

**Physiologische, chemotaxonomische und  
molekularbiologische Eigenschaften mariner  
Partikel-assoziiierter Bakterien aus dem Atlantik**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Biologie / Chemie  
der Universität Bremen  
vorgelegt von

**Anja Heuchert**

Bremen, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Blotevogel

Tag des Promotionskolloquiums: 15.07.04

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. U. Fischer für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während meiner Zeit als Doktorandin und bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. K.-H. Blotevogel für seine Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Ebenso danke ich allen anderen Mitgliedern des Prüfungsausschusses für ihre Teilnahmebereitschaft.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marine Mikrobiologie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt hier den drei Ex-Bürokolleginnen sowie Imke Berkenheger und Dr. Bianca Sinn für die anregenden Diskussionen und die aufbauenden Worte, wenn es mal nicht so lief. Birgit Lübben gilt zudem mein Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft bei praktischen Fragen. Petra Herzog, Magareta Porada, Annina Hube sowie Yvonne Köhler danke ich für die immer zuverlässig durchgeführten Labortätigkeiten.

Großer Dank gilt Dr. Birgit Heyduck-Söller, die mir die HPLC-Methode näher brachte, mir mit Rat und Tat jederzeit zur Seite stand und eine kritische Korrekturleserin war. Mit Ihr würde ich immer und überall wieder gern zusammenarbeiten. Ihrem Mann Dr. Rainer Söller danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der UPGMA-Phenogramme.

Anke Toltz (AG Prof. Heyser) danke ich für die Unterstützung bei der TEM, Daniela Hanke (AG Prof. Montforts) für ihre Hilfe bei der Chromatographie und Dr. Thomas Dülcks (AG Prof. Leibfritz) gilt mein Dank für seine Hilfe bei der Auswertung der MS-Spektren sowie seine scheinbar grenzenlose Geduld.

Spezieller Dank gilt allen Teilnehmern der durchgeführten Forschungsfahrten mit FS Polarstern und FS Meteor.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Ein besonderer Dank geht an Götz, der zwar nicht immer zur Stelle war, wenn ich ihn brauchte, aber auch aus der Ferne immer die passenden aufbauenden Worte schickte.

Die Erstellung der vorliegenden Arbeit wurde dankenswerterweise zum Teil durch die DFG im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 261 – Der Südatlantik im Spätquartär: Rekonstruktion von Stoffhaushalt und Stromsystemen – gefördert.

---

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	i
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Heterotrophe Bakterien im marinen Nahrungsnetz.....	1
1.2 Marine organische Partikel.....	3
1.3 Identifizierung und Charakterisierung von unbekanntem Bakterien .....	7
1.4 Ziel der Arbeit .....	8
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
<b>Teil A: Isolierung von Reinkulturen aus der Antarktis und deren Charakterisierung.....</b>	<b>10</b>
2.1 Herkunft des Probenmaterials.....	10
2.2 Bearbeitung des Probenmaterials an Bord des FS POLARSTERN .....	11
2.3 Zusammensetzung des Nährmediums .....	11
2.4 Isolation und Kultivierungsbedingungen.....	13
2.4.1 Isolierung der Bakterien .....	13
2.4.2 Hälterung der Reinkulturen .....	13
2.4.3 Anzucht von Vorkulturen .....	13
2.4.4 Anzucht der Versuchskulturen .....	14
2.4.4.1 Flüssigmedium .....	14
2.4.4.2 Festes Nährmedium.....	14
2.5 Morphologische Untersuchungen .....	15
2.5.1 Untersuchung zur Beweglichkeit.....	15
2.5.1.1 Schwärmagar .....	15
2.5.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie .....	15
2.5.2 Bestimmung der Zellgrößen .....	16
2.5.3 Gram-Färbung .....	16
2.5.3.1 KOH-Test.....	17
2.6 Physiologische Untersuchungen.....	17
2.6.1 Temperaturoptimum .....	17
2.6.2 pH-Wert-Optimum .....	18
2.6.3 Salinitäts-Optimum.....	19
2.6.4 Kohlenstoffverwertung.....	19
2.6.4.1 Kohlenstoffquellen .....	19
2.6.4.2 BIOLOG-System.....	20
2.6.4.3 API 50 CH-System.....	21
2.6.4.4 Distanzverfahren .....	22

