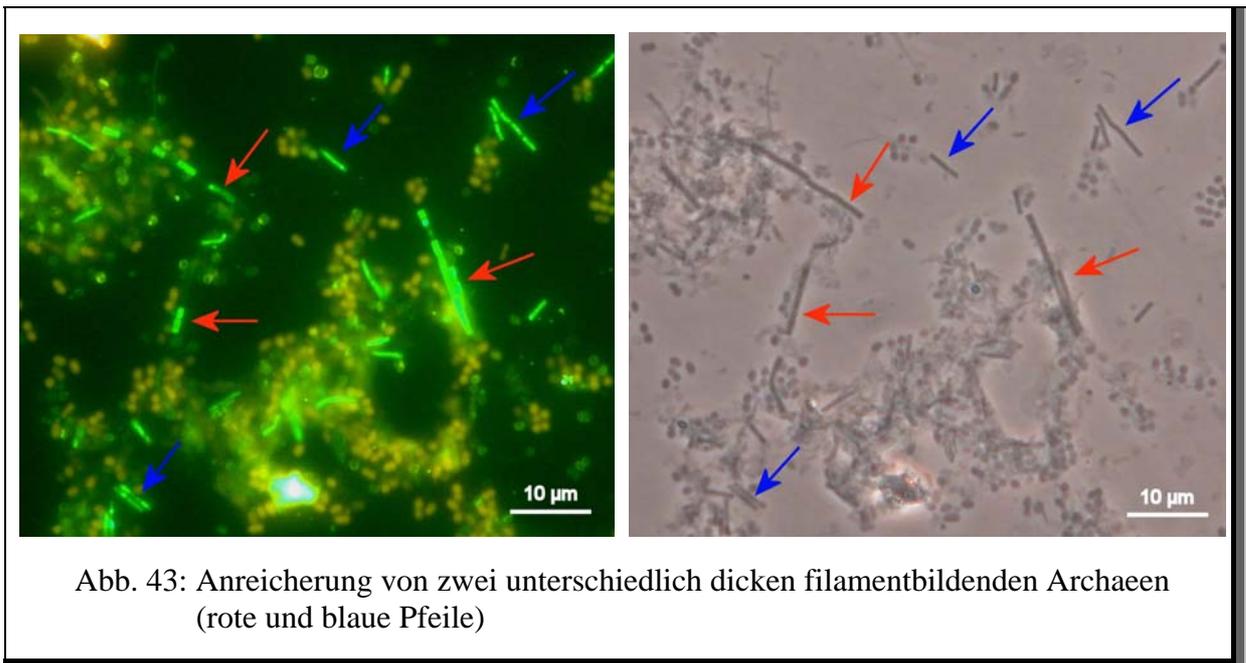
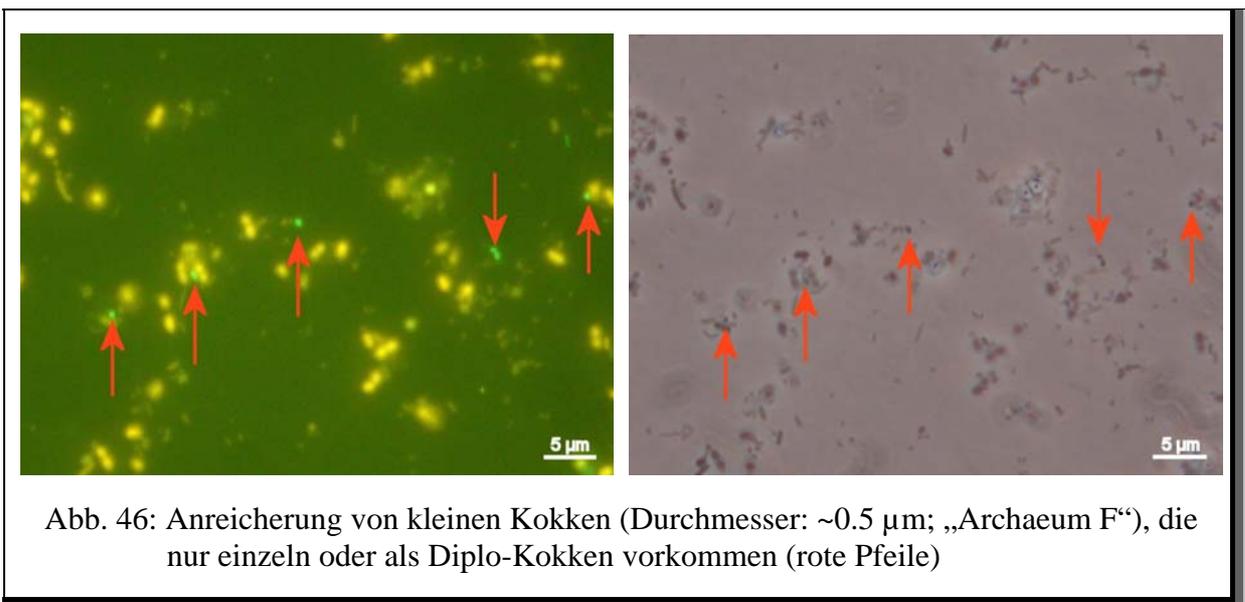
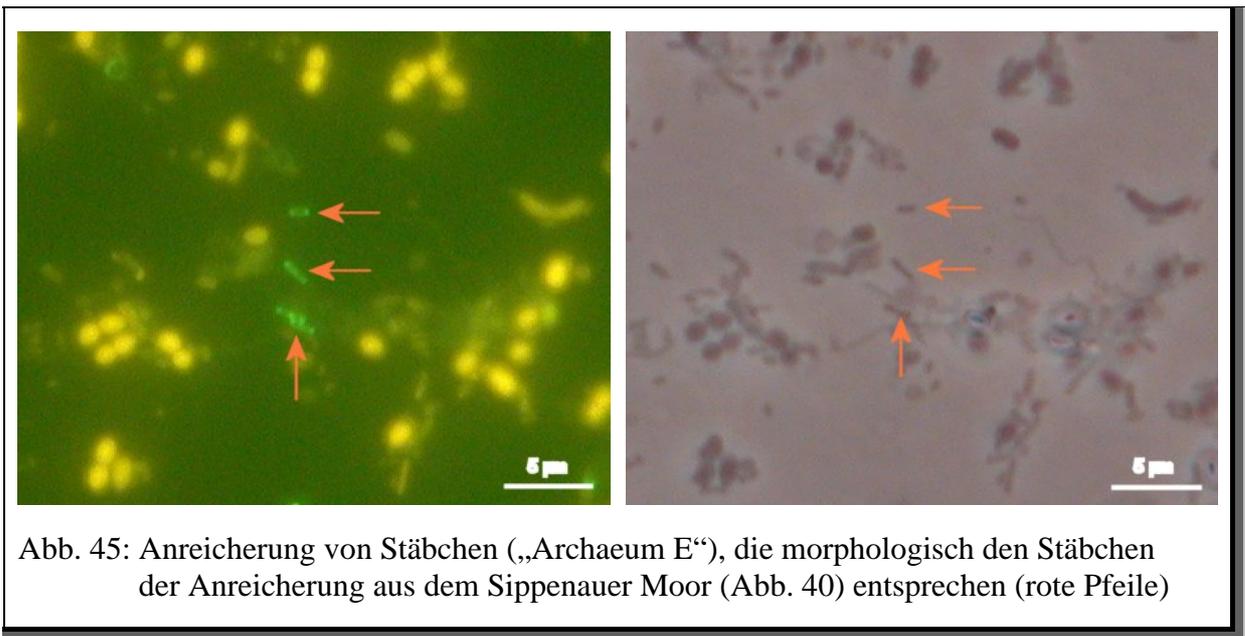


Abb. 42: Anreicherung filamentbildender Archaeen („Archaeum C“).
 Filamente, mit einer Länge von teilweise mehr als 100 µm (rote Pfeile),
 die vereinzelt Bündel bilden können (weiße Pfeile).
 Ansammlung von Sarcinen-bildenden Archaeen (blaue Pfeile).
 A, Fluoreszenzaufnahme der Archaeen.
 B, Phasenkontrastaufnahme der Archaeen.





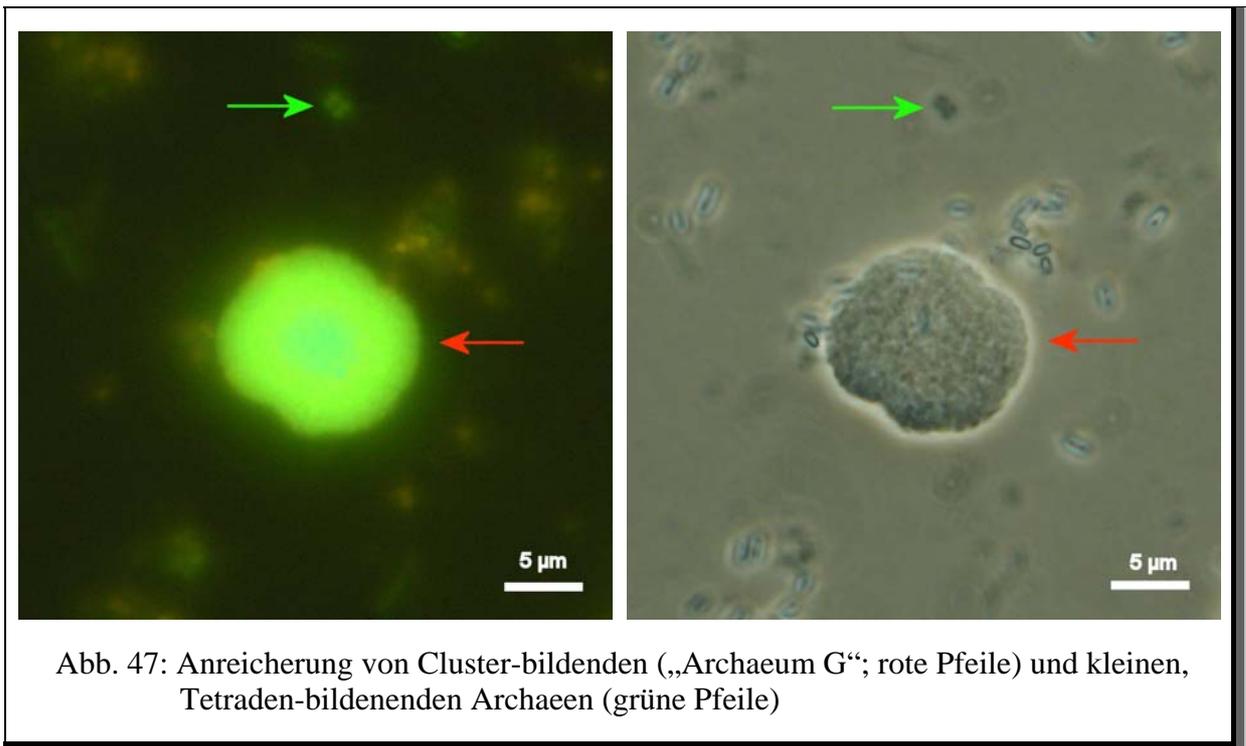


Abb. 47: Anreicherung von Cluster-bildenden („Archaeum G“; rote Pfeile) und kleinen, Tetraden-bildenden Archaeen (grüne Pfeile)

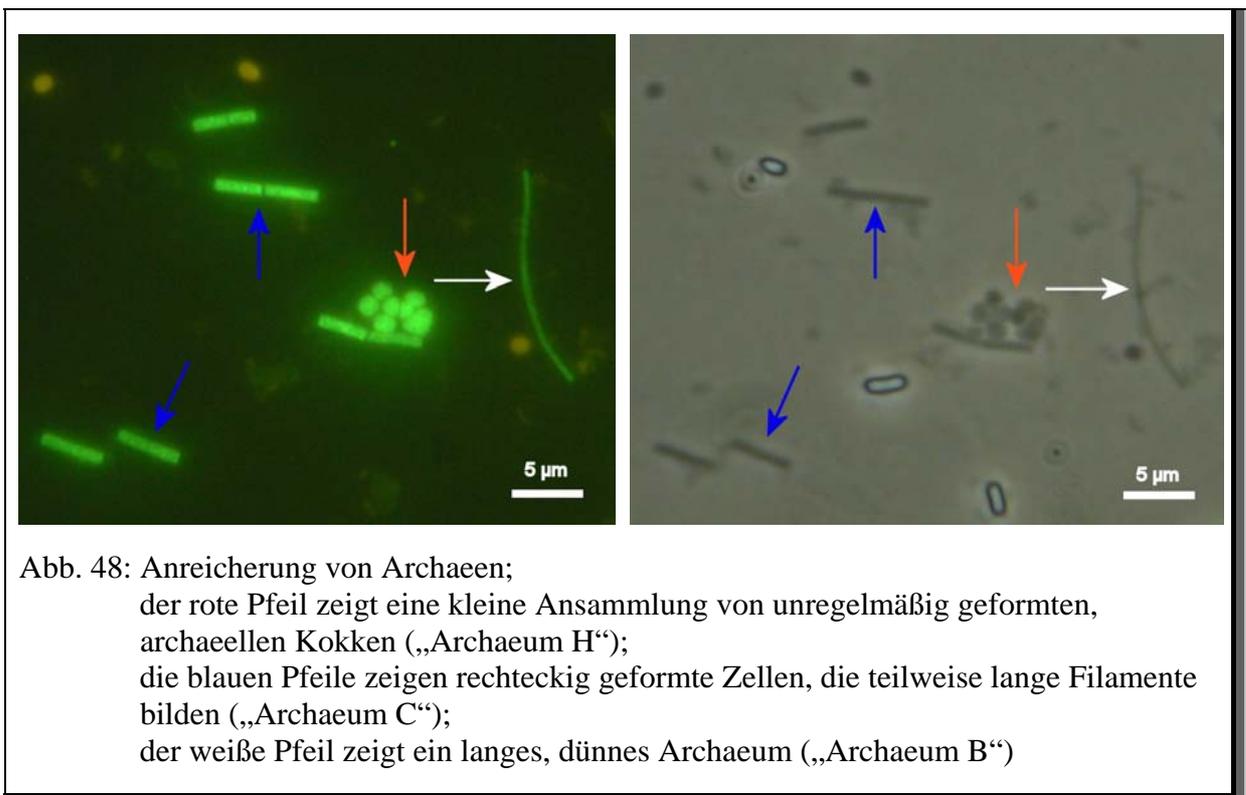


Abb. 48: Anreicherung von Archaeen;
 der rote Pfeil zeigt eine kleine Ansammlung von unregelmäßig geformten, archaeellen Kokken („Archaeum H“);
 die blauen Pfeile zeigen rechteckig geformte Zellen, die teilweise lange Filamente bilden („Archaeum C“);
 der weiße Pfeil zeigt ein langes, dünnes Archaeum („Archaeum B“)

14.3 Phylogenetische Untersuchungen der Isolate

Um die unterschiedlichen Anreicherungen und deren Archaeen auch auf genetischer Ebene zu untersuchen, wurde von Kulturen die Gesamt-DNA isoliert. Dazu wurden Mischungen aus den unterschiedlichen Anreicherungen hergestellt, von denen die Gesamt-DNA isoliert wurde, um alle archaeellen Sequenzen zu erhalten. Mit den beiden DNAs (DNA aus der Anreicherung des Sippenauer Moors; Misch-DNA aus fünf Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach) wurden PCR-Ansätze mit unterschiedlichen archaeellen Primerkombinationen durchgeführt (8aF-1406uR, 8aF-1512uR, 8aF-1119aR, 344aF-1406uR, 344aF-1512uR, 344aF-1119aR, 28aF-1406uR, 28aF-1512uR, 28aF-1119aR, 28aF-457R). Mit allen archaeellen Primerkombinationen konnten PCR-Produkte erhalten werden. Die PCR-Produkte 8aF-1406uR der zwei DNAs wurden in eine Klonierung eingesetzt. Die Ansätze mit crenarchaeell/archaeellen Primerkombinationen (28aF-1406uR, 28aF-1512uR, 28aF-1119aR, 28aF-457R) lieferten keine Ergebnisse

14.4 Phylogenetische Analysen der Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor

Nach der Klonierung wurden insgesamt 23 Klone analysiert, welche über ARDRA und Sequenzierung zwei verschiedene 16S rRNA-Gensequenzen lieferten (Tab. 31). Diese Gensequenzen wurden innerhalb der *Euryarchaeota* eingeordnet.

<i>Häufigkeit innerhalb der Klone</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
5	56%	1K10con
4	44%	1K16con

Tab: 31: Daten der Klonierung 8aF-1406uR

Zusätzlich wurde versucht mit crenarchaeellen Primern PCR-Produkte zu erhalten. Hierzu wurden die PCR-Produkte 8aF-1406uR, 8aF-1512uR und 8aF-1119aR vereinigt, und eine Nested-PCR mit den Primern 28aF-1119aR durchgeführt. Es wurden 22 Klone analysiert, welche nach ARDRA und Sequenzierung nur eine 16S rRNA-Sequenz ergaben (2K13con; Abb. 49). Diese Sequenz wurde trotz der Amplifikation mit dem crenarchaeellen Primer 28aF innerhalb der *Euryarchaeota* eingeordnet.

14.5 Phylogenetische Analysen der Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach

Nach der Klonierung wurden insgesamt 46 Klone analysiert. Aus diesen konnten insgesamt 10 verschiedene 16S rRNA Gensequenzen identifiziert werden (Tab. 32). Diese wurden alle den *Euryarchaeota* zugeordnet (Abb. 49).

<i>Häufigkeit innerhalb der Klone</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
7	24%	3K5con
5	17%	3K1con
5	17%	3K24con
4	14%	3K15con
2	7%	3K14con
2	7%	3K45con
1	3%	3K20con
1	3%	3K43con
1	3%	Nicht sequenziert
1	3%	Nicht sequenziert

Tab. 32: Daten der Klonierung 8aF-1406uR

Auch hier wurde versucht, ein crenarchaeelles PCR-Produkt zu erhalten. Hierzu wurden die PCR-Produkte 8aF-1406uR, 8aF-1512uR und 8aF-1119aR vereinigt, und eine Nested-PCR mit den Primern 28aF-1119aR durchgeführt. Es wurden 26 Klone analysiert, welche nach ARDRA und Sequenzierung sechs verschiedene 16S rDNA-Sequenzen ergaben. Von diesen Sequenzen wurden fünf den *Euryarchaeota* (Abb. 49) zugeordnet. Eine Sequenz (4/K6con) konnte den *Crenarchaeota* zugeordnet werden (Abb. 49).

<i>Häufigkeit innerhalb der Klone</i>	<i>Anteil an Gesamtklonsequenzen</i>	<i>Sequenzname</i>
4	33%	4K6con
3	25%	Nicht sequenziert
2	17%	4K3con
1	8%	4K4con
1	8%	4K7con
1	8%	4K13con

Tab. 33: Daten der Klonierung der Nested-PCR 28aF-1119aR

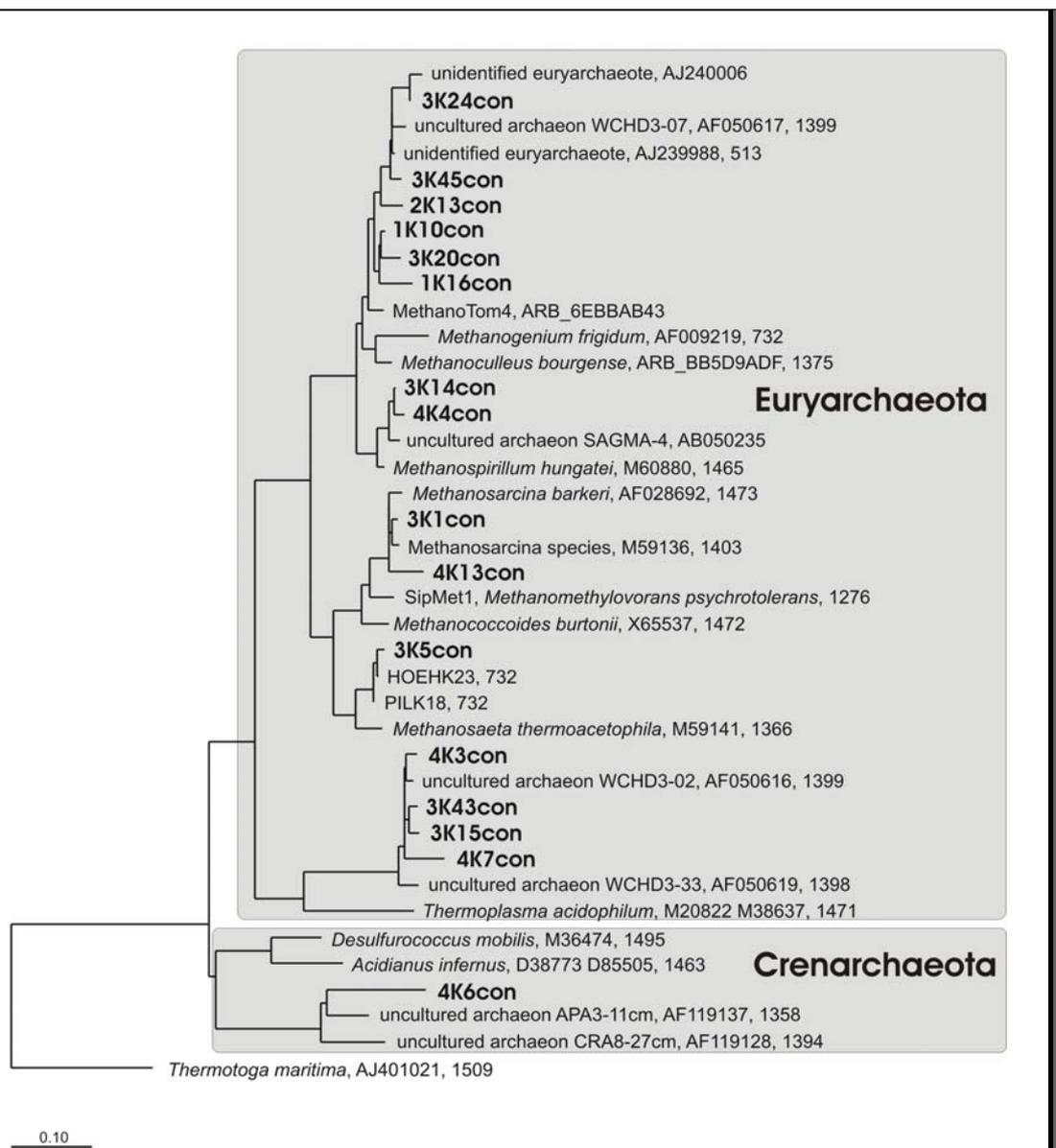


Abb. 49: Phylogenetische Position der archaeellen Klone im 16S rRNA-Stammbaum basierend auf einer Maximum-Parsimony Analyse
 Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide

14.6 Konstruktion von FISH-Sonden basierend auf der crenarchaeellen Klonsequenz

Basierend auf der Klonsequenz 4K6con wurden die FISH-Sonden Cren174, Cren231 und Cren630 (s. II.11.2) konstruiert. Mit diesen Sonden wurden FISH-Untersuchungen mit verschiedenen Formamid-, Salz- und Sondenkonzentrationen an den Anreicherungskulturen durchgeführt. Ebenso wurden Mischungen der Sonden eingesetzt. Mit keiner der Sonden wurde ein positives Hybridisierungssignal erhalten.

14.7 Physiologische Untersuchungen der Isolate

14.7.1 Medienvariation

Für die Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor und dem Islinger Mühlbach wurden Versuche mit unterschiedlichen Medien und Zusätzen durchgeführt. Dadurch sollten einzelne Archaeen zu stärkerem Wachstum angeregt oder durch die Hemmung anderer Archaeen oder Bakterien von diesen abgetrennt werden. Hierzu wurden die einzelnen Anreicherungen parallel auf MS-, MM- und Moor- bzw. Aubachmedium überimpft. Dem MM-, Moor- und Aubachmedium wurden zusätzlich 0,01% C-Org und 0,01% Dimethylamin zugegeben. Bei allen Ansätzen wurde im Vergleich mit dem Original Moor- bzw. Aubachmedium keine höheren archaeellen Zellzahlen oder Wachstumsgeschwindigkeiten erzielt. Die archaeellen Zellzahlen waren zudem geringer als in den Originalansätzen. Zusätzlich wurden Versuche mit Na₂S-reduzierten (0,5 g/l) Moor- und Aubachmedien durchgeführt. Auch hier zeigte sich leicht vermindertes Wachstum im Vergleich zu den mit N₂ durchgasteten Medien.

Die Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor wurden zusätzlich auf *Methanogenium bourgense*-Medium überimpft. Es wurde zwar langsameres Wachstum beobachtet, jedoch konnten die meisten Bakterien gehemmt werden.

14.7.2 Variation der Gasphasen

Neben der normalen Gasphase N₂ wurden auch noch Versuche mit der N₂/H₂/CO₂-Gasmischung (65%/15%/20%; v/v) bei 10°C und 20°C durchgeführt. Auch hier konnte kein besseres Wachstum der Archaeen beobachtet werden. In den meisten Ansätzen war das Wachstum sogar leicht reduziert.

14.7.3 Variation der Temperatur

Mit den Kulturen des Archaeums B aus dem Islinger Mühlbach (Abb. 41) und des Archaeums A aus dem Sippenauer Moor (Abb. 40) wurden Temperaturreihen von 2°C-40°C angeimpft.

Für Archaeum B wurde Wachstum von 4°C-30°C festgestellt. Bei Temperaturen über 37°C wurden keine Zellen mehr nachgewiesen. Das Optimum lag bei 30°C.

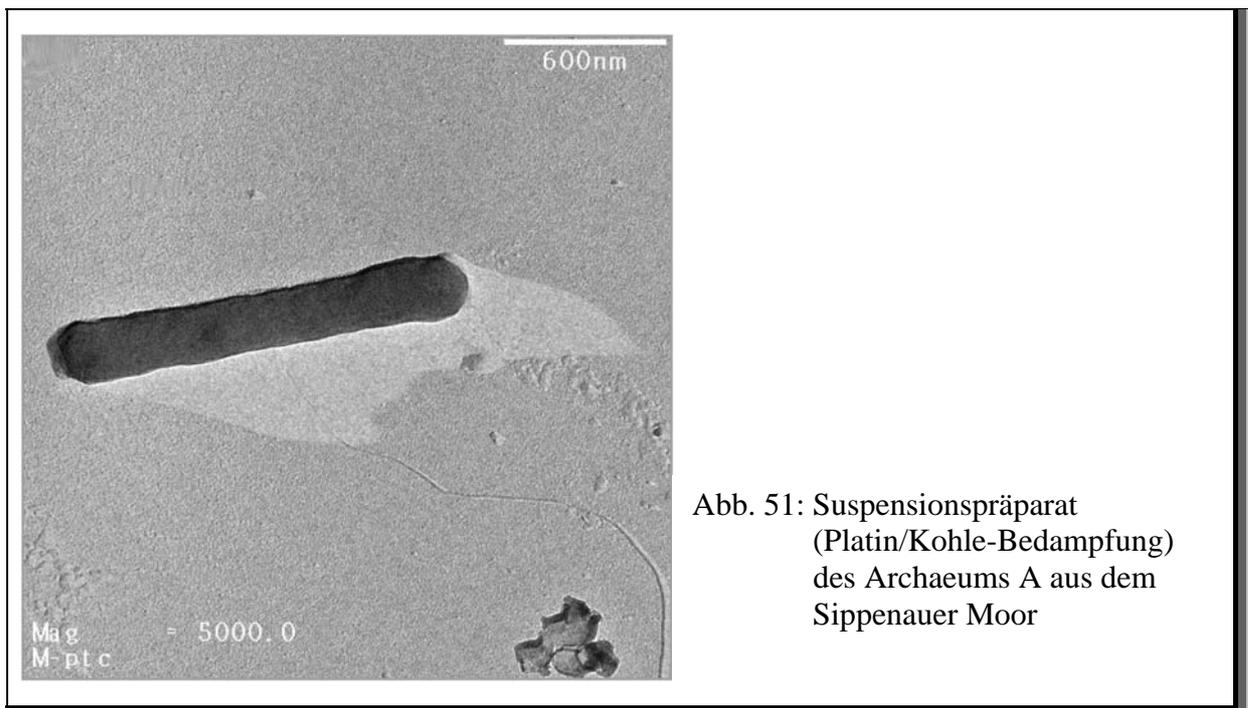
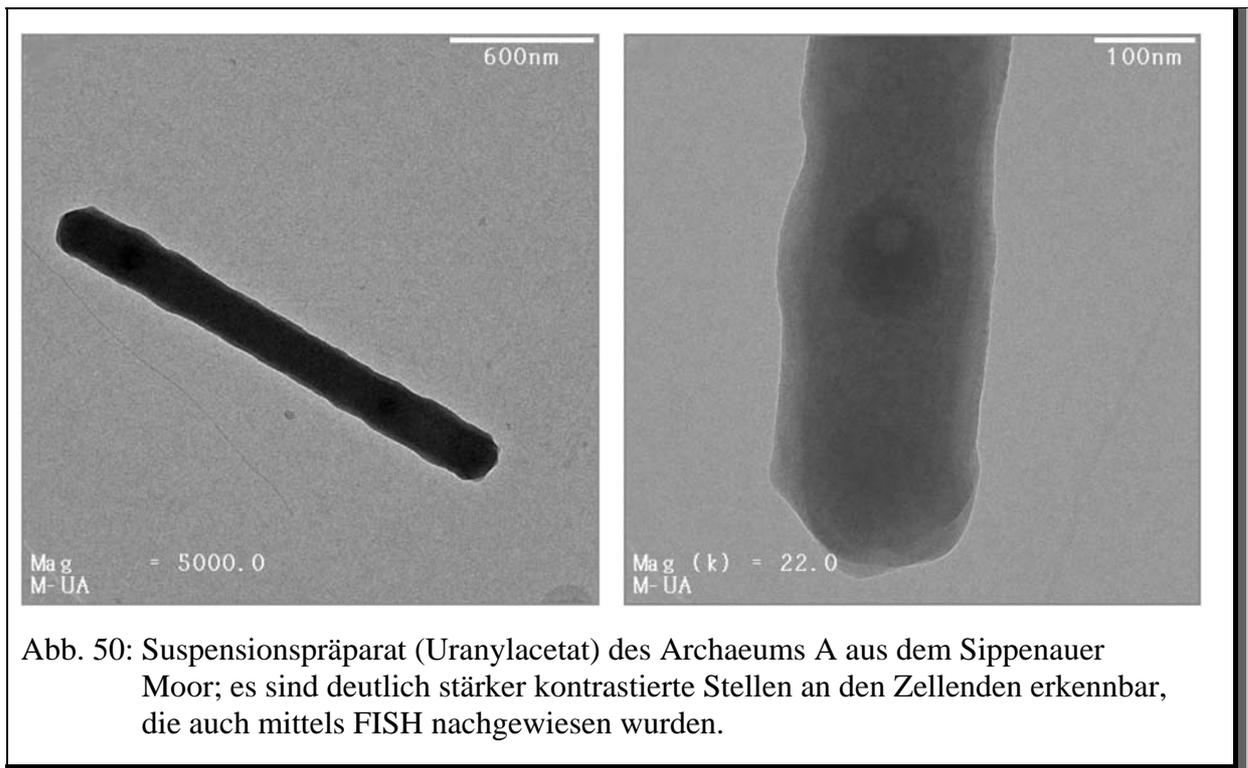
Archaeum A wuchs zwischen 2°C und 30°C. Bei 30°C waren nur noch wenige Zellen vorhanden, jedoch waren diese teilweise doppelt so lang (~5-7µm). Bei 37°C fand kein Wachstum mehr statt. Das Wachstumsoptimum lag bei etwa 20°C.

14.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zu einigen Isolaten

Mit einigen Isolaten wurden unterschiedliche Techniken zur Darstellung der Zellen mit Hilfe des Elektronenmikroskops durchgeführt (siehe II.5.5).

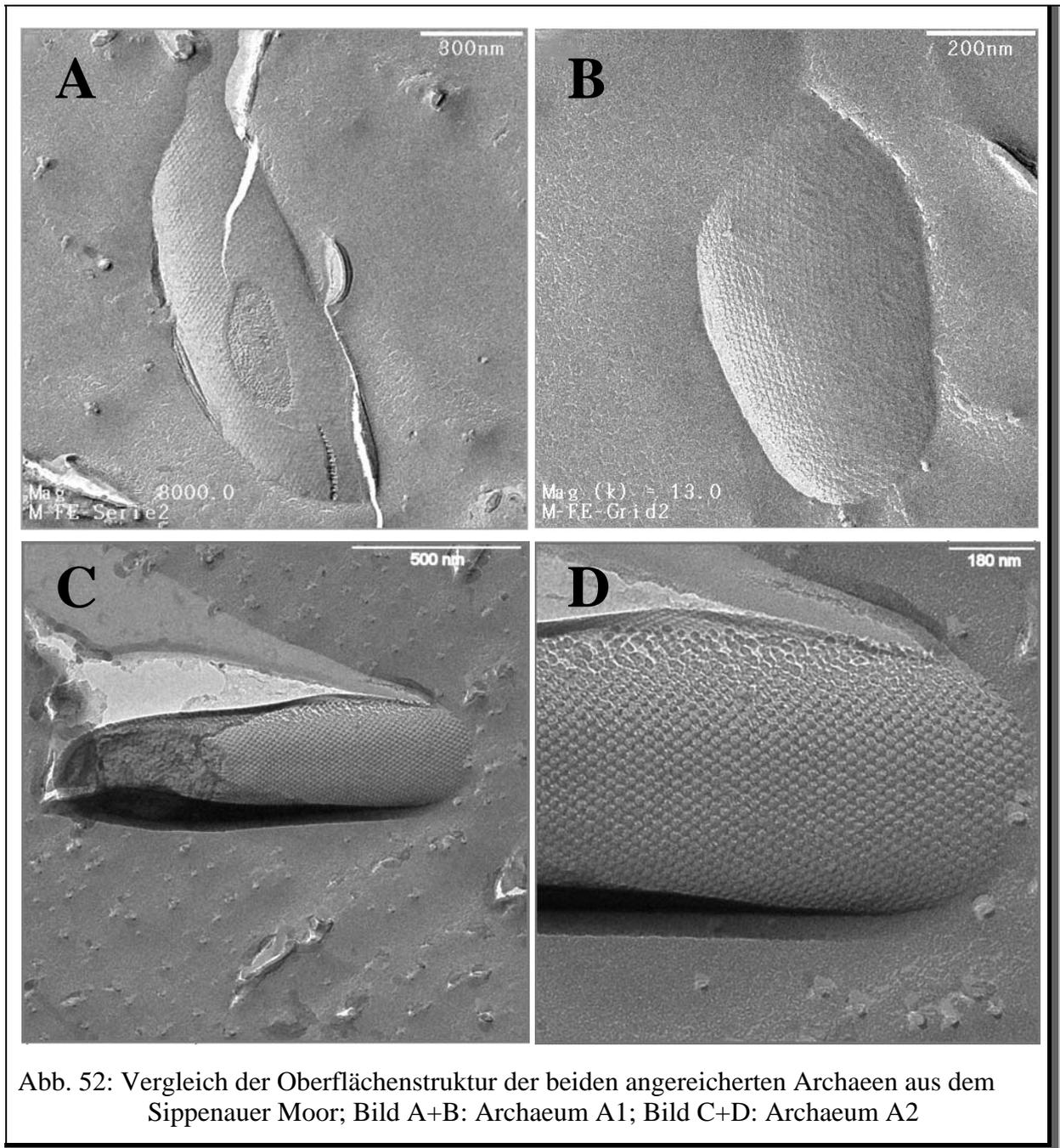
14.8.1 Anreicherungen aus dem Sippenauer Moor

Mit Archaeum A wurden Platin/Kohle-Bedampfungen, Uranylacetat-Kontrastierungen und Gefrierätzungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Stäbchen eine Länge von 2,5- 4,5 µm und einen Durchmesser von 250-400 nm hatten. Bei der Uranylacetat-Kontrastierung wurden außerdem kondensierte Bereiche an den Enden und im Inneren der Zellen nachgewiesen (Abb. 50), was mit den gut gefärbten Bereichen der FISH-Hybridisierungen (Abb. 40) genau übereinstimmt. Die Zusammensetzung dieser kondensierten Bereiche konnte nicht aufgeklärt werden.

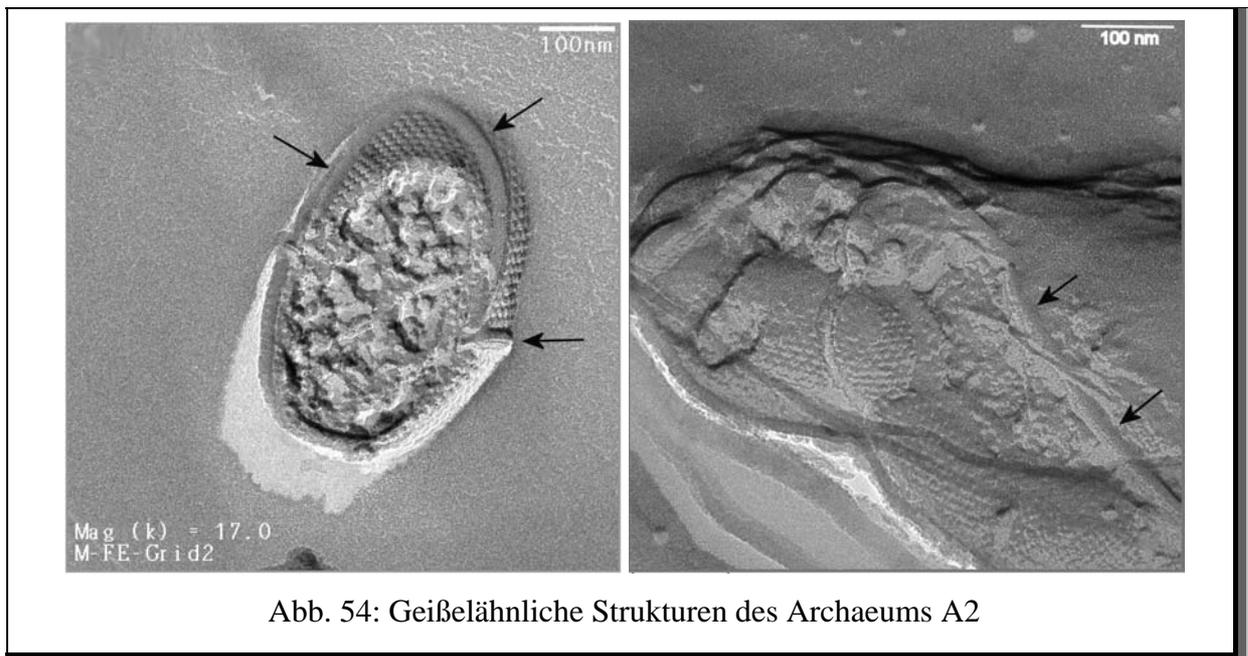
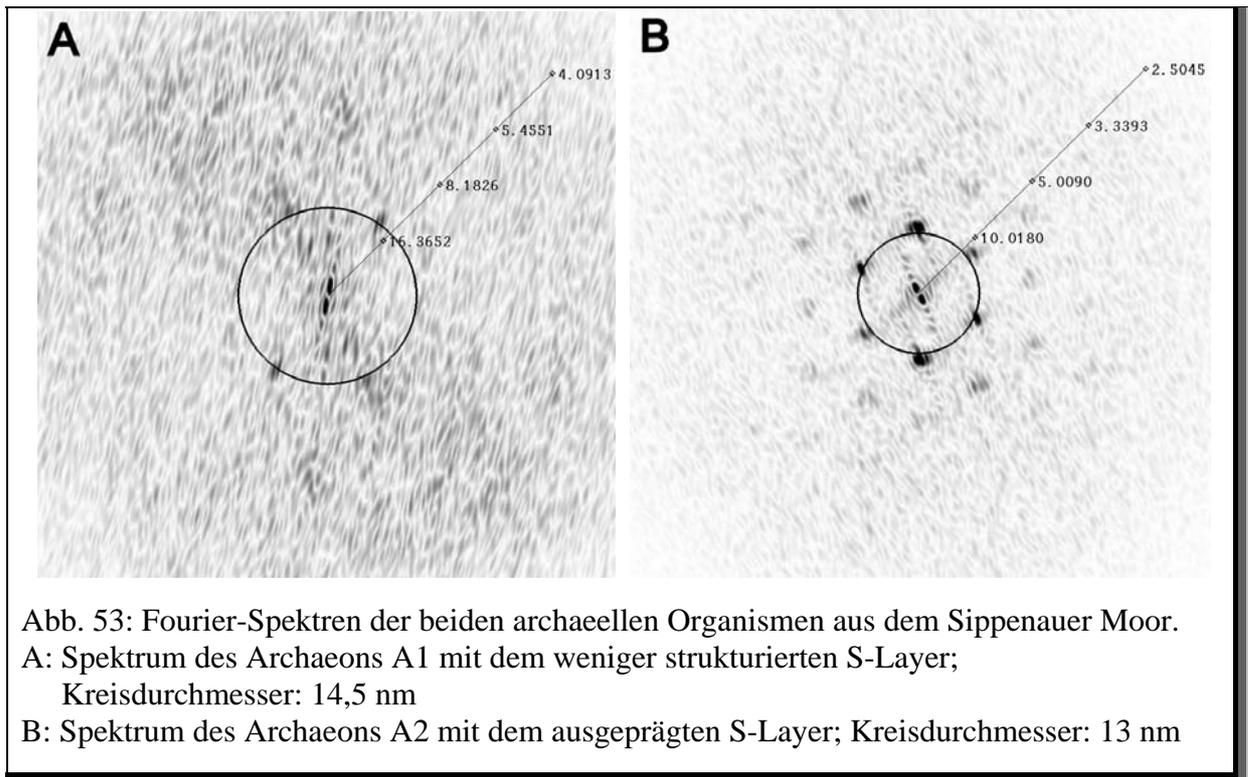


Bei Gefrierätzpräparaten des Archaeums A1 wurden zwei unterschiedliche Oberflächenstrukturen (Abb. 52) detektiert. Bei beiden handelt es sich um S-Layer mit p6-Symmetrie, wobei der S-Layer bei einem Organismus wesentlich stärker strukturiert („Archaeum A1“) ist als beim anderen („Archaeum A2“). Archaeum A2 weist einen etwas

größeren Zelldurchmesser (~350-400nm) auf als Archaeum A1 (~300nm). Die Abstände der Proteinuntereinheiten der S-Layer wurden mit Hilfe des Fourierspektrums ermittelt (Abb. 53). Archaeum A1 hatte eine Gitterkonstante von 14,5 nm, Archaeum A2 wies eine Gitterkonstante von 13 nm auf. Daraus ergeben sich Abstände der Proteinuntereinheiten von 17 nm bzw. 15 nm.



Bei Archaeum A2 wurden zudem geißelähnliche Strukturen entdeckt, die der Zelloberfläche auflagen (Abb. 54). Der Durchmesser der Strukturen betrug ~25 nm.



Das Auffinden von zwei verschiedenen Oberflächenstrukturen steht im Einklang mit den phylogenetischen Untersuchungen, in denen zwei nah verwandte Klonsequenzen (1K10con und 1K16 con; phylogenetischer Abstand: 2,3%) ermittelt wurden. Über Phasenkontrastmikroskopie und FISH waren die zwei verschiedenen Archaeen morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden.

14.8.2 Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach

Unterschiedliche Anreicherungen des Islinger Mühlbachs wurden ebenfalls mit den verschiedenen Methoden der Elektronenmikroskopie untersucht.

Aufnahmen des Zellendes von Archaeum B (Abb. 41) zeigten, dass dort mehrere Geißeln inserieren. Durch die auffälligen Strukturen am Zellende, den sogenannten „*terminal plugs*“ (Abb. 55) konnte Archaeum B eindeutig der Gattung *Methanospirillum* zugeordnet werden (Briegel, 2003), was auch mit der Morphologie der Zellen und den phylogenetischen Untersuchungen (nächster kultivierter Verwandter: *Methanospirillum hungatei*; Abb. 49) übereinstimmt. Die Dicke der Flagellen, die nicht in einem Punkt, sondern verteilt im *terminal plug* inserieren, betrug ca. 10 nm. Die Struktur in der Mitte des *terminal plugs* (Abb. 56) kann als eine Art Teilungsnarbe betrachtet werden. Bei der Gefrierätzung wurde eine besondere Querstreifung der Zelloberfläche dokumentiert, die jedoch kein gleichmäßiges Muster erkennen ließ, da die Querstreifen von unterschiedlicher Breite (10-17 nm) waren (Abb. 56). Streifenbreiten von 12,4 und 13,9 nm wurden gehäuft festgestellt. Der Durchmesser der einzelnen Zellen betrug ~400-500 nm, die Länge ~6-13 µm. Es können Filamente mit einer Länge von bis zu ca. 50 µm gebildet werden, die aus bis zu vier Zellen bestehen. Längere Filamente wurden nicht beobachtet.

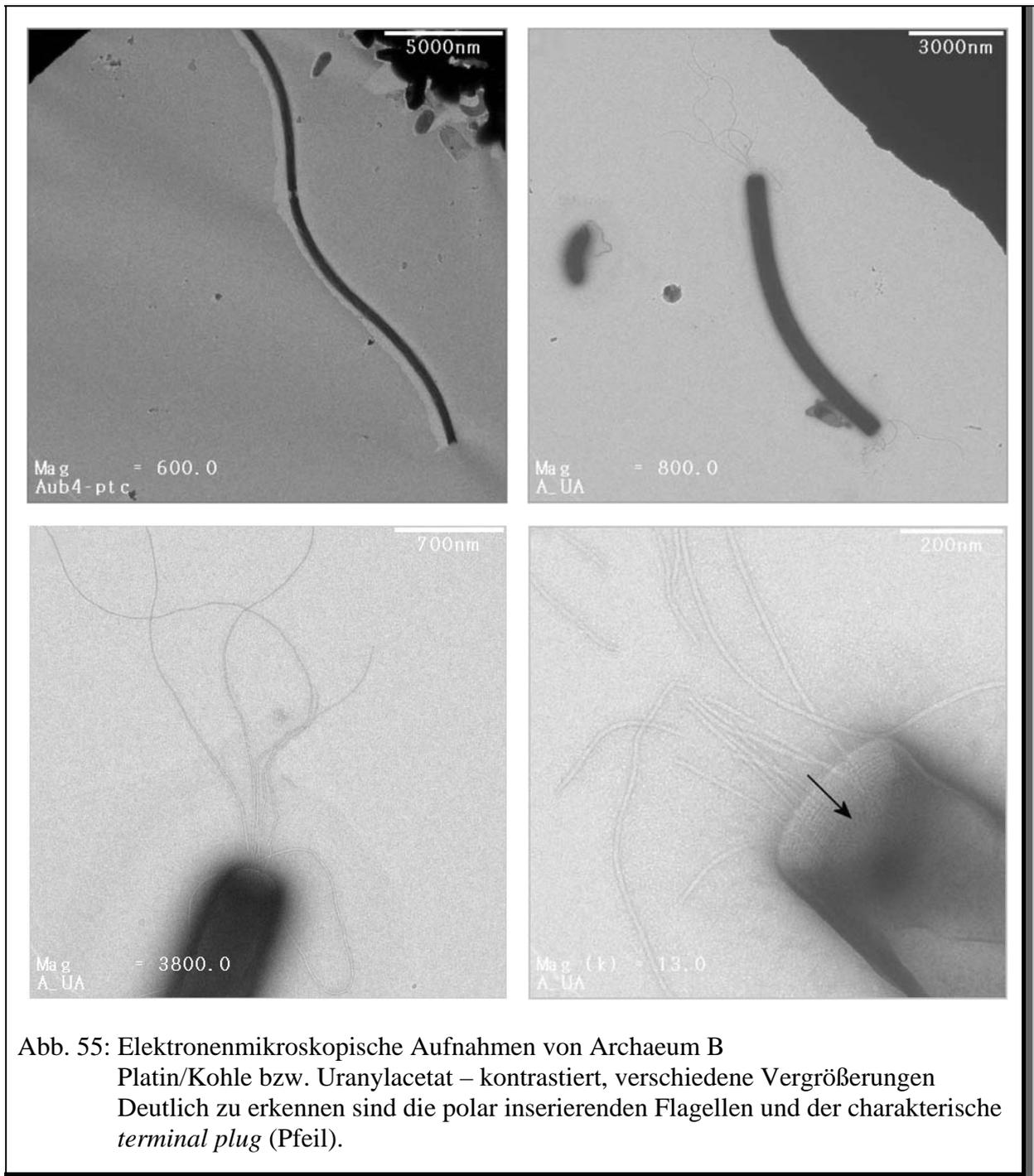


Abb. 55: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Archaeum B
Platin/Kohle bzw. Uranylacetat – kontrastiert, verschiedene Vergrößerungen
Deutlich zu erkennen sind die polar inserierenden Flagellen und der charakterische *terminal plug* (Pfeil).