---

---

2.6.5	Enzymtests.....	22
2.6.5.1	Katalase.....	22
2.6.5.2	Oxidase.....	23
2.6.5.3	Cellulase.....	23
2.6.5.4	Gelatine-Hydrolyse.....	23
2.6.5.5	Amylase.....	23
<b>2.7</b>	<b>Chemotaxonomie.....</b>	<b>24</b>
2.7.1	Pigmentbestimmung bei Isolat 88/2-1.....	24
2.7.1.1	Extraktion von Carotinoiden (modifiziert nach PORADA, 2000).....	24
2.7.1.2	Photometrische Pigmentbestimmung.....	25
2.7.1.3	Carotinoidbestimmung mittels Reversed Phase HPLC.....	25
2.7.2	Bestimmung der zellulären Fettsäuren.....	26
2.7.2.1	Probenaufbereitung.....	26
2.7.2.2	Herstellung der Fettsäuremethylester und deren Bestimmung mittels GC.....	27
2.7.2.3	Nomenklatur der Fettsäuren.....	28
2.7.2.4	Distanzverfahren.....	28
<b>2.8</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen.....</b>	<b>29</b>
2.8.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	30
2.8.2	Bestimmung des Guanin + Cytosin (G+C)-Gehaltes der DNA.....	31
2.8.2.1	Extraktion der genomischen DNA.....	31
2.8.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
2.8.2.3	Thermische Denaturierung der DNA (Bestimmung des $T_m$ ).....	33
2.8.2.4	Bestimmung des G+C-Gehaltes mittels HPLC.....	34
2.8.2.4.1	Abbau der DNA.....	34
2.8.2.4.2	HPLC-Messung.....	34
2.8.3	Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).....	35
2.8.3.1	Amplifikation der 16S rRNA.....	35
2.8.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.8.3.3	DNA-Restriktion.....	36
2.8.4	Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR).....	37
2.8.4.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.8.4.2	Distanzverfahren.....	38
2.8.5	16S rRNA-Sequenzierung.....	39
2.8.5.1	16S rRNA-PCR.....	39
2.8.5.2	DNA-Elution aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen).....	39
2.8.5.3	Entsalzung der DNA.....	40
2.8.5.4	Teilsequenzierung der 16S rRNA.....	40
2.8.5.5	Vollständige 16S rRNA-Sequenzierung von Isolat 88/2-4 und Isolat 88/2-7.....	40

---

---

2.8.6	Phylogenie .....	41
2.8.6.1	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) .....	41
2.8.6.2	ARB .....	41
2.8.7	DNA-DNA-Hybridisierung .....	41
2.8.7.1	Probenaufbereitung .....	42
2.8.7.2	Hybridisierung .....	42
<b>2.9</b>	<b>Flockenbildung von Isolat 88/2-7 .....</b>	<b>42</b>
2.9.1	Einfluss von Pepton auf die Flockenbildung .....	43
2.9.2	Größenbestimmung der Flocken .....	43
2.9.3	Einfluss von Calciumchlorid auf die Flockenbildung .....	43
2.9.4	Einfluss von EDTA auf die Flocken .....	44
2.9.5	Einfluss von Natriumhydroxid auf die Flocken .....	44
<b>Teil B: Isolation von Reinkulturen aus dem äquatorialen Atlantik und deren Charakterisierung ..</b>		<b>46</b>
<b>2.10</b>	<b>Herkunft des Probenmaterials .....</b>	<b>46</b>
<b>2.11</b>	<b>Bearbeitung des Probenmaterials an Bord des FS METEOR .....</b>	<b>46</b>
<b>2.12</b>	<b>Isolation und Kultivierungsbedingungen .....</b>	<b>47</b>
<b>2.13</b>	<b>Morphologische Untersuchungen .....</b>	<b>48</b>
2.13.1	Reinheitskontrolle, Kolonie- und Zellmorphologie .....	48
<b>2.14</b>	<b>Enzymtests .....</b>	<b>48</b>
<b>2.15</b>	<b>Chemotaxonomie .....</b>	<b>49</b>
2.15.1	Pigmentbestimmung .....	49
2.15.1.1	Photometrische Pigmentbestimmung .....	49
2.15.1.2	Reversed Phase HPLC .....	49
2.15.1.2.1	Modifiziert nach RABENSTEIN (1997) .....	49
2.15.1.2.2	Modifiziert nach STEPNOWSKI und BLOTEVOGEL (pers. Mitteilung) .....	50
2.15.1.3	Gewinnung und Aufreinigung der Pigmente für die Massenspektrometrie .....	50
2.15.1.3.1	Methanolextraktion der Pigmente .....	50
2.15.1.3.2	Dünnschichtchromatographie .....	51
2.15.1.3.3	Säulenchromatographie .....	52
2.15.1.3.4	Massenspektrometrie .....	52
<b>2.16</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>54</b>
2.16.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	54
2.16.2	Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA mittels thermischer Denaturierung ( $T_m$ -Bestimmung) .....	55
2.16.3	16S rRNA-Sequenzierung .....	55
<b>2.17</b>	<b>Herkunft der Chemikalien .....</b>	<b>55</b>