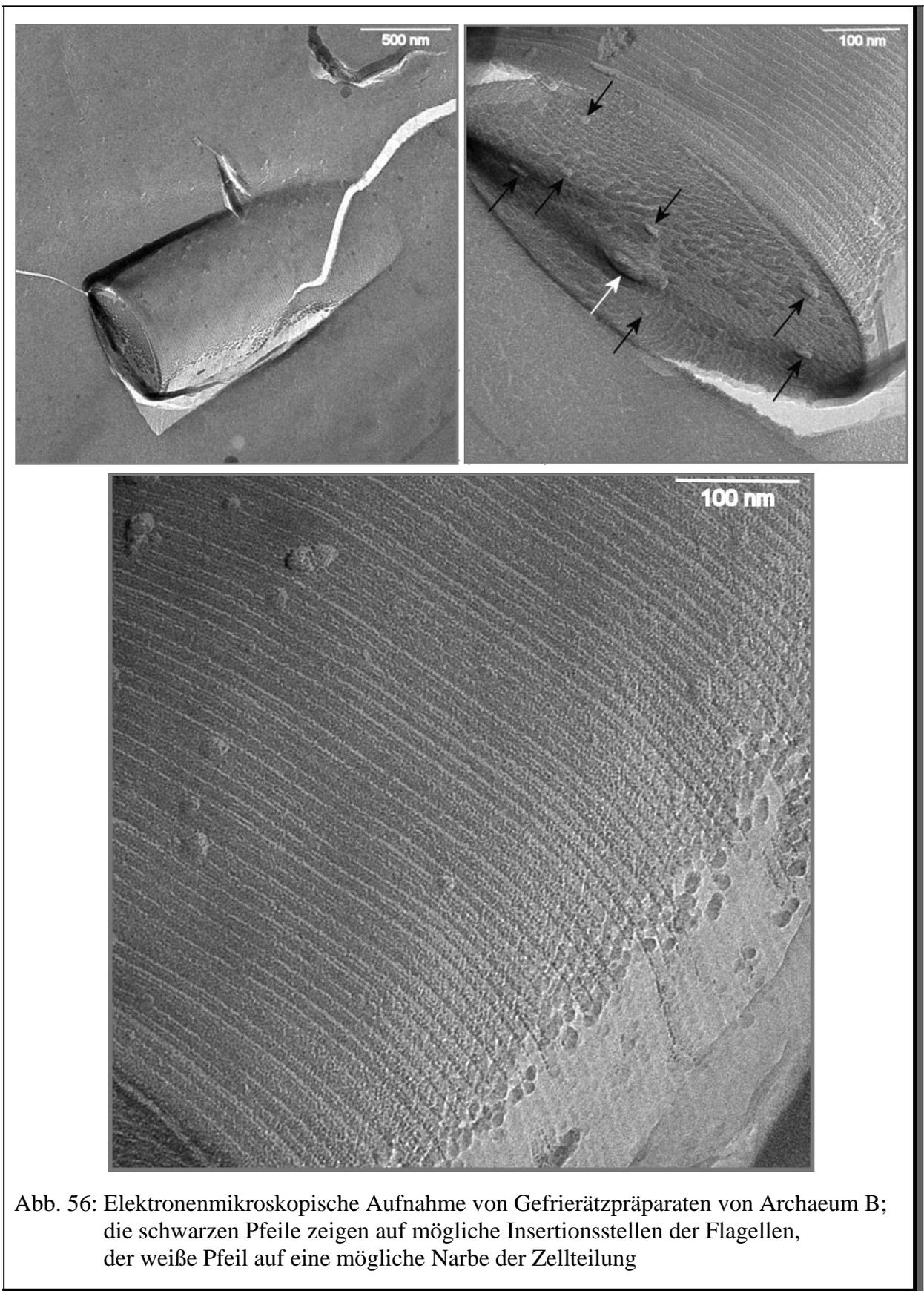
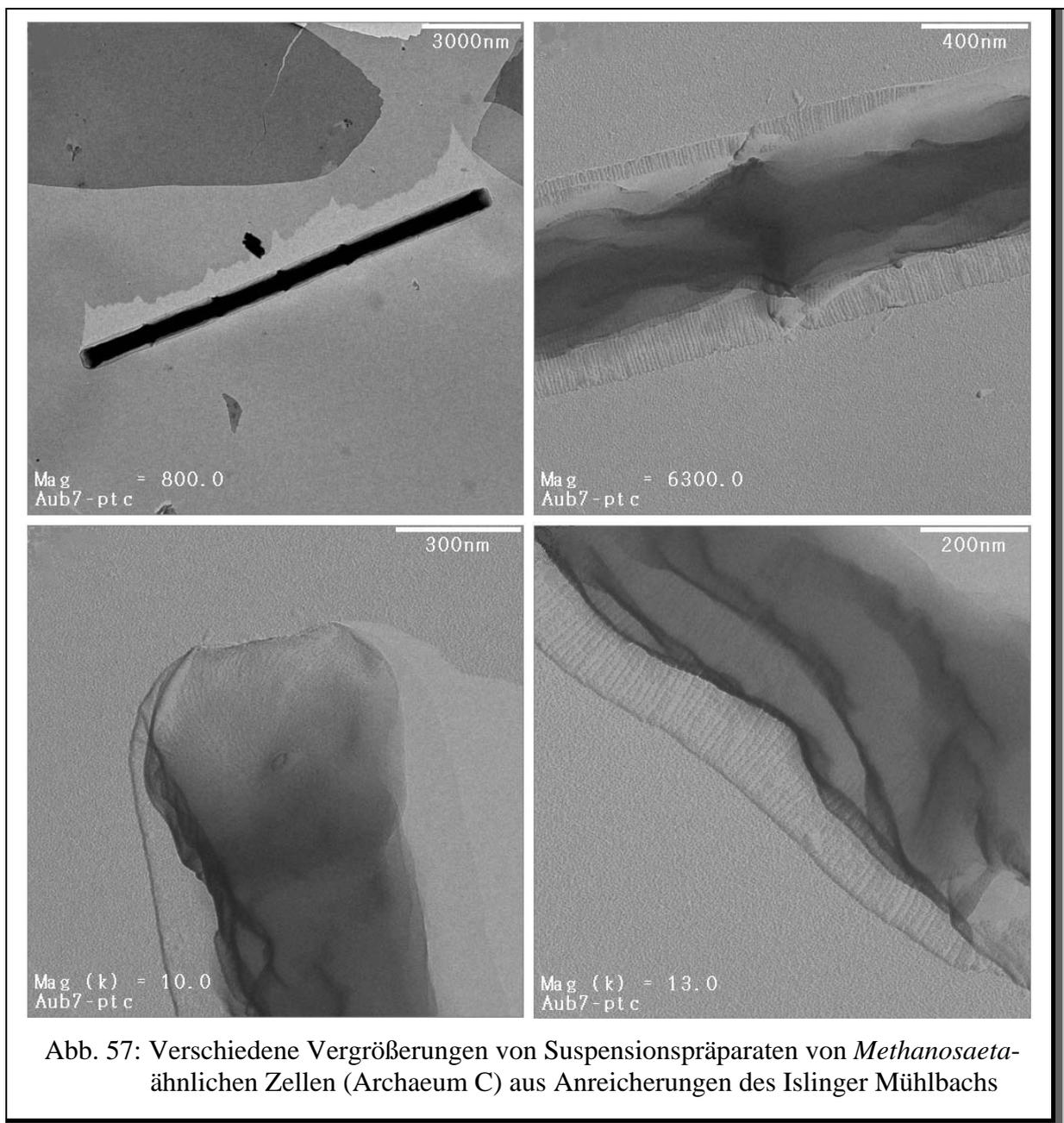
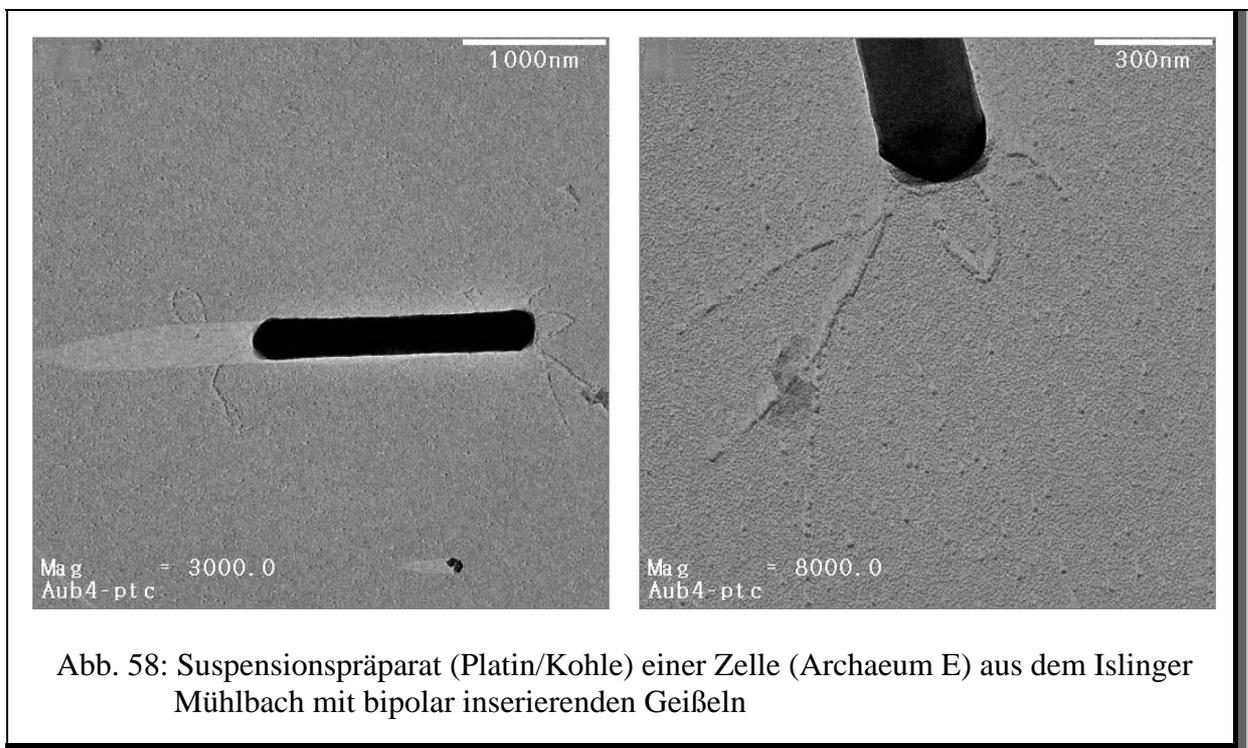


Abb. 56: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Gefrierätzpräparaten von Archaeum B; die schwarzen Pfeile zeigen auf mögliche Insertionsstellen der Flagellen, der weiße Pfeil auf eine mögliche Narbe der Zellteilung

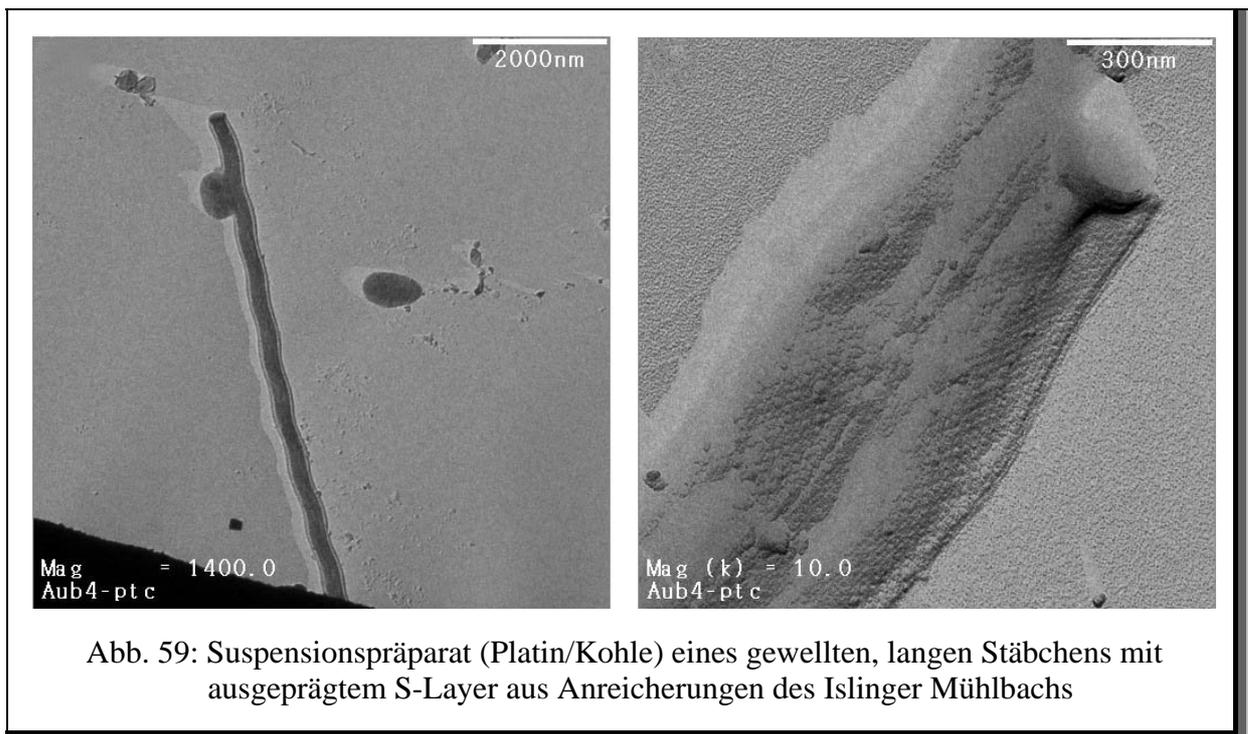
Neben Archaeum B wurden Organismen angereichert, die eine ähnliche Morphologie wie *Methanosaeta*-Zellen aufwiesen (Archaeum C). Auch hier wurde eine interessante Oberflächenstruktur auf der Zellhülle entdeckt. Es handelt sich dabei um Querstreifen, mit unterschiedlichen Breiten (~13-16 nm), die keine Regelmäßigkeit aufweisen (Abb. 57). Die Breite der Zellen inkl. der Hüllen liegt bei 700-750 nm, die Breite der dunkler kontrastierten Zelle im Inneren der Hülle bei 500-600 nm. Die Länge der Einzelzellen betrug zwischen 2-5 μm , wobei Filamente mit mehr als 100 μm Länge gebildet werden können.



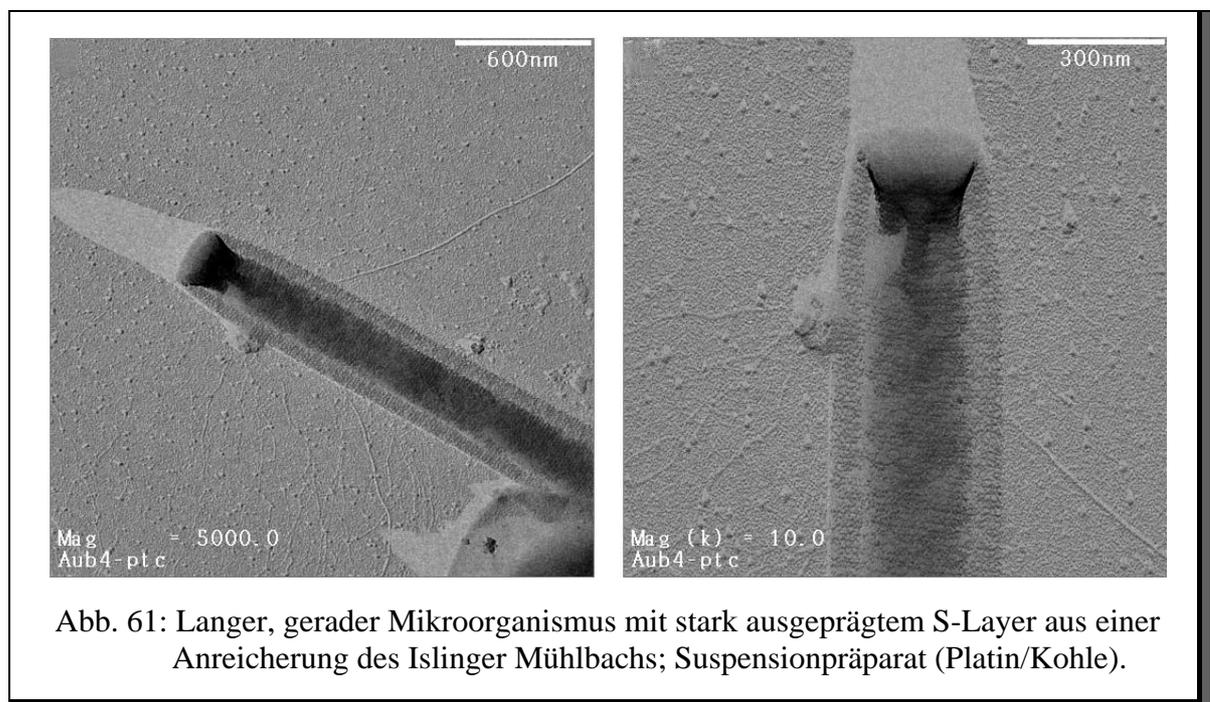
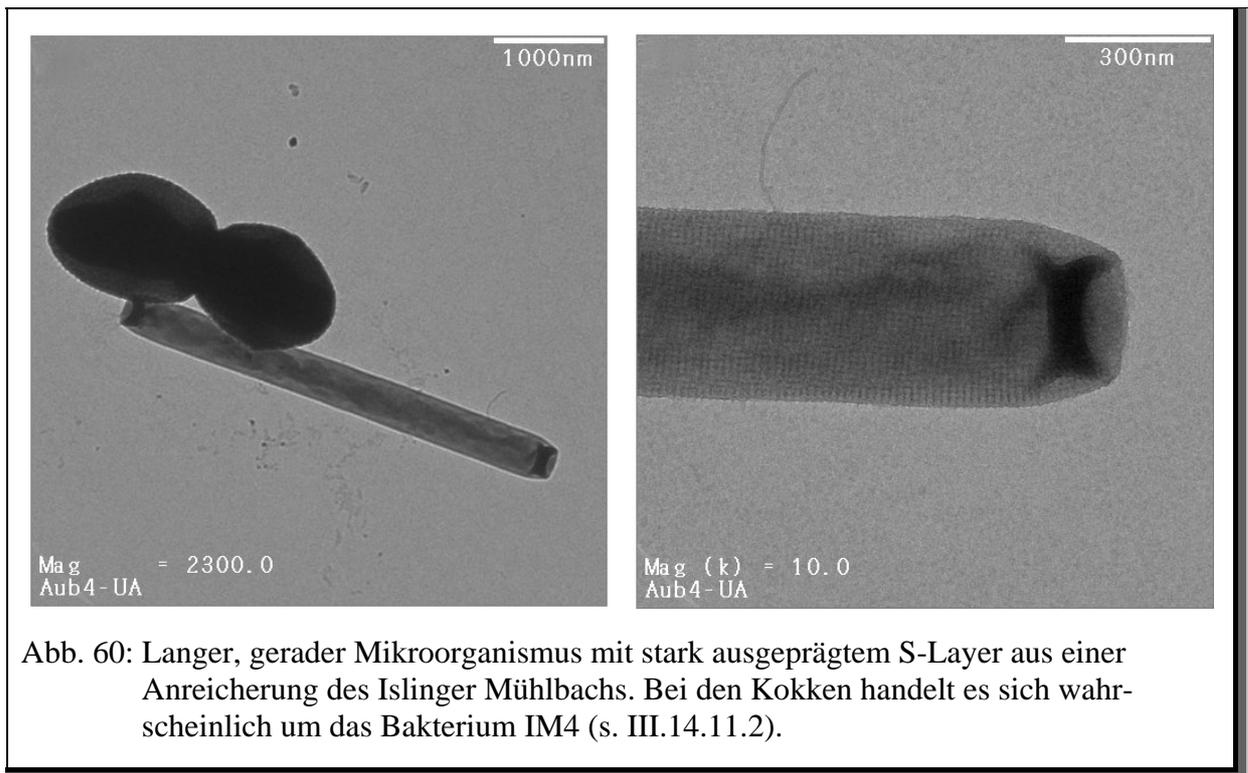
Des Weiteren wurden stäbchenförmige Zellen beobachtet (Archaeum E), die den Archaeen A1 und A2 aus dem Sippenauer Moor in Morphologie, Größe (Breite: ~300 nm; Länge: ~1,5 µm) und Struktur (Andeutung eines stark ausgeprägten S-Layers) sehr ähnlich waren (Abb. 58). Sie zeigten bei FISH die gleichen kondensierten Bereiche innerhalb der Zellen wie die Archaeen A1 und A2 aus dem Sippenauer Moor (Vgl. Abb. 40 mit Abb. 45). Dies steht im Einklang mit phylogenetischen Untersuchungen an Archaeum E, die eine Klonsequenz ergaben (3K20con; phylogenetischer Abstand zu 1K10: 2,3%, zu 1K16: 4,2%), die mit den Sequenzen der Archaeen A1+A2 aus dem Sippenauer Moor ein Cluster bildet (Abb. 49). Zudem konnten hier Ansätze von bipolar inserierenden Geißeln identifiziert werden.



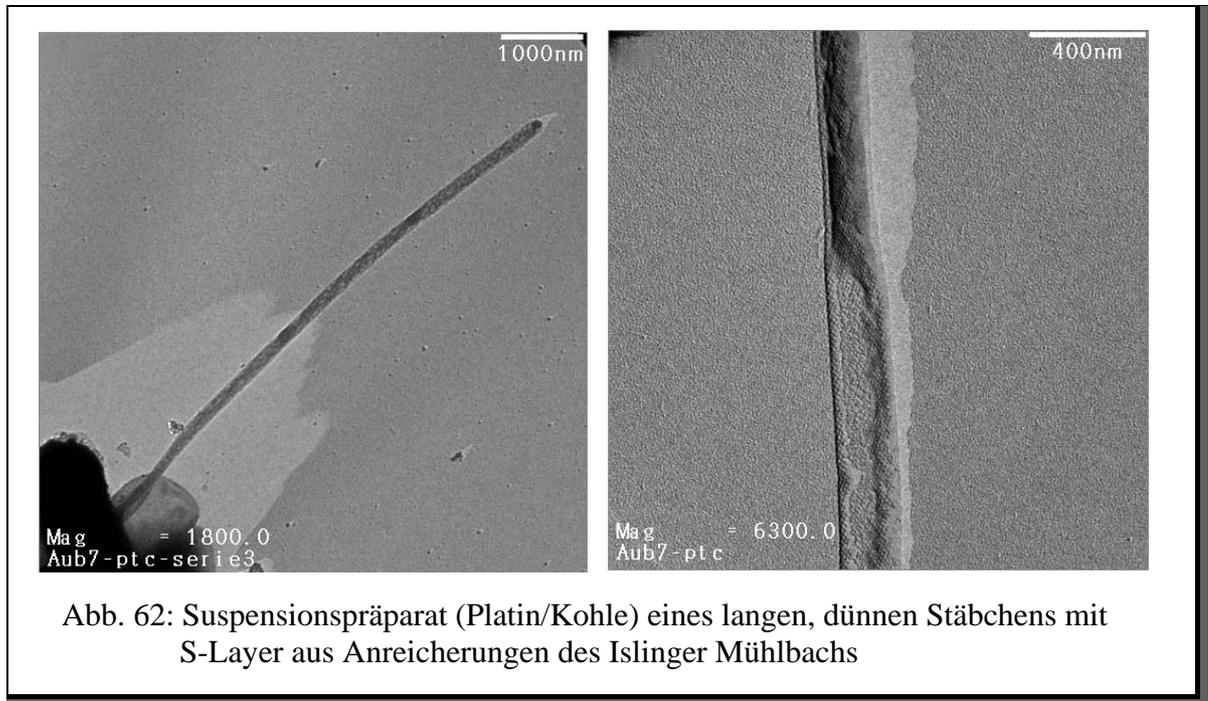
Schließlich wurden noch lange, dünne Stäbchen angereichert, die ebenfalls einen S-Layer aufwiesen. Eine Zuordnung zu den durch FISH identifizierten archaeellen Morphotypen oder zu den archaeellen 16S rDNA-Gensequenzen konnte nicht erfolgen. Es wurde gezeigt, dass es sich dabei um drei verschiedene Organismen handelt. Der erste Organismus war ein langes, gleichmäßig gewelltes Stäbchen mit $\sim 7\text{-}9\ \mu\text{m}$ Länge und $\sim 300\text{-}350\ \text{nm}$ Breite (Abb. 59). Es konnte ein stark ausgeprägter S-Layer auf der Oberfläche identifiziert werden.



Bei dem zweiten, vermutlich archaeellen Mikroorganismus handelte es sich um ein gerades Stäbchen mit einer Länge von $\sim 4\text{-}10\ \mu\text{m}$ und einer Breite von $\sim 310\text{-}390\ \text{nm}$ (Abb. 60 und Abb. 61). Nach der Uranylacetat-Kontrastierung wurde ein stark ausgeprägter S-Layer erkannt (Abb. 60). Bei der Platin/Kohle- Bedampfung wurde der S-Layer noch deutlicher sichtbar (Abb. 61). Eine Zuordnung zu einer der mittels FISH gefärbten archaeellen Zellen oder zu einer der erhaltenen archaeellen 16S rRNA Klonsequenzen war auch hier nicht erfolgreich.



Beim dritten Organismus handelte es sich ebenfalls um ein sehr dünnes (150-200nm), langes (~12 μm) Stäbchen, das einen ausgeprägten S-Layer besitzt.



14.9 Verdünnungsreihen der einzelnen Anreicherungen

Von zwei Kulturen wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Dadurch konnten zwei archaeele Morphotypen (Archaeum A; Abb.40; Archaeum B; Abb. 41) von anderen Archaeen und einigen Bakterien abgetrennt werden. Archaeum B konnte in einem Ansatz in Kombination mit zwei bakteriellen Morphotypen erhalten werden, wobei ein bakterieller Morphotyp dominiert. Überraschenderweise konnte in dieser Mischkultur ein fast doppelt so schnelles Wachstum des Archaeums (nächster kultivierter Verwandter: *Methanospirillum hungatei*; Abb. 49) nachgewiesen werden wie in den Originalkulturen. Scheinbar wurden durch die Verdünnungsreihen bakterielle Organismen entfernt, die das Wachstum des Archaeums negativ beeinflusst haben.

14.10 Antibiotika-Ansätze

Um die Bakterien von den Archaeen abzutrennen, wurden verschiedene Antibiotika (Kanamycin, Vancomycin, Ampicillin je 150 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Teilweise konnten die Bakterien zu 100% abgetötet werden (durch FISH nachgewiesen), die Archaeen zeigten

jedoch in diesen Ansätzen kein oder extrem langsames Wachstum, was den Verdacht nahe legt, dass gewisse Bakterien in den Mischkulturen essentiell für das Wachstum der Archaeen sind. Durch Ansätze, denen in 7-tägigem Abstand Antibiotika zugesetzt wurden, wurde dies bestätigt. Je später das Antibiotikum zugesetzt wurde, desto höher war die Anzahl der Archaeen. Überimpfungen der Kulturen, in denen nur noch sehr wenig Archaeen nachgewiesen werden konnten, waren nicht erfolgreich.

In anderen Ansätzen wurden nahezu alle Bakterien (bis auf ein paar resistente Arten) gehemmt. Auch hier war das Wachstum der Archaeen wesentlich schlechter als in Kulturen ohne Antibiotika. Eine Überimpfung der Archaeen war ebenfalls nicht erfolgreich.

14.11 Zellvereinzelung verschiedener Archaeen mittels optischer Pinzette

Von verschiedenen archaeellen Morphotypen wurden Einzelzellisolierungen mit der Laserpinzette durchgeführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 10°C und 20°C. Es wurden ca. 60 Vereinzelungen von vier unterschiedlichen archaeellen Morphotypen durchgeführt. Bei allen Zellvereinzelungen wurde die Objektivkühlung verwendet, die die Kapillare auf etwa 10°C abkühlt, so dass psychrophile Organismen nicht durch zu hohe Temperaturen geschädigt werden.

14.11.1 Zellvereinzelung auf Standardmedien

Auf Standard Moor- und Aubachmedium wurden insgesamt 26 Laservereinzelungsversuche von 3 morphologisch verschiedenen Organismen durchgeführt (8x Archaeum A; 14x Archaeum B; 4x Archaeum C). Selbst nach mehreren Monaten Inkubation konnte in keiner Kultur Wachstum nachgewiesen werden.

14.11.2 Isolierung von IM4 mit optischer Pinzette

Der dominierende bakterielle Organismus, der mit Archaeum B vergesellschaftet war, konnte erfolgreich vereinzelte werden (siehe III.14.9). Er wurde als IM4 bezeichnet, in der Bakterienbank Regensburg konserviert und stand für weitere Isolierungs-Versuche (s. 10.8.3) zur Verfügung.

14.11.3 Zellvereinzelung auf Medien mit Zusatz

Neben Zellvereinzelungen auf Standardmedien wurden Medien mit verschiedenen Zusätzen verwendet. Da das Wachstum von einigen Archaeen scheinbar stark vom Wachstum der bakteriellen Begleitflora abhängig ist, wurde einigen Medien sterilfiltrierter Überstände von exponentiell wachsenden Anreicherungskulturen in Konzentrationen von 10-33% zugespritzt. Insgesamt wurde diese Methode für die Vereinzelung von vier verschiedenen archaeellen Morphotypen (7x Archaeum B; 10x Archaeum A; 11x Archaeum C; 5x Archaeum H) verwendet. Für Archaeum B wurden zusätzlich noch zwei Zellvereinzelungen auf Medien durchgeführt, denen vorher 33% sterilfiltrierter Überstand einer exponentiell wachsenden IM4-Reinkultur zugegeben wurde.

Bei keinem dieser Laservereinzelungsversuche konnte selbst nach mehreren Monaten Inkubation bei 10°C bzw. 20°C, Wachstum nachgewiesen werden.

15. Weiterführende Untersuchungen zum methanogenen Isolat SipMet1

Das Isolat SipMet1 wurde von Christian Rudolph angereichert und konnte von Thomas Amann als weltweit erster psychrotoleranter methanogener Organismus mit Hilfe des Lasermikroskops in Reinkultur vereinzelt werden (Amann, 2003).

Im Laufe dieser Arbeit sollte der Organismus SipMet1 physiologisch charakterisiert werden

15.1 Laservereinzelung von SipMet1

Von drei bestehenden Reinkulturen (L5A, L9A, L10A) von SipMet1, die bereits von Thomas Amann erhalten wurden, wurde die Kultur L5A ausgewählt und mehrfach überimpft. Aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurden dann unter anaeroben Bedingungen insgesamt zehn Laservereinzelungen (II.13) mit Objektivkühlung durchgeführt. Nach etwa einem Monat konnte in einer Kultur (L3A) Wachstum des Methanogenen nachgewiesen werden. Die Zellen kommen als Zweier- oder Viererpakete, meist jedoch als größere Aggregate von etwa 20 bis zu mehreren hundert Zellen vor. Einzelne Zellen weisen einen Durchmesser von ca. 1 µm auf und zeigen keine aktive Motilität. Durch Elektronenmikroskopie wurden weder Flagellen noch Einlagerungen in den Zellen entdeckt.

15.2 Phylogenetische Untersuchungen

Die Sequenzierung von SipMet1 wurde von Thomas Amann (Amann, 2003) durchgeführt. Die Sequenz von SipMet1 wurde mit Hilfe des ARB-Programms in den 16S rRNA Stammbaum eingerechnet. *Methanlobus vulcani* war mit einem phylogenetischen Abstand von etwa 5% der nächste kultivierte Verwandte. Durch das Einrechnen einiger neuer methanogener Sequenzen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine genauere Einordnung von SipMet 1 durchgeführt. Als nächster Verwandter wurde durch verschiedene Baumberechnungsmethoden mit einem phylogenetischen Abstand von 1,2 % *Methanomethylovorans hollandica* bestimmt (Abb. 63). Als Name für SipMet1 wurde deswegen *Methanomethylovorans psychrotolerans* vorgeschlagen. Eine nah verwandte Klonsequenz (AubK58; phylogenetischer Abstand: 0,88%) wurde im Islinger Mühlbach identifiziert.

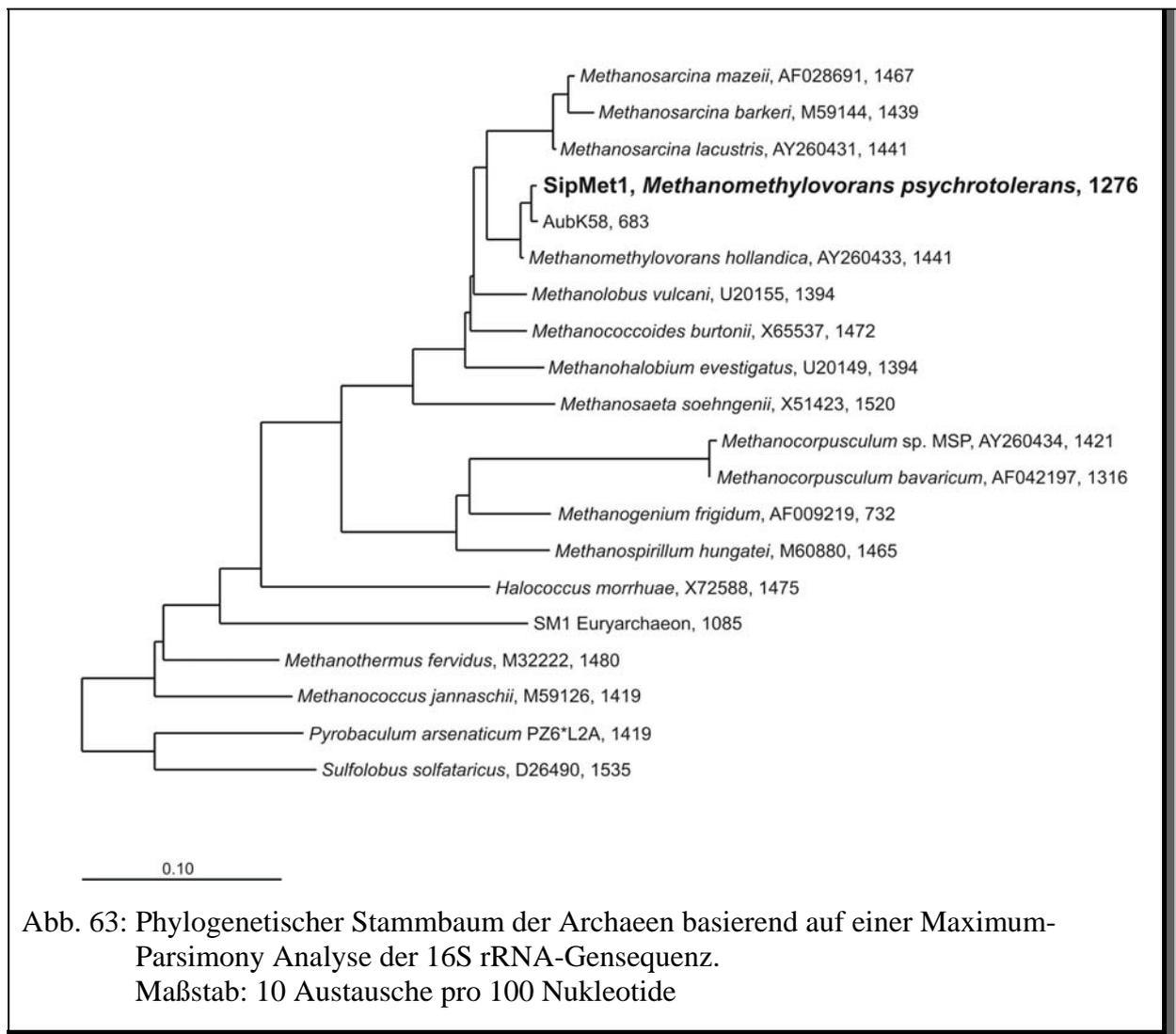


Abb. 63: Phylogenetischer Stammbaum der Archaeen basierend auf einer Maximum-Parsimony Analyse der 16S rRNA-Gensequenz.
Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide

15.3 Physiologische Untersuchungen

Für physiologische Untersuchungen wurde die neu erhaltene Reinkultur L3A verwendet. Alle Versuche aus der Temperaturreihe wurden bei der optimalen Wachstumstemperatur 30°C unter leichtem Schütteln durchgeführt.

15.3.1 Variation der Substrate

Für die Substratansätze wurde den Medien vor dem Animpfen das jeweilige Substrat (Tab. 34) zugespritzt. Die Medien wurden aus denselben Vorkulturen angeimpft und parallel bei 30°C inkubiert.

<i>Eingesetzte Substrate</i>	<i>Konzentration</i>
Methylamin	20 mM/40 mM
Dimethylamin	20 mM/40 mM
Trimethylamin	20 mM/40 mM
Na-Acetat	20 mM/40 mM
Na-Formiat	20 mM
Na-Pyruvat	20 mM
Methanol	20 mM
Dimethylsulfid	10 mM
1-Propanol	50 mM
2-Propanol	50 mM
2-Butanol	40 mM
Ethanol	65 mM
Aceton	52 mM
C-Org	0,01%
Pepton	0,01%
Hefeextrakt	0,01%
Fleischextrakt	0,01%
Brain-Heart-Infusion	0,01%

Tab. 34: Substrate und Substratkonzentrationen für SipMet 1

Nach mehreren Monaten Inkubation trat nur im Ansatz mit Dimethylamin Wachstum auf. Bei weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von C-Org und Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt oder Brain-Heart-Infusion (je 0,01%) eine Stimulierung des Wachstums stattfand, wobei C-Org und Brain-Heart-Infusion am besten funktionierte. Alle weiteren physiologischen Untersuchungen wurden daher mit 0,02% Dimethylamin und 0,01% C-Org durchgeführt.

15.3.2 Variation des pH-Bereichs

Der pH-Bereich von SipMet1 wurde von pH 4,0-9,0 getestet. Das pH-Optimum lag bei pH 6,0-7,0, der Wachstumsbereich zwischen pH 5,0 und pH 7,5.

15.3.3 Variation der Temperatur

Die Temperaturverträglichkeit von SipMet1 wurde von 2-50°C getestet. Das Optimum lag bei 30°C, der Wachstumsbereich zwischen 4 und 40°C.

15.3.4 Variation der Salzkonzentration

Der Salzbereich wurde zwischen 0-0,6 M getestet. Bereits bei 0,05 M konnte kein Wachstum mehr nachgewiesen werden.

15.3.5 Variation der Gasphasen

Es wurden Tests mit unterschiedlichen Gasphasen durchgeführt. Dazu wurden Medien mit N₂/CO₂ (80/20), H₂/CO₂ (80/20) und N₂/H₂/CO₂ (65/15/20) begast und parallel mit oder ohne Zusätze (0,02% Dimethylamin und 0,01% C-Org) mit SipMet1 beimpft. Nach mehreren Monaten Inkubation fand nur in den Ansätzen mit Substrat und den Gasphase N₂/CO₂ bzw. N₂/H₂/CO₂ Wachstum statt. In den Ansätzen ohne Substrate und mit der Gasphase H₂/CO₂ konnte kein Wachstum nachgewiesen werden.

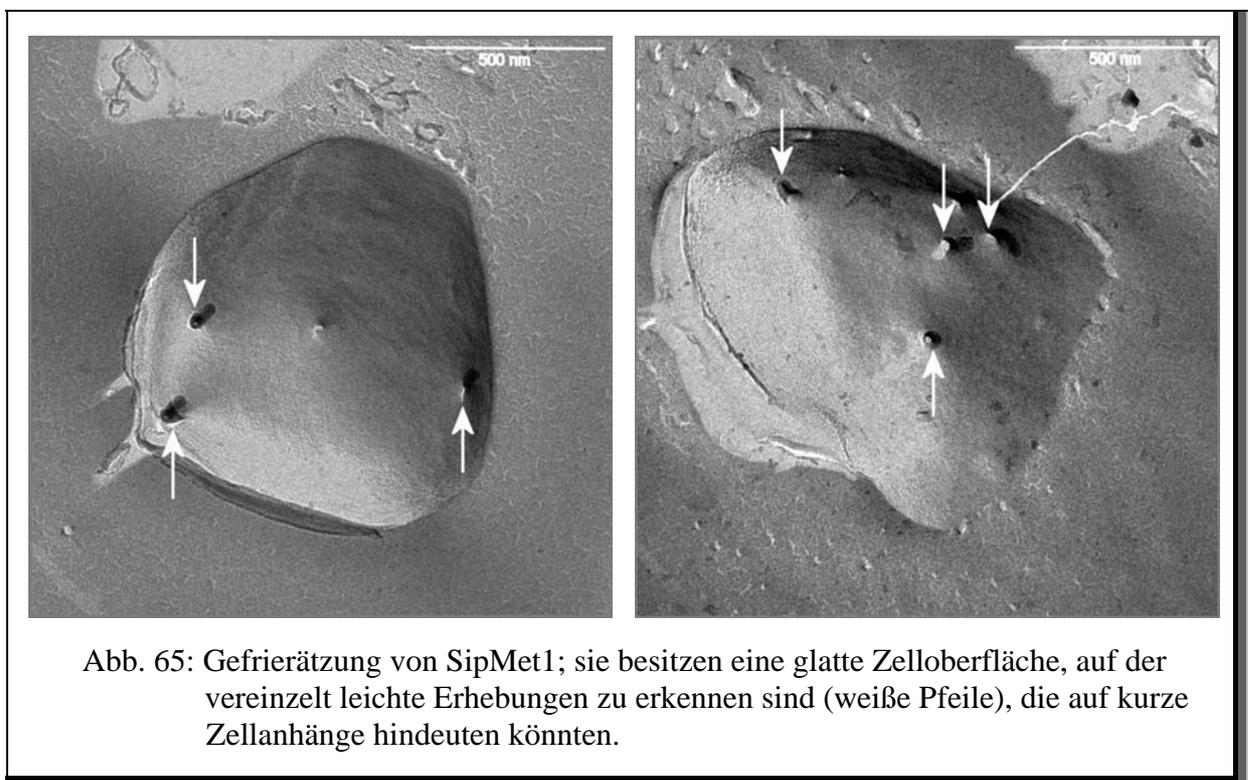
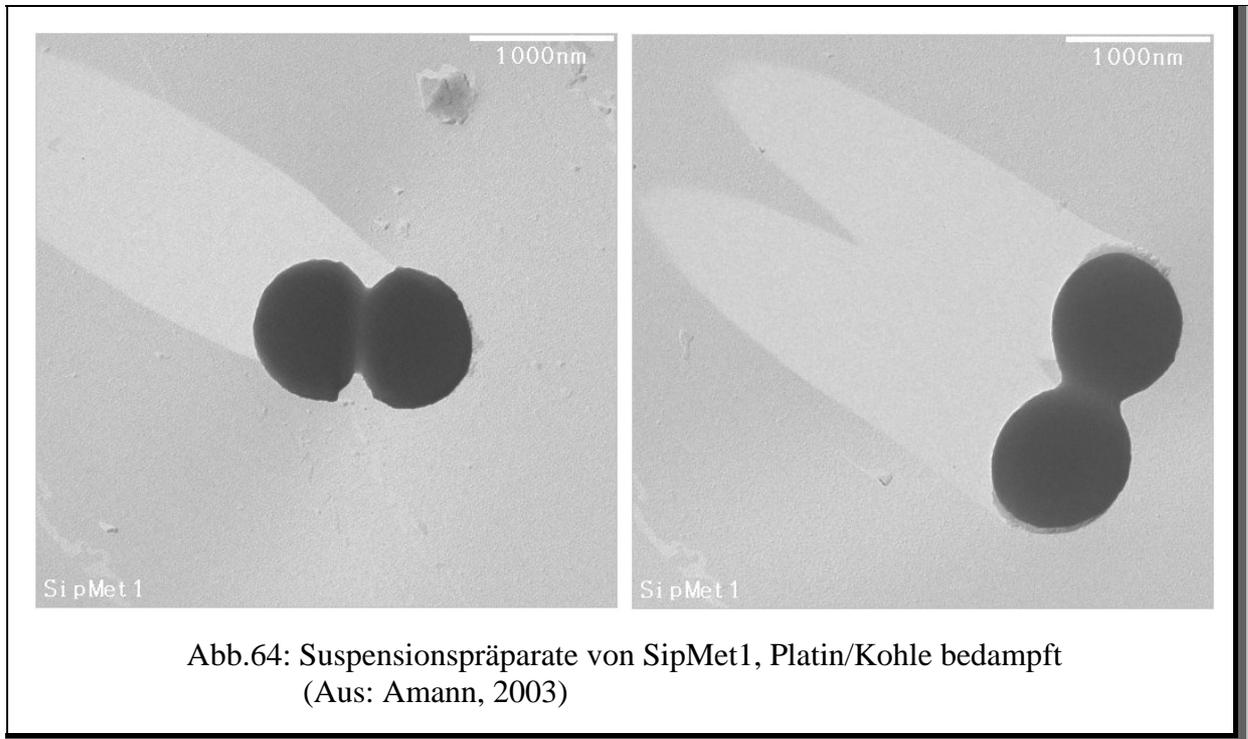
15.3.6 Gram-Färbung

Der Organismus zeigte ein Gram(-) Färbeverhalten.