---

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
	<b>Teil A: Isolate aus dem Südatlantik (Antarktis)</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>ARDRA</b> .....	<b>56</b>
3.1.1	Einteilung in ARDRA-Gruppen .....	59
<b>3.2</b>	<b>Analyse der RAPD-PCR</b> .....	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung</b> .....	<b>61</b>
<b>3.4</b>	<b>Morphologie</b> .....	<b>62</b>
<b>3.5</b>	<b>Physiologie</b> .....	<b>67</b>
3.5.1	Temperaturoptimum, pH-Wert und NaCl-Konzentration .....	67
3.5.2	Enzyme .....	69
3.5.3	Kohlenstoffverwertung .....	70
3.5.3.1	Kohlenstoffquellen in ASN <sub>III</sub> -Medium .....	70
3.5.3.2	Auswertung des BIOLOG GN-Systems .....	74
3.5.3.3	Auswertung des API 50 CH-Systems .....	79
<b>3.6</b>	<b>Chemotaxonomie</b> .....	<b>83</b>
3.6.1	Zelluläre Fettsäuremuster .....	83
3.6.2	Pigmentbildung bei Isolat 88/2-1 .....	93
3.6.2.1	Spektrophotometrische Pigmentbestimmung .....	93
3.6.2.2	Reversed Phase HPLC .....	94
<b>3.7</b>	<b>Molekularbiologie</b> .....	<b>94</b>
3.7.1	G+C-Gehalt der DNA und 16S rRNA-Sequenz .....	94
3.7.2	ARB .....	98
3.7.3	DNA-DNA-Hybridisierung .....	99
<b>3.8</b>	<b>Flockenbildung von Isolat 88/2-7</b> .....	<b>100</b>
3.8.1	Flockenbildung in ASN <sub>III</sub> -Medium mit 0,1% Hefeextrakt .....	100
3.8.2	Flockenbildung in ASN <sub>III</sub> -Medium mit 1% Pepton .....	103
3.8.3	Ursache der Flockenbildung .....	103
3.8.3.1	Flockenbildung bei verschiedenen Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen .....	103
3.8.3.2	Wirkung von EDTA auf die Flocken .....	104
3.8.3.3	Wirkung von NaOH auf die Flocken .....	105
	<b>Teil B: Isolation von Reinkulturen aus dem äquatorialen Atlantik und deren Charakterisierung</b> .	<b>106</b>
<b>3.9</b>	<b>Morphologische Eigenschaften, Untersuchungen zur Enzymaktivität sowie Eingruppierung der Isolate mittels FISH</b> .....	<b>106</b>
3.9.1	Morphologie .....	106
3.9.2	Enzymtests .....	110
3.9.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	110
<b>3.10</b>	<b>Carotinoidbestimmung</b> .....	<b>111</b>