15.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Am Isolat SipMet1 wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Von Thomas Amann wurde bereits ein Suspensionspräparat mit Platin/Kohle-Bedampfung hergestellt (Amann, 2003; Abb. 64). In dieser Arbeit wurden zusätzlich Gefrierätzungen durchgeführt, um tiefere Einblicke in die Oberflächenstruktur dieses Organismus zu erhalten. Die Zellen haben einen Durchmesser von ca. 1 µm und sind meist zu Tetraden oder größeren Ansammlungen zusammengelagert. Sie besitzen eine glatte Zelloberfläche ohne erkennbaren S-Layer (Abb. 65). Eine endgültige Aussage über die Zellwandstruktur wäre jedoch nur über eine S-Layer-Präparation möglich. Durch Brüche durch die Zellen konnte eine relativ dicke

Zellwand nachgewiesen werden (Abb. 66 und Abb. 67). Bei einigen Zellen wurden kleine Fortsätze auf der Zellwand gefunden, die Zellanhänge darstellen könnten (Abb. 65)



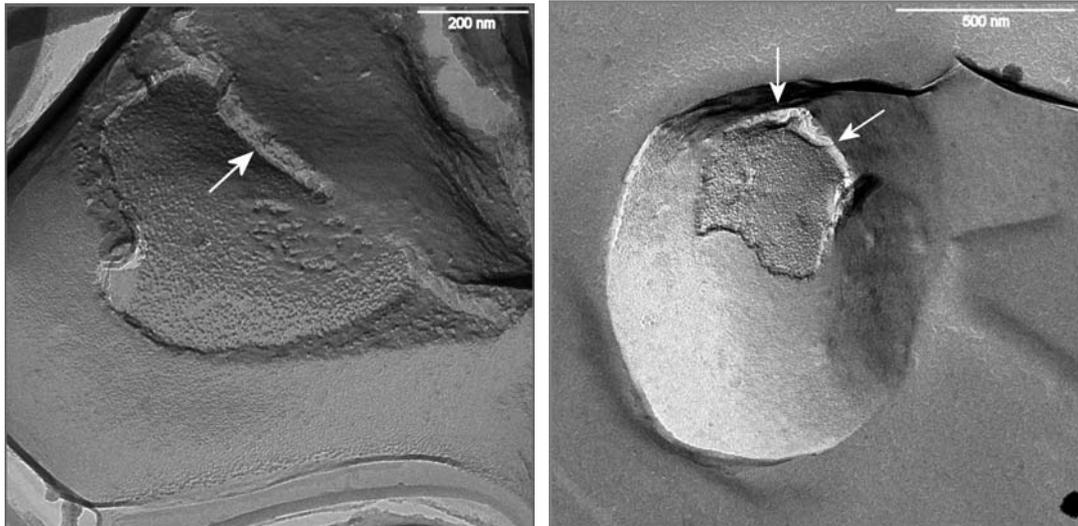


Abb. 66: Gefrierätzung von SipMet1; Bruch durch die Cytoplasmamembran mit Blick auf die relativ dicke Zellwand (weiße Pfeile)

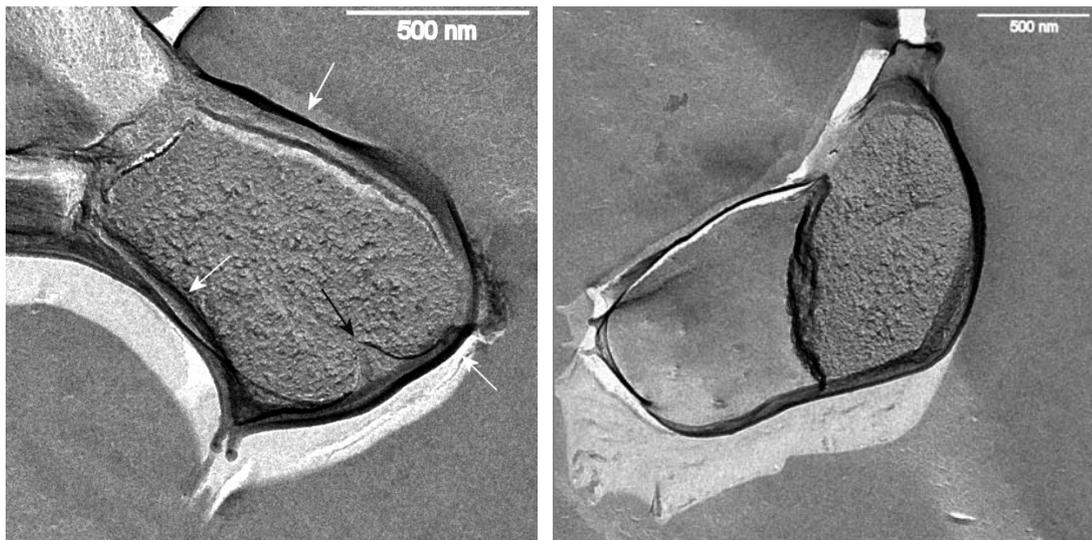


Abb. 67: Gefrierätzung von SipMet1; Bruch durch das Cytoplasma mit Blick auf die relativ dicke Zellwand (weiße Pfeile); Einstülpung der Cytoplasmamembran bei beginnender Zellteilung (schwarzer Pfeil)

15.5 Hinterlegung von SipMet1 bei DSMZ und ATCC

Zur gültigen Beschreibung von SipMet1 als *Methanomethylovorans psychrotolerans* muss die Kultur bei zwei verschiedenen Zellkultursammlungen hinterlegt werden. Hierzu wurden Vorkulturen angezüchtet, die demnächst bei den Zellkultursammlungen DSMZ (Deutschland) und ATCC (USA) hinterlegt werden.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine charakteristisch strukturierte, mikrobielle Lebensgemeinschaft in dem kalten (10°C), sulfidhaltigen Mineralbach des Sippenauer Moors bei Saal a. d. Donau untersucht. Durch eine Kombination von Beobachtungen im Biotop, Phasenkontrastmikroskopie, der Entwicklung eines neuen *in-situ* Kultivierungssystems und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden der Aufbau und zeitliche Ablauf dieser ungewöhnlichen Lebensgemeinschaft aufgeklärt. Es wurden Organismen aller drei Domänen nachgewiesen, teilweise isoliert und charakterisiert, die an dieser ungewöhnlichen Assoziation beteiligt sind. Dabei ist es erstmals gelungen den komplexen Lebenszyklus einer Lebensgemeinschaft mit einem daran beteiligten psychrotoleranten bzw. psychrophilen *Crenarchaeons* aufzuklären. Dazu wurde ein neues *in-situ* Kultivierungssystem entwickelt, mit dem das Wachstum der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft direkt im Biotop zu definierten Zeitpunkten untersucht werden konnte. Den ersten Schritt des komplexen Lebenszyklus bilden filamentöse Mikroorganismen, welche das im Biotop inkubierte *in-situ* Kultivierungssystem mit einem weißlichen Belag überziehen. Mittels FISH mit spezifischen Sonden konnten diese filamentösen Mikroorganismen der Gattung *Thiothrix* zugeordnet werden. Die weißliche Färbung der Mikroorganismen könnte durch elementaren Schwefel verursacht werden, der durch die Sulfidoxidation, der energieliefernden Reaktion dieser Mikroorganismen, gebildet wird. Die unter dem Mikroskop auffälligen, lichtbrechenden Einlagerungen könnten daher Schwefeleinlagerungen sein (Bland und Staley, 1978). Die Gattung *Thiothrix* wurde schon vor über 100 Jahren in kalten Schwefelquellen gefunden (Rabenhorst, 1848; Winogradsky, 1888). *Thiothrix* wächst in einem Gradienten, der durch fließendes Wasser mit einer Sulfidkonzentration von 0,1-1 mg/l, und einer Sauerstoffkonzentration von 0-10% bei neutralem pH-Wert entsteht (Keil, 1912; Bland und Staley, 1978; Lackey et al., 1965; Larkin und Strohl, 1983). *Thiothrix*-Zellen können lange Filamente ausbilden, mit denen sie sich an das Substrat anheften. Sie können aber auch Rosetten bilden, indem sich einzelne Zellen oder Filamente an den Enden zusammenlagern. *Thiothrix*-Zellen sind von einer Scheide umhüllt (Drawert und Metzner-Kuster, 1958; Bland und Staley, 1978; Larkin, 1980), die aus mehreren Schichten bestehen kann und das ganze Filament umgibt (Larkin und Shinabarger, 1983). Einzelne Zellen, so genannte Schwärmerzellen, werden am offenen Ende der Scheide freigesetzt und sind für die Verbreitung zuständig. Derartige Schwärmerzellen könnten sich

an das *in-situ* Kultivierungssystem anheften und wieder zu langen Filamenten auswachsen. *Thiothrix*-Zellen besitzen ein spezielles System, das sogenannte „holdfast“-Material zur Anheftung an Oberflächen oder anderen Zellen. Daran beteiligt sind Fimbrien, die nur an dem Zellende auftreten, mit dem sie sich anheften (Larkin und Nelson, 1987) und „schleimähnliche“ Substanzen (Larkin und Nelson, 1987). Es wurde gezeigt, dass dieses Material aus komplexen Polysacchariden (Merker und Smit, 1988) mit saueren Komponenten wie Uronsäuren (Umbreit und Pate, 1978) besteht. „Holdfast“-Material wurde auch bei anderen Organismen wie *Caulobacter crescentus* (Ong et al., 1990), wo es ebenfalls zur Anheftung an festen Oberflächen dient, und bei der Rosettenbildung von *Methylosinus trichosporium* OB3b entdeckt (Clapp et al., 1999). In mikroskopische Untersuchungen wurde auch bei den an der Lebensgemeinschaft des Sippenauer Moors beteiligten *Thiothrix*-Zellen solches „holdfast“-Material entdeckt, mit dem sie an die Kultivierungssysteme angeheftet waren.

Der zweite an der neuartigen Lebensgemeinschaft beteiligte Organismus ist ebenfalls ein filamentbildender Mikroorganismus. Dieser Organismus lagert sich in einem charakteristischen 90°-Winkel an die *Thiothrix*-Filamente an. Durch Isolierung mit der Laserpinzette in Verbindung mit der Objektivkühlung und durch unterschiedliche Plattierungen konnten insgesamt fünf Organismen isoliert werden, die morphologisch etwa diesem Organismus entsprachen. Durch Sequenzierung konnten alle der *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*-Gruppe zugeordnet werden. FISH mit der CFB-spezifischen Sonde CF319a/b (Manz et al., 1996) brachte jedoch mit keiner dieser Reinkulturen ein positives Hybridisierungssignal. Bei einer vergleichenden Untersuchung der 16S rRNA-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass die Sequenzen zu den Sonden eine bis drei Fehlpaarungen aufwiesen, was die negativen FISH-Ergebnisse erklärt (Daims et al., 1999; Wagner et al., 2003). Dadurch wurde außerdem gezeigt, dass Sonden, die lange Zeit als universell für bestimmte Organismengattungen oder -ordnungen betrachtet wurden, unter Umständen nicht für alle Vertreter dieser Gruppen gültig sind und so die Zuordnung bestimmter Organismen mittels FISH nicht zulassen. So wurde auch die Sonde EUB 338 als universell für die Bakterien beschrieben (Amann et al., 1990), und wird immer noch standardmäßig eingesetzt (Nübel et al., 2002), obwohl schon drei Jahre vorher gezeigt wurde, dass damit ganze bakterielle Ordnungen nicht nachweisbar sind (Daims et al., 1999). Durch die Konstruktion leicht abgewandelter Sonden konnten auch diese Gruppen erfasst werden

(Daims et al., 1999). Durch den Einsatz von Sondenmischungen kann also die Detektierbarkeit von verschiedenen Organismengruppen mittels FISH wesentlich verbessert werden (z. B. ARCH-Mix, Moissl et al., 2003; EUB-Mix, Rudolph et al., 2004). Aber selbst mit Sondengemischen kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Organismengruppen nicht detektiert werden. Dies konnte in dieser Arbeit bei vier Isolaten aus dem Sippenauer Moor belegt werden, bei denen über FISH keine eindeutige Zuordnung zu den Archaeen und Bakterien möglich war.

Da die drei isolierten CFB-Vertreter, die ein Sequenzkluster bilden nicht mit der Sonde CF319a/b hybridisierten, wurde eine neue spezifische FISH-Sonde konstruiert. Diese Sonde kann nun in Kombination mit der Sonde CF319a/b eingesetzt werden, um die Verteilung von CFB-Vertretern in unterschiedlichen Biotopen effektiver zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob einer der isolierten CFB-Vertreter der Partner der neuen Lebensgemeinschaft ist, wurde für den isolierten Organismus Sip100 außerdem eine artspezifische FISH-Sonde entwickelt. Mit dieser hochspezifischen Sonde, die selbst mit drei Basenaustauschen nur Sip100 detektiert, wurde durch FISH-Untersuchungen mit Originalproben eindeutig nachgewiesen, dass Sip100 der bakterielle Partner des *Crenarchaeons* ist. Diese Ergebnisse wurden durch spezifische Antikörper gegen Sip100 und anschließende Immuno-FISH bestätigt. Nach der erfolgreichen Isolierung von Sip100 wurde der Organismus genauer untersucht. Die Kolonien und Zellmassen zeigen eine rosa Färbung, was auf Flexirubin, ein für *Cytophagales* und *Flexibacter* charakteristisches Pigment hindeutet (Achenbach et al., 1978). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte um die Zellen eine dicke Schicht entdeckt werden, die bei der Gefrierätzung in Längsrichtung eine ungleichmäßige Struktur aufwies. Bei dieser Hülle handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Art „Schleimschicht“, die für alle *Cytophagales* beschrieben wurde (Bovallius, 1979; Pate und Ordal, 1967; Ridgway und Lewin, 1973; Ridgway et al., 1975; Strohl und Tait, 1978). Dieser Schleim wird oft für das Gleiten auf festen Oberflächen benutzt.

Cytophagales sind in Natur weit verbreitet und können in nahezu jedem Biotop angetroffen werden, sofern zumindest aerobe oder mikroaerophile Bedingungen herrschen. Sie spielen eine entscheidende Rolle am Stoffumsatz in den Biotopen. Sie produzieren eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, die teilweise schwer abbaubare Stoffe erfolgreich umsetzen. So können sie sehr effektiv Cellulose abbauen und wurden aus diesem Grund schon seit Beginn des letzten Jahrhunderts intensiv erforscht (z. B. Hutchinson und Clayton, 1919;

Winogradsky, 1929; Sijpesteijn und Fahraeus, 1949; Rivière, 1961; Hoening, 1985; Volokita et al., 2000). Die cellulolytischen Enzyme werden dabei an das Medium abgegeben (Vance et al., 1980; Kauri und Kushner, 1985), was bis jetzt bei anderen Organismen nicht nachgewiesen wurde (Chang und Thayer, 1977). Des Weiteren wurde gezeigt, dass einige Arten Chitin abbauen (Reichardt et al., 1983), oder dazu fähig sind, Stärke (Christensen, 1977; Jeang et al., 1995) und Kollagen (Sasagawa et al., 1993) zu hydrolysieren. Aus *Cytophagales*-Arten, die von marinen Algen isoliert wurden, konnten Agarasen (van der Meulen und Harder, 1975, 1976) und extrazelluläre Carrageenasen (Sarwar et al., 1987) erhalten werden. Durch diese Enzyme können die *Cytophagales* in der Natur und Industrie großen Schaden anrichten. So können sie beispielsweise die Blätter von Seegrass durchlöchern, was zu dessen Absterben führt (Porter et al., 1989). Ebenso können sie Probleme in Molkereien (Cousin, 1982; Guamis et al., 1987) und durch das Verderben von Obst (Lund, 1969, Liao und Wells, 1986) bereiten. Aufgrund der großen Anzahl bekannter Biopolymer-abbauender Enzyme bei Vertretern der *Cytophagales* ist es daher durchaus vorstellbar, dass sich die Sip100 Zellen an die Scheide von *Thiothrix* anlagern, um diese zu verstoffwechseln. Hinweise auf einen Abbau der *Thiothrix*-Zellen konnten durch FISH und DAPI-Färbungen erbracht werden. Sind die Filamente mit vielen Sip100-Zellen besetzt, nimmt die Fluoreszenz bei FISH stark ab. Stark befallene Filamente zeigen keinerlei DAPI-Signal mehr. Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen sie hyalin und bestehen scheinbar nur noch aus der sie umgebenden Scheide. Es ist also wahrscheinlich, dass die Sip100 Zellen am Absterben der *Thiothrix*-Zellen beteiligt sind.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an den Zellenden der Sip100-Zellen leichte Verdickungen nachgewiesen, mit denen sie an anderen Zellen angeheftet sind oder auch Rosetten ausbilden können. Hier könnte es sich ebenfalls um eine Art „holdfast material“ handeln, das die Anheftung an die *Thiothrix*-Filamente ermöglicht.

Anstelle der filamentösen *Thiothrix*-Filamente konnte auch eine im Sippenauer Moor vorkommende Rotalge als Partner der *Cytophagales*-Art fungieren. Diese Alge ist eine der wenigen Rotalgen, die in kalten Fließgewässern vorkommt. Durch die charakteristische Morphologie konnte sie der Gattung *Batrachospermum* (Froschlaichalge) zugeordnet werden. *Batrachospermales*-Arten produzieren Biopolymere wie verschleimende Galactane (Agar, Carrageenan), die nach außen abgegeben werden (Straßburger, 1998). Sie weisen Scheitelzellenwachstum auf, bei dem die Zellen am distalen Ende immer neu gebildet werden.

Nach phylogenetischen Untersuchungen der 18S rRNA wurde die im Sippenauer Moor gefundene Alge in den 18S rRNA-Stammbaum eingeordnet. In Übereinstimmung mit der morphologischen Einordnung konnte sie den *Batrachospermales* zugeordnet werden. Als nächster phylogenetischer Verwandter konnte *Batrachospermum gelatinosum* (Saunders und Kraft, 1992) festgelegt werden (0,36% phylogenetischer Abstand). Die Sip100-Zellen lagern sich immer im 90°-Winkel an den Scheitelzellen der Algenfilamente an. Durch ihre Biopolymer-abbauenden Enzyme (s. oben) könnten sie die von der Alge abgegebenen, verschleimenden Galactane wie Agar und Carrageenan abbauen und verstoffwechseln. Ein Abbau oder Schädigung der Algen selbst konnte im Gegensatz zu anderen CFB-Arten (Porter et al., 1989) nicht aufgezeigt werden, weswegen es sich wahrscheinlich um eine Metabiose (Schink, 1992) handelt. Jedoch konnte die Alge Sip100-Zellen vom Spätherbst bis ins Frühjahr als Ersatz für die *Thiothrix*-Filamente dienen. Über die Sommermonate hinweg war die Sonneneinstrahlung durch den dichten Bewuchs mit Schilf und Blättern zu gering, so dass kein Algenwachstum möglich war. Sip100-Zellen waren dann nur an den *Thiothrix*-Filamenten angeheftet. Die Alge wuchs in kleinen Büscheln und zeigte einen weißlichen Bewuchs von *Thiothrix*-Filamenten.

Der dritte an dieser spezifischen Lebensgemeinschaft beteiligte Mikroorganismus lagert sich wiederum im 90°-Winkel an den *Cytophagales* an. Durch FISH mit verschiedenen archaeellen Sonden und dem ARCH-Mix (Moissl et al., 2003) konnte der Organismus den Archaeen zugeordnet werden. Mit der Sonde Cren499 (Burggraf et al., 1994) und einer neu konstruierten *Crenarchaeota*-spezifischen Sonde (Koch, 2001) konnte er weiter dem Reich der *Crenarchaeota* zugeordnet werden. Eine Visualisierung von *Crenarchaeota* innerhalb kalter Biotope ist bis jetzt nur in sehr wenigen Fällen gelungen (Jurgens et al., 2000; Simon et al., 2000). Mit „*Cenarchaeum symbiosum*“ gelang erstmals 1996 der visuelle Nachweis einer stabilen Population von *Crenarchaeota* in dem marinen Schwamm *Axinella mexicana* (Preston et al., 1996). Mit der crenarchaeell/bakteriellen Lebensgemeinschaft im Sippenauer Moor wurde zum zweiten Mal eine *Crenarchaeota* enthaltende Organismenassoziation über einen langen Zeitraum (sieben Jahre) stabil in einem kaltgemäßigten Biotop nachgewiesen (Rudolph, 1998; Koch, 2001).

In Anreicherungen mit Hilfe des neuen *in-situ* Kultivierungsystems und Laborkulturen konnte gezeigt werden, dass das Auftreten der *Crenarchaeota* offensichtlich direkt von der Zellzahl der Sip100-Zellen abhängig ist. Bei *in-situ* Kultivierungen direkt im Biotop musste sich erst

eine gewisse Anzahl von Sip100-Zellen an die *Thiothrix*-Filamente anlagern, bevor die ersten kokkoiden Zellen oder kurzen Stäbchen der *Crenarchaeota* nachgewiesen wurden. Ein Grund hierfür könnte die Aussendung von Quorum-sensing Signalen der *Cytophagales* sein. Quorum-sensing ermöglicht es den Mikroorganismen, untereinander zu kommunizieren und sich dadurch wie ein multizellulärer Organismus zu verhalten. So können sie von Vorteilen profitieren, die sonst nur mehrzelligen Eukaryonten vorbehalten sind. Botenstoffe, die von den Organismen zur Kommunikation ausgesendet werden, sind oft Homoserinlaktone (HSL) unterschiedlicher Art. Bei Verwendung von HSLs in Anreicherungskulturen, kann teilweise die Kultivierbarkeit von Mikroorganismen gefördert werden (Bruns et al., 2003). *Vibrio fischeri* kann durch die Aussendung von HSLs Biolumineszenz hervorrufen (Engebrecht et al., 1983). Durch die Aussendung von HSLs wird bei *Pseudomonas aeruginosa* die Biofilmformation (Pearson et al., 1994; Dekievit und Iglewski, 2000) und bei *Erwinia carotovora* die Produktion von Exoenzymen ausgelöst (Pirhonen et al., 1993). Letzteres könnte auch bei der neuen Lebensgemeinschaft der Fall sein. Beim Erreichen einer bestimmten Zelldichte könnten von Sip100-Zellen HSLs freigesetzt werden, die die Synthese von Exoenzymen veranlassen, um *Thiothrix*-Zellen abzubauen. Durch die Freisetzung dieser HSLs könnte der crenarchaeelle Organismus angelockt werden. Möglicherweise verfügt er über ein Chemotaxis-System, da er immer erst ab einer bestimmten Anzahl von Sip100-Zellen nachgewiesen werden kann. Chemotaxis ist unter beweglichen Mikroorganismen weit verbreitet (Weibull, 1960) und in vielen Biotopen von großer ökologischer Bedeutung (Chet und Mitchell, 1976). Auch bei *Bdellovibrio* wurde ein Chemotaxis-System für verschiedene Komponenten wie Organik, Aminosäuren, Zucker und anorganische Ionen gezeigt (Straley et al., 1977).

Es wurde gezeigt, dass die Besiedelung der Sip100-Zellen durch die *Crenarchaeota* in folgender Weise verläuft: Einzelne kokkoide Zellen oder kurze Stäbchen der *Crenarchaeota* hefteten sich an die Sip100-Zellen an und wuchsen dann rechtwinklig zu Stäbchen aus. Die *Crenarchaeota*-Zellen waren im Anheftungsstadium sehr klein und in der Größe mit parasitär lebenden Mikroorganismen wie *Bdellovibrio* (0,2-0,4 x 1-2 µm; Stolp und Starr, 1963), *Vampirococcus* (0,6µm Durchmesser; Esteve et al., 1983) und *Daptobacter* (0,5 x 1,5 µm; Guerrero et al., 1986) vergleichbar. Mit zunehmender Länge (bis zu etwa 4-5 µm) zeigten sich am freien Ende kleine kokkoide Einzelzellen, die sich abschnürten. Die kokkoiden Zellen wurden freigesetzt und schienen sich sofort wieder an der gleichen oder einer benachbarten

Sip100-Zelle anzuheften. Die *Crenarchaeota* könnten also einen biphasischen Lebenszyklus wie z.B. *Caulobacter crescentus* aufweisen. *Caulobacter*-Zellen heften sich an Substrat an und bilden einen Stiel aus. Die Einzelzellen wachsen und produzieren eine begeißelte Tochterzelle, die für die Verbreitung zuständig ist und sich mit ihrem „holdfast“-Material (Ong et al., 1990) an neuem Substrat anheftet. Daraufhin wird die Geißel abgeworfen und erneut der charakteristische Stiel ausgebildet (Poindexter, 1964). Die beweglichen kokkoiden Tochterzellen der *Crenarchaeota* könnten in einem ähnlichen System durch die HSLs von Sip100-Zellen angelockt werden, sich auf ihnen festsetzen und ihre Geißeln verlieren. Nach der Elongation der Zellen werden dann am freien Zellende neue Tochterzellen freigesetzt. Durch FISH-Untersuchungen mit Originalproben und Anreicherungen konnte gezeigt werden, dass Sip100-Zellen durch aufsitzende *Crenarchaeota* geschädigt werden. Befallene Zellen zeigten teilweise nur noch schwache oder keine Fluoreszenz mehr, während benachbarte unbefallene Zellen die normale Färbung zeigten. Dies weist auf einen sehr niedrigen Ribosomengehalt hin (Roszak et al., 1987; Kotler et al., 1993). Auch bei DAPI-Färbungen konnte teilweise nur noch schwache Fluoreszenz nachgewiesen werden. Bei Anreicherungskulturen, in denen die *Crenarchaeota* kurzzeitig angereichert werden konnten zeigte sich mit Zunahme der *Crenarchaeota* eine sehr starke Abnahme der Sip100-Zellen. Waren nur noch wenige oder keine Sip100-Zellen mehr vorhanden, konnten auch keine *Crenarchaeota* mehr durch FISH nachgewiesen werden. Aus diesen Untersuchungen kann eine parasitäre Beziehung zwischen dem *Crenarchaeon* und den Sip100 Zellen abgeleitet werden. Über parasitäre Beziehungen zwischen Archaeen und Bakterien ist bis jetzt noch nichts bekannt. Im Gegensatz dazu wurden innerhalb der Bakterien einige Arten isoliert, die andere Bakterien parasitieren. Es wurden verschiedene Angriffsstrategien aufgedeckt. Mikroorganismen wie *Ensifer*, *Micavibrio*, *Vampirococcus* und *Vampirovibrio* binden außen an den Wirt und „saugen“ den Wirt aus. *Daptobacter* dagegen dringt in das Cytoplasma des Wirts ein. *Bdellovibrio* bzw. *Bacteriovorax* dringen in den cytoplasmatischen Raum des Wirtes ein und vermehren sich dort durch Verstoffwechslung des Wirts-Cytoplasmas. Um die Zellwand der Gram(-)-Wirtszellen zu durchdringen sind neben mechanischen Bewegungen ein Reihe von Enzymen beteiligt. Bei den beteiligten Enzymen handelt es sich um eine Lipopolysaccharidase und folgende drei, gegen das Wirts-Petidoglykan gerichtete Enzyme: Eine Glykanase, die sehr schnell die Auflösung von etwa 10% des N-Acetylglucosamins katalysiert, eine Deacetylase, die das Peptidoglykan deacetyliert, um es für den Angriff der

Glykanase zugänglich zu machen, und eine Peptidase, die lösliche Diaminopimelinsäure (DAP) während des gesamten intraperiplasmischen Lebenszyklus von *Bedellovibrio* freisetzt (Fackrell und Robinson, 1973; Huang und Starr, 1973; Thomashow und Rittenberg, 1978a, 1978b; Tudor et al., 1990).

Das *Crenarchaeon* der neuartigen Lebensgemeinschaft sollte ähnlich wie z.B. *Vampirococcus* spezielle Enzyme besitzen, mit denen es die dicke Schleimschicht und die Gram(-)-Zellwand der Sip100-Zellen durchdringen kann, um an das nährstoffreiche Cytoplasma zu gelangen.

Nach eingehenden Untersuchungen der neuen Lebensgemeinschaft kann sowohl für die Sip100-Zellen, wie auch für das *Crenarchaeon* eine parasitäre Lebensweise angenommen werden. Da an der Gemeinschaft Organismen aller drei Domänen beteiligt sein können, sind optimale Bedingungen für einen lateralen Inter-Domänen-Gentransfer gegeben. Dieser wird durch die parasitäre Lebensweise noch gefördert, da DNA leicht ausgetauscht werden kann. Lateraler Gentransfer zwischen hyperthermophilen Bakterien und Archaeen konnte kürzlich durch vergleichende Genomanalysen nachgewiesen werden (Doolittle, 1997; Nelson et al., 1999; Watnick und Kolter, 2000). So enthält das Genom des Archaeums *Methanosarcina mazei* etwa 33% ORFs (1,043 von 3,371), die denen der bakteriellen Domäne ähneln (Deppenmeier et al., 2002). Das Bakterium *Thermotoga maritima* hingegen hat 24% Gene, die archaeellen Genen gleichen (Nelson et al., 1999).

Durch kurzzeitige Anreicherungen der neuartigen Lebensgemeinschaft konnten die ersten physiologischen Daten des *Crenarchaeons* erarbeitet werden. Da nur Wachstum bei 10°C nicht aber bei 20°C detektiert werden konnte, kann angenommen werden, dass es sich um einen psychrophilen Organismus handelt (Morita, 1975). Das Wachstum bei einer Sauerstoffkonzentration von 5-10% steht im Einklang mit den Bedingungen im Biotop Sippenauer Moor (~6,5%).

Bei vergleichenden FISH-Untersuchungen von unterschiedlichen Proben aus dem Sippenauer Moor wurde die crenarchaeell/bakterielle Lebensgemeinschaft in bräunlich grünen Streamern oder den weißlich bewachsenen Rotalgen festgestellt werden. Da die Grundlage der bräunlichen Streamer durch filamentöse Grünalgen darstellt wird, deutet dies auf eine direkte Abhängigkeit der Lebensgemeinschaft von filamentösen Algen hin. Die Assoziation von Algen, *Thiothrix*, Sip100 und *Crenarchaeon* bildet wahrscheinlich ein kleines Mikrobiotop wie die Perlen des SM1 Archaeons (Moissl, 2003; Rudolph, 2004). Die Algen produzieren Sauerstoff, den *Thiothrix* zur Schwefeloxidation benutzt. Zudem stellen die Algen die

ausgeschiedenen Biopolymere zur Verfügung, welche womöglich von den Sip100-Zellen abgebaut werden. Es könnte so ein konstantes System innerhalb der Algenbüschel geschaffen werden. Dieses System wird jedoch nur solange Aufrecht erhalten, wie genügend *Thiothrix* und Sip100-Zellen vorhanden sind. Waren die Sip100 Zellen verschwunden, wurden auch die *Crenarchaeota* nicht mehr durch FISH nachgewiesen. Dies konnte sowohl in den Laborkulturen als auch direkt im Biotop festgestellt werden. Wurden von einem Algenbüschel an einem Tag sehr viel dieser Lebensgemeinschaften gefunden, konnten sie teilweise zwei bis drei Tage später im gleichen Algenbüschel nicht mehr aufgefunden werden. Dies könnte durch eine hohe Stoffwechselrate der *Crenarchaeota* erklärt werden, wie sie auch für andere Parasiten wie *Bdellovibrio* beschrieben wurde (Hespell et al., 1973). Sind die Wirtszellen lysiert, werden die Energiereserven der parasitischen Zellen sehr schnell aufgebraucht und die Ribosomenzahl erniedrigt. Die Zellen können durch den geringen Ribosomengehalt nicht mehr über FISH nachgewiesen werden. Dies würde in Einklang mit den Laborkulturen der Lebensgemeinschaft stehen, wo nahezu gleichzeitig mit dem Verschwinden der Sip100-Zellen auch die *Crenarchaeota* nicht mehr durch FISH detektiert werden konnten.

Durch die spezifische Sip100-Sonde konnte mit Originalproben gezeigt werden, dass die *Crenarchaeota* ausschließlich an Sip100-Zellen angeheftet sind, obwohl diese nur in sehr geringen Zahlen im Vergleich mit nahe verwandten anderen CFBs im Biotop vorkommen. Dies deutet auf eine artspezifische Abhängigkeit hin, was auch auf immunologischem Weg über spezifische Antikörper gegen Sip100 gezeigt wurde. Durch die spezifischen Antikörper war es möglich Zellvereinzellungen von Sip100-Zellen mit angehefteten *Crenarchaeota*-Zellen über paramagnetische Partikel durchzuführen. Hierzu wurden die Antikörper an Dynabeads gekoppelt und zusammen mit der Zellsuspension inkubiert. Es konnten zwar erfolgreich Sip100-Zellen vereinzelt und Medien damit angeimpft werden, allerdings war die Anzahl der passiv mit vereinzelt *Crenarchaeota*-Zellen zu gering, um Wachstum zu erhalten oder eine PCR durchzuführen. Durch die relativ großen Zellen und Zellkluster von Sip100 waren die Scherkräfte bei den erforderlichen Waschschrritten so groß, dass viele Zellen wieder von den Antikörpern getrennt und verworfen wurden.

Mit Hilfe des Laserkatapults, das in der Pathologie häufig zur Gewebevereinzellung eingesetzt wird (Fink et al., 2000, 2002) sollten Einzelzellen der *Crenarchaeota* vereinzelt werden, um die 16S rRNA in der anschließenden Einzelzell-PCR zu erhalten (Zhang et al., 1992). Hierzu mussten Vorversuche zur Amplifizierbarkeit FISH-hybridisierter Zellen durchgeführt werden.

Es wurde ein System entwickelt, bei dem die gefärbten Zellen erfolgreich amplifiziert werden konnten (Rudolph, 2003). Bei der Zellvereinzelung mittels Laserkatapult wurden erfolgreich crenarchaeelle Zellen vereinzelt, jedoch konnte kein 16S rRNA-Gen amplifiziert werden. Grund hierfür könnten zu geringe Zellmengen gewesen sein, die mit dem lehrstuhleigenen Cycler nicht detektierbar waren, da dessen Effizienz wesentlich geringer als die eines Lightcyclers ist (Rudolph, 2003). Zudem konnte nicht sichergestellt werden, dass für diese *Crenarchaeota* die Standard-Archaeen-Primer binden können. Hier könnte es zu ähnlichen Problemen wie bei *Nanoarchaeum equitans* gekommen sein (Huber et al., 2002).

In einem anderen Ansatz sollten Sip100-Zellen mit anhaftenden *Crenarchaeota* über den Zellsorter abgetrennt werden. Durch die spezifische Sip100 FISH-Sonde konnten Sip100-Zellen gefärbt, vom Zellsorter detektiert und vereinzelt werden. Die angehefteten *Crenarchaeota*-Zellen sollten passiv mit vereinzelt werden, um durch anschließende Ganzzell-PCR die archaeelle 16S rRNA-Gensequenz des *Crenarchaeons* zu erhalten. Es konnten zwar einzelne Sip100-Zellen vereinzelt werden, jedoch wurde der Vorgang durch *Thiothrix*-Filamente, die durch Aufreinigungsmethoden nicht beseitigt werden konnten erschwert, da die Zellsorterdüse verstopft wurde. Eine PCR wurde wegen der geringen archaeellen Zellzahl nicht durchgeführt, da sie unter der Nachweisgrenze des Cyclers lag.

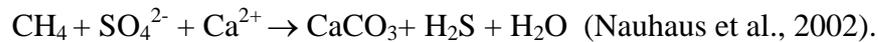
Um das Vorhandensein der spezifischen crenarchaeellen Organismen auch durch eine FISH-unabhängige Methode zu bestätigen (Ward et al., 1998; Watanabe et al., 2000), wurden phylogenetische Untersuchungen an Strukturen, die diese Lebensgemeinschaft enthielten, durchgeführt. Zum Einsatz kamen zum einen *Crenarchaeota*-spezifische PCR-Primer sowie Primer, deren entsprechende Sonden ein positives Hybridisierungssignal mit den *Crenarchaeota* lieferten. PCR-hemmende Huminsäuren wurden durch eine spezielle Aufreinigungsmethode (Koch, 2001) erfolgreich beseitigt. Die erhaltenen Klonsequenzen bilden zusammen mit den Sequenzen aus Koch, 2001 ein Sequenzkluster innerhalb der „Marine Group I“ (Vetriani et al., 1998, 1999) sowie ein Sequenzkluster innerhalb der „Freshwater and Marine Benthic Group“ (Vetriani et al., 1998, 1999). Die Marine Group I enthält 16S rRNA-Gensequenzen aus marinen Biotopen (DeLong, 1992; Preston et al., 1996; Massana et al., 1997; Van der Maarel et al., 1998) sowie Sequenzen aus Süßwassersedimenten (McGregor et al., 1997). Innerhalb der Freshwater and Marine Benthic Group sind Sequenzen aus Süßwassersedimenten (Hershberger et al., 1996) und Reisfeldern (Großkopf et al., 1998) vertreten. Mit unterschiedlichsten Primerkombinationen konnten

immer nur Sequenzen aus diesen zwei Gruppen erhalten werden, was darauf hindeuten könnte, dass sie die beiden dominierenden crenarchaeellen Gruppen innerhalb des Sippenauer Moors sind. Alle erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen innerhalb der Marine Group I weisen einen phylogenetischen Abstand zu „*Cenarchaeum symbiosum*“ von mindestens 5,4%, die der Freshwater and Marine Benthic Group einen phylogenetischen Abstand von >20% auf. Auffallend war der niedrige GC-Gehalt der neuen 16S rRNA-Sequenzen innerhalb der Marine Group I von 50-51%, was im Einklang mit früheren Untersuchungen steht (DeLong, 1992). Der GC-Gehalt der neuen Sequenzen innerhalb der Freshwater and Marine Benthic Group bewegte sich zwischen 55-59% und war damit wesentlich höher als der der Marine Group I. Die niedrigen GC-Gehalte der 16S rRNA-Sequenzen lassen auf eine Aktivität der zugehörigen Organismen bei niedrigen Temperaturen schliessen (Woese et al., 1991; DeLong, 1992).

Speziell auf diese Sequenzen konstruierte FISH-Sonden lieferten keine positiven Hybridisierungssignale. Dies könnte jedoch dadurch erklärt werden, dass die Organismen in so geringen Zellzahlen vorkommen, dass sie mit dem Mikroskop nicht mehr erkannt werden ($<10^3$ - 10^4 Zellen/ml; Fox, 2003). Zudem kann die schlechte Zugänglichkeit des rRNA-Moleküls aufgrund der Sekundärstruktur eine erfolgreiche Bindung verhindern (Jurgens et al., 2000; Amann und Ludwig, 2000; Wagner et al., 2003).

Da Organismen in kalten Biotopen oft eine sehr lange Generationszeit haben und oft in geringen Zellzahlen vorkommen, dass sie mit dem Mikroskop nur schwer detektiert werden können (Zellzahlen $<10^3$ - 10^4 /ml; Fox, 2003), wurden Langzeitinkubationsversuche durchgeführt. Es konnten so eine Vielzahl morphologisch und phylogenetisch neuartiger Archaeen aus dem Sippenauer Moor und dem Islinger Mühlbach angereichert und als stabile Laborkulturen für mehr als zwei Jahren gehalten werden. Eine Anreicherung zeigte vereinzelt Ansammlungen von kokkoiden archaeellen Zellen, die immer mit einer Hülle von ebenfalls kokkoiden Bakterien umgeben war. Sie erinnerte in ihrer Zusammensetzung stark an das Konsortium der Anaeroben Methanoxidation (Abb. 68; Boetius et al., 2000). Bei diesem Konsortium sind sulfatreduzierende Bakterien (*Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe) um ca. 100 methanoxidierende Archaeen angeordnet, wobei die physiologische Abhängigkeit als bewiesen gilt. Die biochemischen Stoffwechselwege der anaeroben Methanoxidation sind immer noch spekulativ und bis jetzt konnte noch kein Organismus dieses Stoffwechselweges

isoliert werden (Michaelis et al., 2002). Methan wird mit äquimolaren Mengen von Sulfat oxidiert, wodurch Carbonat und Sulfid erzeugt wird:



Das Vorhandensein von vielen verschiedenen methanogenen Organismen im Islinger Mühlbach, die in den Anreicherungen erhalten wurden, könnte diese Theorie stützen, da sie das Methan zur Verfügung stellen könnten. Das Vorhandensein von 16 mg/l SO_4^{2-} im Biotop Islinger Mühlbach wurde ebenfalls nachgewiesen (Rudolph et al., 2004). Auch in den Anreicherungskulturen kommen diese Konsortien immer nur in Verbindung mit verschiedenen methanogenen Organismen vor. In diesen Ansätzen sind jeweils 0,01% an Sulfat enthalten. Es könnte sich hier also tatsächlich um ein anaerob Methanoxidierendes Konsortium handeln.

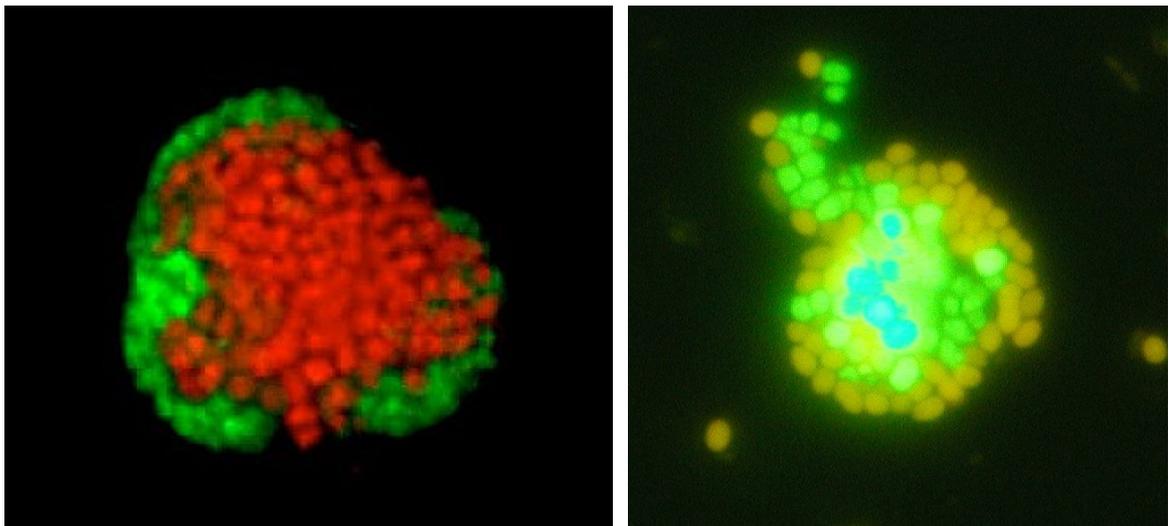


Abb. 68: Links: Abbildung des Methanoxidiererkonsortiums (Quelle: www.mpi-bremen.de).
Archaea sind rot gefärbt, bakterielle Sulfatreduzierer grün.

Rechts: Fluoreszenzaufnahme einer archaeellen Anreicherung aus dem Sippenauer Moor. Die Archaeen sind grün gefärbt, die Bakterien gelblich

Durch phylogenetische Untersuchungen der unterschiedlichen Anreicherungen konnten insgesamt 15 euryarchaeelle und eine crenarchaeelle 16S rRNA-Klonsequenzen erhalten werden. Die GC-Gehalte aller erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen lagen bei 53-57%, was auf eine Aktivität der Organismen bei niedrigen Temperaturen hindeutet (Woese et al., 1991; DeLong, 1992).

Bei der Analyse der Sequenzen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den angereicherten Organismen um neue archaeelle Arten, Gattungen und sogar Ordnungen handeln könnte, da teilweise Sequenzunterschiede von fast 30% zum nächsten kultivierten Verwandten vorlagen. Durch unterschiedliche Methoden konnten zwei Archaeen von den anderen Morphotypen abgetrennt werden. Durch eine Kombination aus elektronenmikroskopischen und phylogenetischen Untersuchungen konnten diese zwei Organismen näher eingeordnet werden. Einer dieser Organismen aus Anreicherungen aus dem Islinger Mühlbach konnte durch seine Morphologie und auffälligen charakteristischen Endstrukturen über die Elektronenmikroskopie eindeutig der Gattung *Methanospirillum* zugeordnet werden (Briegel, 2004). Diese Endstrukturen, die sogenannten „plugs“ geben seit ihrer Entdeckung den Forschern Rätsel auf (Zeikus und Bowen, 1975; Shaw et al., 1985; Beveridge et al., 1990; Southam et al., 1993; Firtel et al., 1994). In diese „terminal plugs“ inserieren die Flagellen. Der nächste kultivierte Verwandte dieses Organismus ist das Archaeum *Methanospirillum hungatei* (Ferry et al., 1974) mit einem phylogenetischen Abstand von 4,6%, was auf der Ebene einer neuen Art liegen sollte. Es wäre somit die zweite Art innerhalb der Methanospirillen. Das Temperaturoptimum von *Methanospirillum hungatei* liegt bei 30-37°C, während die angereicherten Archaeen optimal bei 30°C wachsen und bei 37°C kein Wachstum mehr aufweisen. Auch dies würde auf eine neue Art hinweisen.

Aus dem Sippenauer Moor konnten stäbchenförmige Archaeen angereichert werden. Durch die phylogenetischen Untersuchungen konnte *Methanoculleus bourgensis* (früher: *Methanogenium bourgense*; Ollivier et al., 1986) als nächster Verwandter bestimmt werden. Es zeigte sich, dass durch diese Analysen zwei verschiedene, nahe verwandte Sequenzen erhalten wurden, obwohl die Archaeen über Mikroskopie nicht voneinander unterschieden werden konnten. Dieses Ergebnis konnte durch die Elektronenmikroskopie bestätigt werden, da zwei unterschiedliche Oberflächenstrukturen identifiziert wurden. Zudem konnte über FISH, Elektronenmikroskopie und Phylogenie ein Organismus aus dem Islinger Mühlbach ebenfalls diesen Organismen zugeordnet werden. Die drei Organismen bilden ein Sequenzkluster mit einem phylogenetischen Abstand von 7,25-9,8% zu *Methanoculleus bourgensis*, was auf der Ebene einer neuen Gattung liegen sollte. Zudem handelt es sich hier um stäbchenförmige Organismen, während es sich bei allen nächsten Verwandten (*Methanogenium*, *Methanocorpusculum*) um kokkoide Zellen handelt. Die Wachstumstemperaturen von 2-30°C dieses neuen Organismus weichen deutlich von denen

des nächsten Verwandten *Methanoculleus bourgensis* (Wachstumsoptimum 35-40°C), was auf eine psychrotolerante Organismengattung schließen lässt (Morita, 1975).

Aus Anreicherungen des Islinger Mühlbachs konnte außerdem ein Organismus angereichert werden, der morphologisch *Methanosaeta* ähnlich sieht und eine ungewöhnliche Oberflächenstruktur aus Querstreifen verschiedener Breite aufweist. Durch die Phylogenie konnte eine 16S rRNA-Gensequenz nachgewiesen werden, die 2,22% Abstand zu *Methanosaeta soehngeni* (Patel, 1990) aufweist.

Andere angereicherte Organismen konnten nicht eindeutig den erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen zugeordnet werden, jedoch deutet die morphologische und phylogenetische Variabilität auf eine Vielzahl neuartiger bisher unbekannter Archaeen aus kalten sulfidischen Gewässern hin.

Mit SipMet1 wurde zum ersten Mal ein psychrotoleranter methanogener Organismus mit Hilfe des Lasermikroskops mit integrierter Objektivkühlung zweifach vereinzelt. Wachstum konnte nur auf Dimethylamin nachgewiesen werden, wobei komplexe organische Zusätze stimulierend wirkten. Damit unterscheidet sich das Isolat SipMet1 von seinem nächsten Verwandten *Methanomethylovorans hollandica* (Lomans et al., 1999) der auch Methylamin, Trimethylamin, Methanol und DMS verwerten kann. Auch in der optimalen Wachstumstemperatur können Unterschiede festgestellt werden. SipMet1 wächst optimal bei 30°C, während *Methanomethylovorans hollandica* optimal zwischen 34-37°C wächst. Bei SipMet1 wurde auch noch bei 4°C langsames Wachstum festgestellt, während *Methanomethylovorans hollandica* max. bis 12°C wachsen kann. Aufgrund dieser Unterschiede wurde für die neue Reinkultur SipMet1 der Artnamen *Methanomethylovorans psychrotolerans* vorgeschlagen.

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnte das Wachstum eines kälteliebenden *Crenarchaeons* im kalten, sulfidischen Wasser des Sippener Moors in einer spezifischen Lebensgemeinschaft mit zwei Bakterien und einer Rotlage nachgewiesen werden. Die konstante Wassertemperatur des Mineralbachs über das ganze Jahr und Daten aus Kultivierungen deuten darauf hin, dass es sich bei dem *Crenarchaeon* um einen psychrophilen Organismus handelt. Durch die Etablierung eines neuen *in-situ* Kultivierungssystems konnten Einblicke in den komplexen Lebenszyklus und das Zusammenspiel der Organismen in Systemen, an denen Organismen verschiedener Domänen

beteiligt sind, gewonnen werden. Das Kultivierungssystem kann bei Verwendung in anderen Biotopen womöglich weitere, bisher unbekannte Lebensgemeinschaften aufdecken.

Durch die Anreicherung und Erforschung von vielen neuartigen, bisher unbekanntem Archaeen aus kalten sulfidischen Quellen konnte gezeigt werden, welche archaeelle Diversität innerhalb dieser kalten Biotope herrscht, was lange Zeit für nicht möglich gehalten wurde. Durch die Anreicherungen ist die Grundlage für die Isolation dieser kälteliebenden Organismen gegeben, wodurch tiefgreifende Einblicke in die ökologische Bedeutung dieser Archaeen erhalten werden können.

V. Vorschlag zur Beschreibung einer Art

Genus: *Methanomethylovorans* (Lomans et al., 1999)

Spezies: *Methanomethylovorans psychrotolerans* (psy.chro.to1e.rans, Gr. adj. *psychros* kalt, L. part. adj. *tolerans* tolerieren; N.L. neut. Part. adj. *psychrotolerans* toleriert kalte Umgebungen)

Die Zellen sind unregelmäßig, unbeweglich, kokkoid (Durchmesser ~0.9-1 µm) und Gram(-). Die Zellen wachsen normalerweise in Zellanhäufungen von zwei bis vier Zellen, die grosse Aggregate bilden können. Dimethylamin ist ein Stoffwechselsubstrat, H₂CO₂ und Acetat können nicht verwendet werden. Zusatz von komplexen organischen Substraten (C-Org-Mix, Brain Heart Infusion, Pepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt) wirken stimulierend auf das Wachstum mit Dimethylamin. Bereits bei 0,05M NaCl im Medium konnte kein Wachstum mehr nachgewiesen werden. Wachstum wurde bei einem pH-Wert von pH 5,0-7,5 gezeigt, das Optimum lag bei pH 6,0-7,0. Wachstum konnte von 4-40°C gezeigt werden, wobei das Optimum bei 30°C lag. Der Organismus hat keinen erkennbaren S-Layer und keine Flagellen. Kurze Zellanhänge können vermutet werden.