---

---

3.10.1	Spektrophotometrische Pigmentbestimmung .....	112
3.10.2	Reversed Phase HPLC .....	113
3.10.3	Massenspektrometrie .....	114
<b>3.11</b>	<b>G+C-Gehalt der DNA und 16S rRNA-Sequenz .....</b>	<b>118</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>120</b>
<b>4.1</b>	<b>Physiologische Eigenschaften – Anpassung der Antarktisisolate an ihr Habitat.....</b>	<b>120</b>
4.1.1	Temperatur .....	120
4.1.1.1	Flockenbildung.....	121
4.1.2	Salinität.....	123
4.1.3	Verwertung verschiedener C-Quellen – Kohlenstoffquellen im ASN <sub>III</sub> -Medium („konventionell“) im Vergleich mit dem BIOLOG GN- und dem API-System.....	125
4.1.4	Mischkulturen im BIOLOG GN-Testsystem.....	129
<b>4.2</b>	<b>Biochemie.....</b>	<b>130</b>
4.2.1	Fettsäuremuster.....	130
4.2.2	Carotinoide .....	134
<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Charakterisierung .....</b>	<b>137</b>
4.3.1	Taxonomische Einordnung der Isolate .....	140
4.3.1.1	$\alpha$ -Proteobakterien.....	141
4.3.1.2	$\gamma$ -Proteobakterien.....	144
4.3.1.3	<i>Cytophaga-Flavobacteria</i> .....	147
4.3.1.4	Gram-positive Bakterien .....	147
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>149</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>153</b>
<b>6.1</b>	<b>Geographische Lage der Probennahmestellen während ANT XV/4 und M49/4 .....</b>	<b>153</b>
<b>6.2</b>	<b>Wachstumskurven der Antarktisisolate zur Ermittlung der optimalen Temperatur, NaCl-Konzentration und des pH-Wertes.....</b>	<b>154</b>
6.2.1	Temperatur .....	154
6.2.2	NaCl-Konzentration .....	156
6.2.3	pH-Wert.....	158
<b>6.3</b>	<b>Distanzmatrizen berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP .....</b>	<b>160</b>
<b>6.4</b>	<b>16S rRNA-Sequenzen der Antarktisisolate.....</b>	<b>163</b>
<b>6.5</b>	<b>Charakterisierung der Isolate aus dem äquatorialen Atlantik.....</b>	<b>169</b>
<b>6.6</b>	<b>16S rRNA-Sequenzen der Isolate 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe von Station 7004-1 .....</b>	<b>182</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>183</b>

---

---

<b>8</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>199</b>
	1. Heterotrophic particle-associated bacteria from the South Atlantic: a community of marine micro-organisms with a high organic carbon degradation potential .....	200
	2. <i>Psychrobacter nivimaris</i> sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica) .....	216

---

---

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Absorption
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis
ASN <sub>III</sub>	künstliches Seewasser-Medium
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CF	<i>Cytophaga-Flavobacteria</i>
CTD	conductivity/temperature/depth (Leitfähigkeit-Temperatur-Tiefe)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCI	direkte chemische Ionisation
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DOM	dissolved organic matter (gelöstes organisches Material)
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPS	extracellular polymeric substances (extrazelluläre polymere Substanzen)
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
FAB	Fast-Atom-Bombardment
FAME	fatty acid methylester (Fettsäuremethylester)
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FS	Forschungsschiff
g	Erdbeschleunigung
G+C	Guanin und Cytosin
GC	Gaschromatograph
HGC	high G+C-content (hoher G+C-Gehalt)
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HMW	high molecular weight (hohes Molekulargewicht)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobasen
LGC	low G+C-content (niedriger G+C-Gehalt)
LMW	low molecular weight (niedriges Molekulargewicht)
m	“Milli” (Vorsilbe in Kombination mit weiteren Einheiten)
max.	maximal
μ	“Mikro” (Vorsilbe in Kombination mit weiteren Einheiten)