Der Organismus wurde aus anaeroben Sedimenten des Quelltopfs des Sippenauer Moors (der von mehreren sulfidischen Quellen gespeist wird) isoliert.

Der Stamm wird in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Deutschland) und in der American Type Culture Collection (USA) hinterlegt.

VI. Zusammenfassung

In den kalten (10°C), sulfidischen Quellen des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor, wurde eine charakteristisch strukturierte Lebensgemeinschaft aus drei verschiedenen Organismen gefunden. An der Ausbildung dieser Lebensgemeinschaft sind Vertreter aus zwei bzw. allen drei Domänen des Lebens beteiligt. Das System kann zum einen aus zwei Bakterien (*Thiothrix* sp.; Sip100, ein Vertreter der *Cytophagales*) und einem *Crenarchaeon* bestehen. Die Organismen sind dabei jeweils in einem charakteristischen 90°-Winkel an die anderen Organismen angehaftet. Durch ein neu entwickeltes *in-situ* Kultivierungssystem ist es gelungen, die zeitliche Abfolge der Bildung dieser charakteristischen Lebensgemeinschaft aufzuklären. *Thiothrix* bildet durch die Anheftung seiner langen Filamente den Grundstein zur Besiedelung des Kultivierungssystems. Sip100 heftet sich im 90°-Winkel an die *Thiothrix*-Filamente und wird ab einer bestimmten Zellzahl nach kurzer Zeit mit crenarchaeellen Zellen im 90°-Winkel besiedelt. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass sowohl die Beziehung Sip100 zu *Thiothrix* als auch die des *Crenarchaeons* zu Sip100 von parasitischer Natur sind. Als Ersatz für die *Thiothrix*-Filamente kann die Rotalge *Batrachospermum* sp. fungieren. Sip100-Zellen heften sich dann an die Scheitelzellen der Alge an und verstoffwechseln höchstwahrscheinlich die von der Rotalge ausgeschiedenen Biopolymere. Auch hier sind die Sip100-Zellen wieder mit den *Crenarchaeota* besetzt.

Neben dem mikroskopischen Auffinden von *Crenarchaeota* im Sippenauer Moor mittels FISH konnten diese auch über phylogenetische Untersuchungen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz des Lasermikroskops mit integrierter Objektivkühlung zur Zellvereinzelung wurden Sip100 und drei weitere Vertreter der CFB-Gruppe in Reinkultur gebracht, was über Standard-Isolationsmethoden an diesem System nicht möglich war. Dadurch konnten Anreicherungsansätze mit Sip100 durchgeführt werden, durch die das *Crenarchaeon* kurzzeitig im Labor kultiviert werden konnte. So wurden erste physiologische Daten des *Crenarchaeons* erhalten. Aufgrund seiner niedrigen Wachstumstemperatur handelt es sich vermutlich um einen psychrophilen Vertreter der *Crenarchaeota*. Durch Produktion von spezifischen Antikörpern und Gensonden gegen Sip100 konnte sowohl die spezifische Bindung des *Crenarchaeons* an Sip100 bewiesen, als auch neue Isolationsmethoden (Immuno-magnetische Zellvereinzelung; Verwendung des Zellsorters) durchgeführt werden.

Durch Langzeit-Inkubationsversuche mit Proben aus kalten (10°C), sulfidischen Gewässern des Sippenauer Moors und des Islinger Mühlbachs konnten des weiteren einige völlig neuartige Archaeen in stabilen Laborkulturen gezüchtet werden. Phylogenetische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Anreicherungskulturen zeigten, dass hier neue archaeelle Arten, Gattungen und sogar Ordnungen in stabiler Laborkultur erhalten wurden, obwohl diese im Biotop kaum mikroskopisch nachweisbar waren.

Mit SipMet1 *Methanomethylovorans psychrotolerans* wurde zum ersten Mal ein psychrotoleranter methanogener Organismus mit Hilfe des Lasermikroskops mit integrierter Objektivkühlung vereinzelt und beschrieben.

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnten Einblicke in den komplexen Lebenskreislauf bisher unbekannter kälteliebender Archaeen in neuartigen Organismengemeinschaften gewonnen werden. Zudem wurde die große Diversität von bisher unbekanntem Organismen und Lebensgemeinschaften in kalten Biotopen aufgezeigt.

Literaturverzeichnis

1. Strasburger - Lehrbuch der Botanik. 1998. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena Lübeck.
2. Community Structure and Co-operation in Biofilms. 2005. Cambridge University Press, Cambridge.
3. **Achenbach, H.** 1987. The pigments of the flexirubin-type. A novel class of natural products. Fortsch. Chem. Org. Naturst. **52**:73-111.
4. **Adler, J.** 1974. Chemoreception and chemotaxis in *bacteria*, p. 107-131. In L. Jaenicke (ed.), Biochemistry of sensory functions. Springer-Verlag, Berlin.
5. **Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**:762-770.
6. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143-169.
7. **Amann, R. I.** 1995. *In-situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes (3.3.6), p. 1-15. In A. D. L. Akkermans, Van Elsas J.D., and De Bruijn F.J. (eds.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
8. **Amann, R. I.** 1995. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Molecular Ecology **4**:543-554.
9. **Amann, R. I. and W. Ludwig.** 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. **24**:555-565.
10. **Amann, T.** Biochemische und oysiologische Untersuchungen neuartiger Archaeen sulfidischer Gewässer. 2003. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
11. **Angles, M. L., K. C. Marshall, and A. E. Goodman.** 1993. Plasmid transfer between marine *bacteria* in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **59**:843-850.
12. **Apel, R.** 1978. Hydrogeologische Verhältnisse, p. 335-343. In K. H. Weber (ed.), Erläuterungen zum Blatt Nr. 7137 Abensberg. Bayerisches Geologisches Landesamt, München.
13. **Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe.** 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. **43**:260-296.
14. **Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries, and N. R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:1609-1613.
15. **Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer, and N. R. Pace.** 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:9188-9193.
16. **Baron, D., V. Blüm, G. Czihak, G. Gottschalk, B. Hassenstein, C. Hauenschild, J. Haupt, G. Jacobs, O. L. Kümmel, O. L. Lange, H. Hanger, H. F. Linskens, W. Nachtigall, D. Neumann, G. Osche, W. Rathmayer, W. Rautenberg, K. Sander, P. Schopfer, P. Sitte, H. Walter, F. Weberling, W. Wieser, H. Ziegler, and V. Ziswiler.** 1992. Biologie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

17. **Battin, T. J., A. Wille, B. Sattler, and R. Psenner.** 2001. Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:799-807.
18. **Behrens, S., C. Ruhland, J. Inacio, H. Huber, A. Fonseca, I. Spencer-Martins, B. M. Fuchs, and R. Amann.** 2003. *In-situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya* to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1748-1758.
19. **Ben-Ari, E. T.** 1999. Not just slime. *Bioscience* **49**:689-695.
20. **Beveridge, T. J., G. Southam, M. H. Jeriche, and B. L. Blackford.** 1990. High-Resolution Topography of the S-Layer sheath of the Archaeobacterium *Methanospirillum hungatei* provided by scanning tunneling microscopy. *Journal of Bacteriology* **172**:6589-6595.
21. **Beveridge, T. J., G. Southam, M. H. Jericho, and B. L. Blackford.** 1990. High-Resolution Topography of the S-Layer Sheath of the Archaeobacterium *Methanospirillum hungatei* provided by scanning tunneling microscopy. *Journal of Bacteriology* **172**:6589-6595.
22. **Béjà, O., M. T. Suzuki, E. V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L. P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Carrigues, S. B. Jovanovich, R. A. Feldman, and E. F. DeLong.** 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* **2**:516-529.
23. **Bintrim, S. B., J. T. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts, and R. M. Goodman.** 1997. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:277-282.
24. **Bland, J. A. and J. T. Staley.** 1978. Observations on the biology of *Thiothrix*. *Arch. Microbiol.* **117**:79-87.
25. **Blöchl, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, and K. O. Stetter.** 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of *Archaea*, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**:14-21.
26. **Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte, and O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**:623-626.
27. **Bovallius, A.** 1979. Morphological and chemical characteristics of a *Cytophaga* sp. grown under conditions of magnesium excess and magnesium limitation. *J. Gen. Microbiol.* **113**:137-145.
28. **Bowmann, J. P., S. A. McCammon, J. A. E. Gibson, L. Robertson, and P. D. Nichols.** 2003. Prokaryotic metabolic activity and community structure in antarctic continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2448-2462.
29. **Bresinsky, A.** 1991. Flora und Vegetation der ältesten Schutzgebiete im Umkreis von Regensburg. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **50**:121-150.
30. **Bresinsky, A.** 1999. Die Verteidigung des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **60**:691-724.
31. **Bresinsky, A.** 2001. Das Schicksal des Sippenauer Moores nach Abschluss des Verfahrens vor dem Bayerischen Gerichtshof. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **62**:367-391.
32. **Briegel, A.** Strukturuntersuchungen an Prokaryonten mit Kryo-Elektronentomographie. 2004. Fakultät für Chemie, TU München.

33. **Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss.** 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch. Microbiol. **84**:54-68.
34. **Brosius, J., J. L. Palmer, J. P. Kennedy, and H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**:4801-4805.
35. **Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann.** 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1980-1989.
36. **Burggraf, S., G. J. Olsen, K. O. Stetter, and C. R. Woese.** 1992. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. System. Appl. Microbiol. **15**:352-356.
37. **Burggraf, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese, and K. O. Stetter.** 1994. Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. **60**:3112-3119.
38. **Burke, L. M. and D. A. Lashof.** 1990. Greenhouse gas emissions related to agriculture and land-use practices, p. 27-43. In B. A. Rosenberg, N. J. Kimball, L. H. Allen, G. H. Heichel, C. W. Stuber, D. E. Kissel, and S. Ernst (eds.), Impact of Carbon Dioxide, Trace Gases, and Climate Change on Global Agriculture. American Society of Agronomy, Madison.
39. **Casida Jr.(L.E.).** 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**:339-345.
40. **Cavicchioli, R., K. S. Siddiqui, D. Andrews, and K. R. Sowers.** 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. Curr. Opin. Biotechnol. **13**:253-261.
41. **Chang, W. T. H. and D. W. Thayer.** 1977. The cellulase system of a *Cytophaga* species. Can. J. Microbiol. **23**:1285-1292.
42. **Chet, I. and R. Mitchell.** 1976. Ecological aspects of microbial chemotactic behaviour. Ann. Rev. Microbiol. **30**:221-239.
43. **Chin, K.-J. and R. Conrad.** 1995. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. FEMS Microbiol. Ecol. **18**:85-102.
44. **Chin, K.-J., T. Lukow, and R. Conrad.** 1999. Effekt of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2341-2349.
45. **Chong, S. C., Y. Liu, M. Cummins, D. L. Valentine, and D. R. Boone.** 2002. *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization. Antonie van Leeuwenhoek **81**:263-270.
46. **Christensen, P. J.** 1977. The history biology, and taxonomy of the *Cytophaga* group. Can. J. Microbiol. **23**:1599-1653.
47. **Cicerone, R. J. and R. S. Oremland.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. Glob. Biochem. Cycles **2**:299-327.
48. **Cifuentes, A., J. Antón, S. Benloch, A. Donnelly, R. A. Herbert, and F. Rodriguez-Valera.** 2000. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. **66**:1715-1719.
49. **Clapp, L. W., J. M. Regan, F. Ali, J. D. Newman, J. K. Park, and D. R. Noguera.** 1999. Activity, structure, and stratification of membrane-attached methanotrophic biofilms cometabolically degrading trichloroethylene. Wat. Sci. Technol. **39**:153-161.

50. **Colwell and R.R.** 1997. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**:302-307.
51. **Conrad, R., F. Bak, and H. J. Seitz.** 1989. Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**:285-294.
52. **Corre, E., A. L. Reysenbach, and D. Prieur.** 2001. Epsilon-proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:329-335.
53. **Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
54. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.
55. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **284**:1318-1322.
56. **Cousin, M. A.** 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. *J. Food Protect.* **45**:172-207.
57. **Curtis, T. P. and Sloan W.T.** 2004. Prokaryotic diversity and its limits: Microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **7**:221-226.
58. **Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* **22**:434-444.
59. **De Kievit, T. R. and B. H. Iglewski.** 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**:4839-4849.
60. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**:1360-1363.
61. **DeLong, E. F.** 1992. *Archaea* in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5685-5689.
62. **DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prézelin, and R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of *archaea* in antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.
63. **DeLong, E. F., L. T. Taylor, T. L. Marsh, and C. M. Preston.** 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic *archaea* and *bacteria* by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5554-5563.
64. **DeLong, E. F. and N. R. Pace.** 2001. Environmental diversity of *bacteria* and *archaea*. *Syst. Biol.* **50**:470-478.
65. **DeLong, E. F.** 2003. Oceans of *archaea*. *ASM News* **69**:503-511.
66. **Donderski, W.** 1982. Studies on pectolytic *bacteria* in water and bottom sediments of two lakes of different trophy. *Acta Microbiol. Pol.* **31**:293-299.
67. **Doolittle, R. F.** 1997. Microbial genomes opened up. *Nature* **392**:339-342.
68. **Drawert, H. and I. Metzner-Kuster.** 1958. Fluoreszenz- und elektron-mikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*. *Arch. Microbiol.* **31**:422-434.

69. **Eder, W., W. Ludwig, and R. Huber.** 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Arch. Microbiol.* **172**:213-218.
70. **Engbrecht, J., K. H. Nealson, and M. Silverman.** 1983. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analyses of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**:773-781.
71. **Esteve, I., R. Guerrero, E. Montesinos, and C. Abellà.** 1983. Electron microscopy study of the interaction of epibiotic *bacteria* with *Chromatium minus* in natural habitats. *Microb. Ecol.* **57-64**.
72. **Fackrell, H. B. and J. Robinson.** 1973. Purification and characterization of a lytic peptidase produced by *Bdellovibrio bacteriovorus*. 6-5-S. *Canadian Journal of Microbiology* **19**:659-666.
73. **Ferguson, R. L., E. N. Buckley, and A. V. Palumbo.** 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:49-55.
74. **Ferry, J. G., G. H. Smith, and R. S. Wolfe.** 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic *bacteria* and characterization of *Methanospirillum hungatei* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**:465-469.
75. **Fink, L., T. Kinfe, W. Seeger, L. Ermert, W. Kummer, and R. M. Bohle.** 2000. Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am. J. Pathol.* **157**:1459-1466.
76. **Fink, L., S. Kohlhoff, M. M. Stein, J. Hänze, N. Weissmann, F. Rose, E. Akkayagil, F. Grimminger, W. Seeger, and R. M. Bohle.** 2002. cDNA array hybridisation after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am. J. Pathol.* **160**:81-90.
77. **Firtel, M.** 1994. The organization of the paracrystalline multilayered spacer-plugs of *Methanospirillum hungatei*. *Journal of Structural Biology* **112**:160-171.
78. **Fox, J. L.** 2003. Determined microbiologists bring culture to the "uncultured". *ASM News* **69**:370-371.
79. **Franzmann, P. D., E. Stackebrandt, K. Sanderson, J. K. Volkman, D. E. Cameron, P. L. Stevenson, T. A. McMeekin, and H. R. Burton.** 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *System. Appl. Microbiol.* **11**:20-27.
80. **Franzmann, P. D., N. Springer, W. Ludwig, E. Conway de Macario, and M. Rohde.** 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica. *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **15**:573-581.
81. **Franzmann, P. D., Y. Liu, D. L. Balkwill, H. C. Aldrich, E. Conway de Macario, and D. R. Boone.** 1997. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**:1068-1072.
82. **Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwipl, W. Ludwig, and R. Amann.** 1998. Flow cytometric analysis of the *in-situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4973-4982.
83. **Fuhrman, J. A., K. McCallum, and A. A. Davis.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148-149.
84. **Garcia, J. L.** 2005. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:297-308.
85. **Glöckner, F.-O., B. M. Fuchs, and R. Amann.** 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in-situ* hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3721-3726.
86. **Großkopf, R., S. Stubner, and W. Liesack.** 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.

87. **Guamis, B.** 1982. SDS-Page study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk. *Milchwissensch.* **42**:89-91.
88. **Guerrero, R., C. Pedros-Alio, I. Esteve, J. Mas, D. Chase, and L. Margulis.** 1986. Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in *bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2183-2142.
89. **Güde, H.** 1980. Occurrence of *Cytophagas* in sewage plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:756-763.
90. **Haddad, A., F. Camacho, P. Durant, and S. C. Cary.** 1995. Phylogenetic characterisation of the epibiotic *bacteria* associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1679-1687.
91. **Hausner, M. and S. Wuertz.** 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in-situ* Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3710-3713.
92. **Hazelbauer, G. L.** 1988. The bacterial chemosensory system. *Can. J. Microbiol.* **34**:466-474.
93. **Hershberger, K. L., S. M. Barns, A.-L. Reysenbach, S. C. Dawson, and N. R. Pace.** 1996. Wide diversity of *crenarchaeota*. *Nature* **384**:420.
94. **Hespell, R. B., R. A. Rosson, M. F. Thomashow, and S. C. Rittenberg.** 1973. Respiration of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109J and its energy substrates for intraperiplasmic growth. *J. Bacteriol.* **113**:1280-1288.
95. **Hinrichs, K. U., J. M. Hayes, S. P. Sylva, P. G. Brewer, and E. F. DeLong.** 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**:802-805.
96. **Hoeninger, L. F. M.** 1985. Microbial decomposition of cellulose in acidifying lakes of south-central Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:315-322.
97. **Huang, J. C. C. and M. P. Starr.** 1973. Possible enzymatic basis of bacteriolysis by *Bdellovibrios*. *Arch. Microbiol.* **89**:147-167.
98. **Huber, H., M. Thomm, H. König, G. Thies, and K. O. Stetter.** 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.* **132**:47-50.
99. **Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer, and K. O. Stetter.** 2002. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.
100. **Huber, H., M. J. Hohn, K. O. Stetter, and R. Rachel.** 2003. The phylum *Nanoarchaeota*: Present knowledge and future aspects of a unique form of life. *Research in Microbiology* **154**:165-171.
101. **Huber, J. A., D. A. Butterfield, and J. A. Baross.** 2002. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge subseafloor habitate. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1585-1594.
102. **Huber, J. A., D. A. Butterfield, and J. A. Baross.** 2003. Bacterial diversity in a subseafloor habitate following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:339-409.
103. **Huber, R., J. K. Kristjansson, and K. O. Stetter.** 1987. *Pyrobaculum* gen. nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **149**:95-101.
104. **Hutchinson, H. B. and J. Clayton.** 1919. On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga* nov. sp.). *J. Agricult. Sci.* **9**:143-173.

105. **Jahn, U., R. E. Summons, H. Sturt, E. Grsojean, and H. Huber.** 2005. Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I. Arch. Microbiol. **182**:404-413.
106. **Jannasch, H. W. and G. E. Jones.** 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. Limnol. Oceanogr. **4**:128-139.
107. **Jeang, C. L., Y. H. Lee, and W. T. H. Chang.** 1995. Purification and characterization of a raw-starch digesting amylase from a soil bacterium-*Cytophaga* sp. Biochem Mol Biol Int. **35**:549-557.
108. **Jurgens, G., K. Lindström, and A. Saano.** 1997. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. Appl. Environ. Microbiol. **63**:803-805.
109. **Jurgens, G., F.-O. Glöckner, R. Amann, A. Saano, L. Montonen, M. Likolammi, and U. Münster.** 2000. Identification of novel *Archaea* in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in-situ* hybridization. FEMS Microbiol. Ecol. **34**:45-56.
110. **Karner, B. M., E. F. DeLong, and D. M. Karl.** 2003. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature **409**:507-510.
111. **Kauri, T. and D. J. Kushner.** 1985. Role of contact in bacterial degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Ecol. **31**:301-306.
112. **Keil, D. P.** 1912. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. Beiträge z. Biol. d. Pflanzen **11**:335-365.
113. **Kim, H., D. Honda, S. Hanada, N. Kanamori, S. Shibata, T. Miyaki, K. Nakamura, and H. Oyaizu.** 2000. A deeply branched novel phylotype found in Japanese paddy soils. Microbiology **146**:2309-2315.
114. **Koch, M.** Verbreitung und molekulare Analysen von charakteristisch strukturierten mikrobiellen Lebensgemeinschaften. 2001. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
115. **Koshland, D. E. J.** 1974. The chemotactic response in *bacteria*, p. 133-160. In L. Jaenicke (ed.), Biochemistry of sensory functions. Springer-Verlag, Berlin.
116. **Koshland, D. E. J.** 1976. Bacterial chemotaxis as a simple model for a sensory system. Trends in Biochemical sciences **1**:1-3.
117. **Koshland, D. E. J.** 1980. Bacterial chemotaxis as a model behavioral system. Raven Press, New York.
118. **Koshland, D. E. J.** 1981. Biochemistry of sensing and adaption in a simple bacterial system. Annual Review of Biogeochemistry **50**:765-782.
119. **Kotler, R., D. A. Siegele, and A. Tormo.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. Ann. Rev. Microbiol. **47**:855-874.
120. **Kuske, C. R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, and P. J. Jackson.** 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2463-2472.
121. **Lackey, J. B., W. W. Lackey, and G. B. Morgan.** 1965. Taxonomy and ecology of the sulfur *bacteria*. Eng. Prog. Univ. Fla. Bull. Ser. **119**:3-23.
122. **LaMarre, A. G., S. C. Straley, and S. F. Conti.** 1997. Chemotaxis toward amino acid by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J. Bacteriol. **131**:201-207.

123. **Lambina, V. A., A. V. Afinogenova, S. R. Penabad, S. M. Konovalova, and A. P. Pushkareva.** 1982. *Micavibrio admirandus* gen. et sp. nov. *Microbiology* **51**:103-106.
124. **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
125. **Larkin, J. and W. R. Strohl.** 1983. *Beggiatoa*, *Thiothrix*, and *Thioploca*. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:341-367.
126. **Larkin, J. M.** 1980. Isolation of *Thiothrix* in pure culture and observation of a filamentous epiphyte on *Thiothrix*. *Curr. Microbiol.* **4**:155-158.
127. **Larkin, J. M. and D. L. Shinabarger.** 1983. Characterization of *Thiothrix nivea*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:841-846.
128. **Larkin, J. M. and R. Nelson.** 1987. Mechanism of attachment of swarm cells of *Thiothrix nivea*. *J. Bacteriol.* **169**:5877-5879.
129. **Lee, S. H. and J. A. Fuhrman.** 1991. Confinement effect on species composition of bacterioplankton studied at the level of community DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **79**:195-201.
130. **Liao, C. H. and J. M. Wells.** 1986. Properties of *Cytophaga johnsonae* strains causing spoilage of fresh produce at food markets. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:1261-1265.
131. **Lomans, B. P., R. Maas, R. Luderer, H. J. M. Op den Camp, A. Pol, C. Van der Drift, and G. D. Vogels.** 1999. Isolation and characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3641-3650.
132. **Ludwig, W.** 1995. Sequence databases (3.3.5), p. 1-22. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, and F. J. De Bruijn (eds.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nederlande.
133. **Ludwig, W. and O. Strunk.** 1997. ARB: A software environment for sequence data.
134. **Lueders, T. and M. Friedrich.** 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2732-2742.
135. **Lund, B. M.** 1969. Properties of some pectolytic, yellow pigmented, Gram-negative *bacteria* isolated from fresh cauliflowers. *J. Appl. Bacteriol.* **32**:60-67.
136. **Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. J. Parker, P. R. Saxman, J. M. Stredwick, G. M. Garrity, B. Li, G. J. Olsen, S. Pramanik, T. M. Schmidt, and J. M. Tiedje.** 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* **28**:173-174.
137. **Mamkaeva, K. A., A. V. Plyshch, N. N. Titova, and B. V. Gromov.** 1988. Dynamics of attack on cells of *Chlorella* in a culture infected by the parasitic bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Microbiology* **57**:116-119.
138. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
139. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and 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. *Microbiology Reading* **142**:1097-1106.