---

M	molar; ausgenommen Massenspektrometrie: M = Masse
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-MS
m/z	Masse/Ladungs-Quotient
n	„Nano“ (Vorsilbe in Kombination mit weiteren Einheiten)
N	normal
nt	Nucleotid
O. D.	Optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Psychrobacter</i>
p. a.	zur Analyse
PAUP	phylogenetic analysis using parsimony (auf Ähnlichkeiten beruhende Verwandtschaftsanalyse)
<i>Pb.</i>	<i>Polaribacter</i>
<i>Pc.</i>	<i>Paracoccus</i>
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
POM	particular organic matter (partikuläres organisches Material)
ppm	parts per million
<i>Ps.</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
PUFA	polyunsaturated fatty acids (vielfach ungesättigte Fettsäure)
RAPD	random amplified polymorphic DNA (zufällig amplifizierte polymorphe DNA)
rDNA	ribosomal desoxyribonucleic acid (ribosomale Desoxyribonucleinsäure)
Rf-Wert	retention value factor
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonucleinsäure)
RT	Raumtemperatur (wenn nicht anders angegeben $22 \pm 1$ °C)
SSC	standard saline citrate
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEP	transparente exopolymere Partikel
$T_m$	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween-20	Polyethylenglykol-sorbitan-monolaurat
U	Unit ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPGMA	unweighted pair-group method of arithmetic averages (Ungewichtete Methode zur Gruppenbildung unter Verwendung von Distanz-Mittelwerten)
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

---

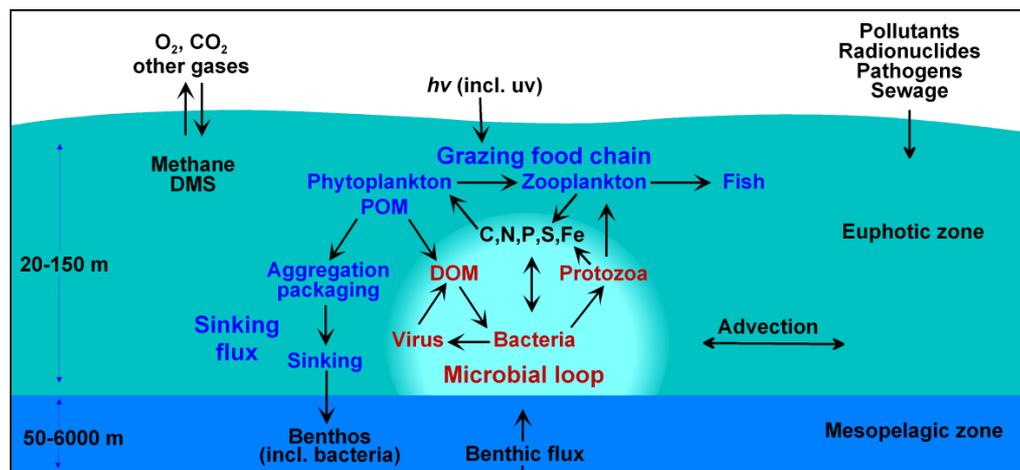
# 1 EINLEITUNG

Ozeane und Meere bedecken nahezu drei Viertel der Erdoberfläche (70,8%), weshalb die Erde häufig auch als „blauer Planet“ bezeichnet wird. Mit einem Anteil von 95% des gesamten Wassers der Erde stellen sie deren größtes Wasserreservoir dar und sind der bei weitem größte zusammenhängende Lebensraum der Biosphäre (OTT, 1988). Die offenen Ozeane sind von insgesamt  $1,2 \times 10^{29}$  prokaryontischen Zellen besiedelt, die in den oberen 200 m in einer mittleren Konzentration von etwa  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml und in Tiefen  $>200$  m mit einer mittleren Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml vorkommen (WHITMAN et al., 1998). Die produktive Schicht der Ozeane, die euphotische Zone, ist im Vergleich zur großen Tiefe (im Mittel 3.800 m) relativ dünn. Selbst in klarem, subtropischem Ozeanwasser reicht sie lediglich bis etwa 150 m Tiefe. Sonst finden in der Wassersäule nur heterotrophe Prozesse statt (OTT, 1988), die zur Deckung des Energie- und Nährstoffbedarfes organische Substanzen benötigen. Diese liegen im Ozean als gelöstes (dissolved organic matter, DOM) und als partikuläres Material (particulate organic matter, POM) vor. Die Definition von POM und DOM sagt nichts über den chemischen und biologischen Ursprung oder ihre ökologische Funktion aus (MÜNSTER und CHRÓST, 1990). Beide sind in Ursprung und Zusammensetzung sehr mannigfaltig und stehen untereinander und mit den Organismen in einer dynamischen Wechselbeziehung (OTT, 1988). Die Unterscheidung basiert auf ihrer Trennung durch Filtration, wobei die Porengröße der Filter jedoch zwischen  $0,2 \mu\text{m}$  (MÜNSTER und CHRÓST, 1990) und  $0,7 \mu\text{m}$  (LEE et al., 1995) variiert. Das zurückgehaltene organische Material wird als POM bezeichnet.