140. **Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston, and E. F. DeLong.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:50-56.
141. **Massana, R., L. T. Taylor, A. E. Murray, K. Y. Wu, W. H. Jeffrey, and E. F. DeLong.** 1998. Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic *archaea* in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. *Limnol. Oceanogr.* **43**:607-617.
142. **McGregor, B. J., D. P. Moser, E. W. Alm, K. H. Nealson, and D. A. Stahl.** 1997. *Crenarchaeota* in Lake Michigan Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1178-1181.
143. **McInerney, J. O., M. Mullarkey, M. E. Wernecke, and R. Powell.** 1997. Phylogenetic analysis of Group I marine archaeal rRNA sequences emphasizes the hidden diversity within the primary group Archaea. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**:1669.
144. **Merker, R. I. and J. Smit.** 1988. Characterization of the adhesive holdfast of marine and freshwater *Caulobacters*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2078-2085.
145. **Michaelis, W., A. Jenisch, and H. H. Richnow.** 1990. Hydrothermal petroleum generation in Red Sea sediments from the Kebrit and Shaban Deeps. *Applied Geochemistry* **5**:103-114.
146. **Michaelis, W., R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, V. Thiel, M. Blumenberg, K. Knittel, A. Gieseke, K. Peterknecht, T. Pape, A. Boetius, R. Amann, B. B. Jörgensen, F. Widdel, J. Peckmann, N. V. Pimenov, and M. B. Gulin.** 2002. Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* 1013-1015.
147. **Moisier, A. R.** 2005. Soil processes and global change. *Biol Fert Soils* **27**:221-229.
148. **Moissl, C., C. Rudolph, and R. Huber.** 2002. Natural communities of novel *archaea* and *bacteria* with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:933-937.
149. **Moissl, C.** Ökophysiologische Untersuchungen an Populationen neuartiger Mikroorganismen in sulfidhaltigen Quellen. 2000. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
150. **Moissl, C., C. Rudolph, R. Rachel, M. Koch, and R. Huber.** 2003. In situ growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology. *Arch. Microbiol.* **180**:211-217.
151. **Morita, R. Y.** 1975. Psychrophilic *bacteria*. *Bact. Rev.* **39**:144-167.
152. **Moyer, C. L., F. C. Dobbs, and D. M. Karl.** 1995. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1555-1562.
153. **Nauhaus, K., A. Boetius, M. Krüger, and F. Widdel.** 2002. In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ. Microbiol.* **4**:296-305.
154. **Näther, D. J. and R. Rachel.** 2004. The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem Soc Trans* **32**:199-203.

155. **Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 1999. Evidence for lateral gene transfer between *Archaea* and *Bacteria* from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**:323-329.
156. **Nercessian, O., A.-L. Reysenbach, D. Prieur, and C. Jeanthon.** 2003. Archaeal diversity associated with *in-situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise. *Environ. Microbiol.* **5**:492-502.
157. **Nercessian, O., Y. Fouquet, C. Pierre, and C. Jeanthon.** 2005. Diversity of *Bacteria* and *Archaea* associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic-Ridge. *Environ. Microbiol.* **7**:698-714.
158. **Neue, H. U., P. Becker-Heidmann, and H. W. Scharpenseel.** 1990. Organic matter dynamics, soil properties, and cultural practices in ricelands and their relationship to methane production, p. 457-466. In A. F. Bouwman (ed.), *Soils and the Greenhouse Effect*. John Wiley, New York.
159. **Neue, H. U.** 1993. Methane emissions from rice fields. *Bioscience* **43**:466-473.
160. **Nicol, G. W., L. A. Glover, and J. I. Prosser.** 2003. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* **5**:152-162.
161. **Nübel, U., M. M. Bateson, V. Vandieken, A. Wieland, M. Köhl, and D. M. Ward.** 2002. Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *Chloroflexaceae*-related *bacteria* in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4593-4603.
162. **O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm-formation as a microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
163. **Ollivier, B. M., R. A. Mah, J.-L. Garcia, and D. R. Boone.** 1986. Isolation and characterization of *Methanogenium bourgense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:297-301.
164. **Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, and D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:337-365.
165. **Ong, C. J., M. L. Wong, and J. Smit.** 1990. Attachment of the adhesive holdfast organelle to the cellular stalk of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **172**:1448-1456.
166. **Orphan, V. J., C. H. House, K.-U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong.** 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663-7668.
167. **Ouverney, C. C. and J. A. Fuhrman.** 2001. Marine planktonic *archaea* take up amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4829-4833.
168. **Ovreas, L., L. Forney, L. F. Daae, and V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.
169. **Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbiol. Ecol.* **9**:1-55.
170. **Pate, J. L. and E. J. Ordal.** 1967. The fine structure of *Chondrococcus columnaris* I. Structure and formation of mesosomes. *J. Cell Biol.* **35**:1-13.

171. **Pate, J. L. and E. J. Ordal.** 1976. The fine structure of *Chondrococcus columnaris* III. The surface layer of *Chondrococcus columnaris*. J. Cell Biol. **35**:37-51.
172. **Pate, J. L. and E. J. Ordal.** 1976. The fine structure of *Chondrococcus columnaris* III. The surface layer of *Chondrococcus columnaris*. J. Cell Biol. **35**:37-51.
173. **Patel, G. B. and G. D. Sprott.** 1990. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. (*Methanothiotrix concilii*) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**:79-82.
174. **Patel, G. B. and G. D. Sprott.** 1990. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. (*Methanothiotrix concilii*) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**:79-82.
175. **Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, R. Eberhard, B. H. Iglewski, and E. P. Greenberg.** 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**:197-201.
176. **Pernthaler, A., C. M. Preston, J. Pernthaler, E. F. DeLong, and R. Amann.** 2002. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. Appl. Environ. Microbiol. **68**:661-667.
177. **Pirhonen, M., D. Flego, R. Heikinheimo, and E. T. Palva.** 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. EMBO J. **12**:2467-2476.
178. **Poindexter, J. S.** 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. Bact. Rev. **28**:231-295.
179. **Porter, D., S. Y. Newell, and W. L. Lingle.** 1989. Tunneling bacteria in decaying leaves of a seagrass. Aquat. Bot. **35**:395-401.
180. **Pratt, L. A. and R. Kolter.** 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Current Opinion in Microbiology **2**:598-603.
181. **Preston, C. M., K. Y. Wu, T. F. Molinski, and E. F. DeLong.** 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:6241-6246.
182. **Purdy, K. J., D. B. Nedwell, and T. M. Embley.** 2003. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting antarctic sediments. Appl. Environ. Microbiol. **69**:3181-3191.
183. **Puskas, A., E. P. Greenberg, S. Kaplan, and A. L. Schaefer.** 1997. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **179**:7530-7537.
184. **Rabenhorst, L.** 1848. Die Algen Sachsens, resp. Mitteleuropas. Dec. 1-100 Algen Europas Dec.1-104. Exsikkate und Begleittext. 1848/1860, Dresden.
185. **Ramakrishnan, B. T., T. Lueders, P. F. Dunfield, R. Conrad, and M. W. Friedrich.** 2001. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. FEMS Microbiol. Ecol. **37**:175-186.
186. **Ravenschlag, K., K. Sahm, and R. Amann.** 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (svalbard). Appl. Environ. Microbiol. **67**:387-395.
187. **Reed, D. W., Y. Fujita, M. E. Delwiche, D. B. Blackwelder, P. P. Sheridan, T. Uchida, and F. S. Colwell.** 2002. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. Appl. Environ. Microbiol. **68**:3759-3770.

188. **Reichardt, W., B. Gunn, and R. R. Colwell.** 1983. Ecology and taxonomy of chitinolytic *Cytophaga* and related chitin-degrading *bacteria* isolated from an estuary. *Microb. Ecol.* **9:294.**
189. **Repaske, D. R. and J. Adler.** 1981. Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents. *J. Bacteriol.* **145:1196-1208.**
190. **Reysenbach, A.-L., K. Longnecker, and J. Kirshtein.** 2000. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in-situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:3798-3806.**
191. **Ridgway, H. F. and R. A. Lewin.** 1973. Goblet shaped sub-units from the wall of a marine gliding microbe. *J. Gen. Microbiol.* **79:119-128.**
192. **Ridgway, H. F., R. M. Wagner, W. T. Dawsey, and R. A. Lewin.** 1975. Fine structure of the cell envelope layers of *Flexibacter polymorphus*. *Can. J. Microbiol.* **21:1733-1750.**
193. **Rivière, J.** 1961. Activité cellulolytique des bactéries aérobies du sol. I. Isolement et purification. *Ann. Agron.* **12:385-398.**
194. **Rodina, A. G.** 1972. *Methods in aquatic microbiology.* University Park Press, Baltimore.
195. **Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive *bacteria* with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140:2849-2858.**
196. **Roszak, D. B. and R. R. Colwell.** 1987. Survival strategies of *bacteria* in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51:365-379.**
197. **Rudolph, C.** Weiterführende Untersuchungen zur Mikrobienpopulation der Schwefelquellen des Sippenauer Moors. 1998. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
198. **Rudolph, C., G. Wanner, and R. Huber.** 2001. Natural communities of novel *archaea* and *bacteria* growing in cold sulfidic springs with a "string of pearls"-like morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(5):2336-44.**
199. **Rudolph, C., C. Moissl, R. Henneberger, and R. Huber.** 2004. Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50:1-11.**
200. **Sarwar, G. and S. Matayoshi.** 1987. Purification of a κ -carrageenase from marine *Cytophaga* species. *Microbiol. Immunol.* **31:869-877.**
201. **Sasagawa, Y., Y. Kamio, Y. Matsubara, Y. Matsubara, K. Suzuki, H. Kojima, and K. Izaki.** 1993. Purification and properties of collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain. *Taiwan Biosci Biotechnol Biochem* **57:1894-1988.**
202. **Saunders, G. W., G. Kraft, I. H. Tan, and L. D. Druehl.** 1992. When is a family not a family. *Biosystems* **28:109-116.**
203. **Schink, B.** 1992. Syntrophism among Prokaryotes, p. 276-299. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes.* Springer-Verlag, New York, Berlin.
204. **Schleifer, K. H.** 2004. Microbial diversity: facts, problems, and prospects. *System. Appl. Microbiol.* **27:3-9.**

205. **Schleper, C., W. Holben, and H. P. Klenk.** 1997. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:321-323.
206. **Schleper, C., E. F. DeLong, C. M. Preston, R. A. Feldman, K. Y. Wu, and R. V. Swanson.** 1998. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**:5003-5009.
207. **Schoeffield, A. J., H. N. Williams, B. F. Turng, and W. A. J. Falker.** 1996. A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase *bdellovibrios* with reduced oxygen. *Microb. Ecol.* **32**:35-46.
208. **Schouten, S., E. C. Hopmans, R. D. Pancost, and J. S. S. Damsté.** 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14421-14426.
209. **Schrenk, M. O., D. S. Kelley, J. R. Delaney, and J. A. Baross.** 2003. Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3580-3592.
210. **Schütz, H., W. Seiler, and H. Rennenberg.** 1990. Soil and land use related sources and sinks of methane (CH₄) in the context of the global methane budget, p. 269-285. *In* A. F. Bouwman (ed.), *Soils and the Greenhouse Effect*. John Wiley.
211. **Shaw, P. J., G. J. Hills, J. A. Henwood, J. E. Harris, and D. B. Archer.** 1985. 3-dimensional architecture of the cell sheath and septa of *Methanospirillum hungatei*. *Journal of Bacteriology* **161**:750-757.
212. **SiJpesteijn, A. K. and G. Fahraeus.** 2005. Adaptation of *Sporocystophaga myxococcoides* to sugars. *J. Gen. Microbiol.* **3**:224-235.
213. **Simankova, M. V., S. N. Parshina, T. P. Tourova, T. V. Kolganova, A. J. Zehnder, and A. N. Nozhevnikova.** 2001. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *System. Appl. Microbiol.* **24**:362-367.
214. **Simon, H. M. and J. A. G. R. M. Dodsworth.** 2000. *Crenarchaeota* colonize terrestrial plant roots. *Environ. Microbiol.* **2**:495-505.
215. **Southam, G., M. Firtel, B. L. Blackford, M. H. Jericho, W. Xu, P. J. Mullhern, and T. J. Beveridge.** 1993. Transmission electron-microscopy, scanning tunneling microscopy, and atomic force microscopy of the cell envelope layers of the Archaeobacterium *Methanospirillum hungatei* Gp1. *J. Bacteriol.* **175**:1946-1955.
216. **Stahl, D. A. and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
217. **Stams, A. J. M.** 1994. Metabolic interactions between anaerobic *bacteria* in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **66**:271-294.
218. **Steffan, R. J., J. Goksoyr, A. K. Bej, and R. M. Atlas.** 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2908-2915.
219. **Stein, J.-L., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuya, and E. F. DeLong.** 1996. Characterization of uncultivated procaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* **178**:591-599.

220. **Steinkamp, R., W. Zimmer, and H. Papen.** 2001. Improved method for detection of methanotrophic *bacteria* in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* **42**:316-322.
221. **Stetter, K. O.** 1994. The lesson of Archaeobacteria, p. 143-151. *In* S. Bengtson (ed.), Nobel symposium No.84. Columbia University Press, New York.
222. **Stetter, K. O.** 1995. Microbial life in hyperthermal environments. *ASM News* **61**:285-290.
223. **Stetter, K. O.** 1996. Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp.* **202** :1-10.
224. **Stetter, K. O.** 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:149-158.
225. **Stetter, K. O.** 1999. Extremophiles and their adaption to hot environments. *FEBS Lett.* **452**:22-25.
226. **Stickler, D.** 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology* **2**:270-275.
227. **Stickler, D. J., N. S. Morris, and T. J. Williams.** 1996. An assessment of the ability of a silver-releasing device to prevent bacterial contamination in urethral catheder drainage systems. *Br J Urol.* **78**:579-588.
228. **Stolp, H. and M. P. Starr.** 1963. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **29**:217-248.
229. **Straley, S. C. and S. F. Conti.** 1977. Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward prey. *J. Bacteriol.* **132**:628-640.
230. **Strohl, W. R. and L. R. Tait.** 1978. *Cytophaga aquatilis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from the gills of freshwater fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**:293-303.
231. **Sutherland, I. W.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.
232. **Takai, I.** 1970. The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **16**:244.
233. **Takai, K. and K. Horikoshi.** 1999. Genetic diversity of *archaea* in deep-sea hydrothermal vent environments. *genetics* **152**:1285-1297.
234. **Teske, A., K. U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de Vera Gomez, D. Kysela, S. P. Sylva, M. L. Sogin, and H. W. Jannasch.** 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1994-2007.
235. **Thomas, T. and R. Cavicchioli .** 1998. Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett.* **439**:281-286.
236. **Thomashow, M. F. and S. C. Rittenberg.** 1978. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: attachment of longchain fatty acids to *Escherichia coli* peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* **135**:1015-1023.
237. **Torsvik, V., L. Ovreas, and T. F. Thingstad.** 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **296**:1064-1066.
238. **Tsai, Y.-L., C. J. Palmer, and L. R. Sangermano.** 1993. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:353-357.

239. **Tudor, J. J., M. McCann, and I. A. Acrich.** 1990. A new model for the penetration of prey cells by *bdellovibrios*. *J. Bacteriol.* **172**:2421-2426.
240. **Umbreit, T. H. and J. L. Pate.** 1978. Characterization of the holdfast region of wild-type cells and holdfast mutants of *Asticcacaulis biprostecum*. *Arch. Microbiol.* **118**:157-168.
241. **Valentine, D. L.** 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:271-280.
242. **Van der Maarel M.J.E.C., W. Sprenger, R. Haanstra, and L. J. Forney.** 1999. Detection of methanogenic *archaea* in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:189-194.
243. **Van der Maarel, M. J. E. C., R. R. E. Artz, R. Haanstra, and L. J. Forney.** 1998. Association of marine *archaea* with the digestive tracts of two marine fish species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2894-2898.
244. **van der Meulen, H. J. and W. Harder.** 1975. Production and characterization of the agarase of *Cytophagales flevensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**:431-447.
245. **van der Meulen, H. J. and W. Harder.** 1976. Characterization of the neoagarotetra-ase and neoagarobiase of *Cytophaga flevensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **42**:81-94.
246. **Vance, I., C. M. Topham, S. L. Blayden, and J. Tampion.** 1980. Extracellular cellulase production by *Sporocytophaga myxococcoides* NCIB 8639. *J. Gen. Microbiol.* **117**:235-241.
247. **Vanechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters.** 1992. Rapid identification of *bacteria* of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:227-234.
248. **Vetriani, C., A.-L. Reysenbach, and Doré J.** 1998. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:83-88.
249. **Vetriani, C., H. W. Jannasch, B. J. MacGregor, A. D. Stahl, and A.-L. Reysenbach.** 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic *archaea* in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4375-4384.
250. **Volokita, M., A. Abelovich, and M. I. Soares.** 2000. News and Notes: detection of microorganisms with overall cellulolytic activity. *Curr. Microbiol.* **40**:135-136.
251. **von Klein, D., H. Arab, H. Völker, and M. Thomm.** 2002. *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles* **6**:103-110.
252. **Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K. H. Schleifer.** 1994. Identification and *in-situ* detection of gram-negative filamentous *bacteria* in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **17**:405-417.
253. **Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K. H. Schleifer.** 1994. Development of an rRNA- targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in-situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:792-800.
254. **Wagner, M., M. Horn, and H. Daims.** 2003. Fluorescence *in-situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **6**:302-309.
255. **Wallhäuser, K. H. and H. Puchelt.** 1966. Sulfatreduzierende Bakterien in Schwefel- und Grubenwässern Deutschlands und Österreichs. *Contr. Miner. and Petrol.* **13**:12-30.

256. **Ward, D. M., R. Weller, and M. M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences revealed numerous uncultured inhabitants in a natural community. *Nature* **345**:63-65.
257. **Ward, D. M., M. J. Ferris, S. C. Nold, and M. M. Bateson.** 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1353-1370.
258. **Warneke, M.** Die Flora und Vegetation des Naturschutzgebietes "Sippenauer Moor" im Landkreis Kelheim. 1992. Diploma Thesis, University of Regensburg, Germany.
259. **Watanabe, K., K. Watanabe, Y. Kodama, K. Syutsubo, and S. Harayama.** 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4803-4809.
260. **Waters, E., M. J. Hohn, I. Ahel, D. E. Graham, M. D. Adams, M. Barnstead, K. Y. Beeson, L. Bibbs, R. Bolanos, M. Keller, K. Kretz, X. Lin, E. Mathur, J. Ni, M. Podar, T. Richardson, G. G. Sutton, M. Simon, D. Soll, K. O. Stetter, J. M. Short, and M. Noordewier.** 2003. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:12984-12988.
261. **Watnick, P. and R. Kolter.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**:586-595.
262. **Watnick, P. and R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**:2675-2679.
263. **Weber, K. H.** Erläuterungen zum Blatt Nr. 7137 Abensberg. Bayerisches Geologisches Landesamt. 1978. München, Bayerisches Geologisches Landesamt. Geologische Karte von Bayern 1:25000. Bayerisches Geologisches Landesamt.
264. **Weibull, C.** 1960. Movement *In* I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (eds.), *The bacteria*. New York Academic Press.
265. **Weller, R. and 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.
266. **Whitford, M. F., R. M. Teather, and R. J. Forster.** 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from bovine rumen. *BMC Microbiol.* **1**:1471-2180.
267. **Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:661-671.
268. **Winogradsky, S.** Heft I: Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. 1888. Leipzig, Verlag von Arthur Felix. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien.
269. **Winogradsky, S. N.** 1929. Études sur la microbiologie du sol. Sur la dégradation de la cellulose dans de sol. *Ann. Inst. Pasteur* **43**:549-633.
270. **Woese, C. R. and G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5088-5090.
271. **Woese, C. R., O. Kandler, and 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.
272. **Woese, C. R., L. Achenbach, P. Rouviere, and L. Mandelco.** 1991. Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *System. Appl. Microbiol.* **14**:364-371.

273. **Zarnkow, U.** Analyse zur Mikrobenpopulation der Schwefelquellen des Sippenauer Moors. 1998. Universität Regensburg - Lehrstuhl für Mikrobiologie.
274. **Zeikus, J. G. and V. G. Bowen** . 1975. Fine-Structure of *Methanospirillum hungatei*. Journal of Bacteriology **121**:373-380.
275. **Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi, and N. Arnheim.** 1992. Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:5847-5851.
276. **Zillig, W., K. O. Stetter, D. Prangishvilli, W. Schäfer, S. Wunderl, D. Janekovic, I. Holz, and P. Palm.** 1982. *Desulfurococcaceae*, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring *Thermoproteales*. Zbl. Bakt. Hyg. **I. Abt. Orig.C 3**:304-317.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

...**Herrn Prof. Dr. Robert Huber**, für die Möglichkeit an diesem äußerst interessanten Thema zu arbeiten. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen wissenschaftlichen Anregungen, sein Vertrauen und seine Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ideen waren eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit. Sein großes Interesse an der Arbeit, sein offenes Ohr in allen Situationen und die gemeinsame Begeisterung auf der „Jagd“ nach kälteliebenden Archaeen waren stets eine große Motivation.

...**den Herren Prof. Dr. K.O. Stetter** und **Prof. Dr. M. Thomm**, für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl, für die Anregungen, Diskussionen und Gespräche.

...**dem Elektronenmikroskopie-Team** des Lehrstuhls, für die Möglichkeit am Elektronenmikroskop zu arbeiten, für die Gefrierätzungen, Bedampfungen und Einweisungen. Vielen Dank an **PD Dr. R. Rachel**, **Dipl.-Biol. Daniela Näther** und **Anna Scherzinger** für das Erstellen von fantastischen EM-Fotos und der Datenanalyse.

...**Herrn Dr. H. Besl** für die Hilfe bei der Bestimmung der Alge.

...**den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Robert Huber** für das wunderschöne Arbeitsklima und die Unterstützung während der Arbeit. **Christine Moissl** und **Christian Rudolph** für die perfekte Einführung in das Thema, die vielen interessanten und produktiven wissenschaftlichen Diskussionen. Für die Einführung in das ARB-Programm, für die vielen gemeinsamen Moorfahrten auch bei widrigsten Wetterbedingungen, für die professionelle Zusammenarbeit und die vielen gemütlichen Stunden auch außerhalb der Universität. **Marietta Bock** für die Weitergabe von vielen nützlichen Tipps und Tricks, die Gespräche und ihre Hilfe in allen Labor- und Lebenslagen. Unserem „Porto-Bayer“ **André Antunes** für die Verbesserung meines „German-Englisch“, für sein fröhliches Temperament, den Spaß den wir miteinander hatten und die vielen salzigen und anderen wissenschaftlichen Gesprächen. **Ruth Henneberger** und **Steffen Kraus** für die schöne Zeit miteinander und den vielen wissenschaftlichen Gespräche. **Thomas Amann** für die erfolgreiche und unkomplizierte Zusammenarbeit am kalten Methanogenen SipMet 1. Meiner „Quasi-Nachbarin“ **Maria Sonnleitner** für die schöne wissenschaftliche Zusammenarbeit und die vielen durchgefeierten Nächte.

...**Herrn Dr. H. Huber** für die freundliche Aufnahme in sein Team, seine wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und seine unermüdliche Hilfe bei kleinen und großen Problemen mit dem ARB-Rechner.

... **meinen neuen Labormitgliedern**. Meiner „Labor-Ehefrau“ **Ulrike Jahn** für ihre unermüdliche Hilfe in allen Lebenslagen, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und natürlich den vielen schönen Stunden auf gemeinsamen Feiern. **Walter Paper** für seine Unterstützung jeglicher Art, den vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit im Labor. **Michael Schnitzbauer** für die vielen computertechnischen Tipps und Tricks und die schöne Zusammenarbeit.

... **Gabi Gmeinwieser** für ihre immer fröhliche Art, ihre Hilfe in allen Lebenslagen und die Unterstützung bei diesem oder jenem Problem.

...unserer Sekretärin **Elisabeth Nagelfeld** für ihre aufmunternden Gespräche und Unterstützung während meiner Arbeit.

...**allen ehemaligen Praktikantinnen und Praktikanten** für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit. **Chris Steube** für seine Unterstützung bei einigen Aspekten meiner Arbeit und die wissenschaftlichen Gespräche über kalte Archaeen.

...**allen Korrekturlesern dieser Arbeit** für die Ausdauer beim Ausmerzen von Fehlern jeglicher Art.

...**allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls** für ihre (wissenschaftliche) Unterstützung, die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl und die vielen gemeinsamen Feiern.

...**meinen Eltern Maria** und **Martin Koch** für ihre finanzielle, geistige und aufmunternde Unterstützung während aller Höhen und Tiefen meiner Arbeit.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benützt habe.

Regensburg, Juli 2005