## 1.1 Heterotrophe Bakterien im marinen Nahrungsnetz

In den Ozeanen und anderen aquatischen Habitaten stellen vor allem heterotrophe Bakterien eine essentielle Komponente der Nahrungsketten und Elementkreisläufe dar (KIRCHMAN, 2000), was aber erst spät erkannt wurde. Zunächst wurde nur dem „net phytoplankton“, also Zellen, die mit Hilfe des feinmaschigsten Planktonnetzes gefangen werden können (vor allem Diatomeen und Dinoflagellaten), als einzige mikrobielle Komponente des pelagischen Nahrungsnetzes Aufmerksamkeit geschenkt und heterotrophe Bakterien lediglich als Nahrungsquelle für das Benthos angesehen (SHERR und SHERR, 2000). Außerdem wurden Metazoen als die Organismen angesehen, die den Verbrauch von organischem Material dominieren, deren metabolischer Abfall ( $\text{NH}_4^+$ , Harnstoff,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_2$ ) der Hauptmechanismus zur Regeneration der Nährstoffe ist und

deren Fäzes das dominierende Transportmittel für organisches Material darstellt (AZAM et al., 1995). Erst Anfang der 70er Jahre wurden diese Theorien widerlegt und u. a. totes organisches Material, das sowohl in gelöster als auch in partikulärer Form hauptsächlich von heterotrophen Mikroorganismen konsumiert wird, als wichtige Nahrungsquelle der marinen Nahrungsnetze erkannt (SHERR und SHERR, 2000). Später wurde herausgefunden, dass Planktonorganismen  $<30 \mu\text{m}$  für nahezu die gesamte respiratorische Aktivität verantwortlich sind und dass Bakterien aufgrund ihrer großen Oberfläche, die sie häufiger auf gelöste Substanzen treffen und mit ihnen interagieren lässt (SHERR und SHERR, 2000), eine wichtige Rolle im Energie- und Materialfluss in den Ozeanen einnehmen (WILLIAMS, 1981). Auf diesen Erkenntnissen basiert das Konzept der „Microbial loop“ (AZAM et al., 1983), die in den komplexen Nahrungsketten eine zentrale Rolle einnimmt (s. Abb. 1.1). Durch Aufnahme und Metabolismus des DOM sorgen Bakterien für dessen Erhalt, das dem trophischen System durch Exkretion, Absonderung und Diffusion sonst verloren gehen würde (AZAM et al., 1983). Die „Microbial loop“ ist somit für die Regeneration von Nährstoffen und dem Transfer von Energie und Kohlenstoff verantwortlich (MEYER, 2000).



**Abb. 1.1:** Pelagisches Nahrungsnetz mit der „Microbial loop“. DOM, gelöstes organisches Material; POM, partikuläres organisches Material; DMS, Dimethylsulfid (nach AZAM, 1998)

DOM ist für heterotrophe Bakterien sehr wichtig, da diese nur gelöste Substanzen aufnehmen können. Zu einem großen Teil besteht DOM aus vom Phytoplankton abgegebenen photosynthetischen Produkten, u. a. Kohlenhydraten, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen und organischen Säuren wie Glycolat (HELLEBUST, 1965), die sowohl zu den „low-molecular-weight“- (LMW,  $<1.000 \text{ Da}$ ) als auch „high-molecular-weight“-Substanzen (HMW) gehören (HELLEBUST, 1965; CHRÓST und FAUST, 1980; ITURRIAGA, 1981). Die Abgabe des DOM geschieht neben aktiver Exkretion und passivem Verlust (leakage) von alternden Zellen auch durch Zerstörung von Zellen durch Herbivoren- und Bakterivorenfraß oder Zellyse durch Viren (LAMPERT, 1978, FUHR-

---

MAN, 2000; STROM, 2000). Protozoen und Zooplankton geben aufgenommenes organisches Material durch Sekretion oder über den Fäzes als DOM ab (LAMPERT, 1978; STROM et al., 1997; FERRIER-PAGÈS et al., 1998). Allerdings ist nur ein geringer Teil des DOM (0,5-5%) durch Bakterien direkt aufnehmbar (MÜNSTER und CHRÓST, 1990). Nur LMW-DOM, wie Aminosäuren oder Monosaccharide, wird erkannt und mit Hilfe bakterieller Permeasen durch die Zellmembran transportiert (DUCKLOW, 2000). Marine Bakterien sind allerdings in der Lage, verschiedene extrazelluläre Enzyme zu bilden, die zur Hydrolyse von Polymeren genutzt werden (DEL GIORGIO und COLE, 2000). Der wechselnden Verfügbarkeit von Nährstoffen können Bakterien ihre Aktivität schnell anpassen, weshalb sie eher auf die Zusammensetzung als auf die Menge des ihnen zur Verfügung stehenden organischen Materials angewiesen sind (MÜNSTER und CHRÓST, 1990).

## 1.2 Marine organische Partikel

Während der Sedimentation kann POM von Tieren aufgenommen oder von Bakterien hydrolysiert werden. Die bakterielle Umwandlung von POM in DOM bringt den Kohlenstoff von einem sinkenden in einen nicht sinkenden Pool, wodurch er im Oberflächenwasser verbleibt und dort recycelt werden kann (AZAM et al., 1995). Als POM wurden lange Zeit nur Partikel mit einem Durchmesser größer als 0,5 mm (SHANKS und TRENT, 1979; ALLDREDGE et al., 1986; ALLDREDGE und SILVER, 1988) verstanden, denen erstmals Anfang der 50er Jahre verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Die Partikel wurden als „Marine Snow“ bezeichnet, da sie beim Absinken für den Beobachter unter Wasser wie ein verlangsamter Schneefall wirken. Entsprechende Aggregate in Seen und Flüssen wurden daraufhin als Lake bzw. River Snow bezeichnet (GROSSART, 1995; BÖCKELMANN et al., 2000). Inzwischen wurden aber auch kleinere Partikel beschrieben. Marine Kolloide, die mit ihrer Größe von 1-1.000 nm im Durchmesser auf der Grenze zwischen gelöster chemischer Substanz und sinkendem Partikel liegen, kommen im Ozean häufig vor (WELLS, 1998). So fanden KOIKE et al. (1990) in den oberen Wasserschichten (50 m)  $10^7 \text{ ml}^{-1}$  zarte, flexible Partikel in einer Größe von 0,38-1  $\mu\text{m}$ , die vor allem aus totem organischem Material bestanden. WELLS und GOLDBERG (1991) fanden  $<10^4$  bis  $>10^9$  kolloidale Partikel mit einer Größe von  $<0,12 \mu\text{m}$  pro ml, die ebenfalls hauptsächlich aus organischem Material bestanden. LONG und AZAM (1996) fanden  $10^3$ - $10^5 \text{ ml}^{-1}$  proteinhaltige Partikel (Coomassie Stained Particles) in einer Größenordnung von wenigen bis zu einigen hundert  $\mu\text{m}$ , von denen 20-40% durch Bakterien besiedelt waren, und ALLDREDGE und Mitarbeiter (1993) beschrieben transparente exopolymere Partikel (TEP,  $28$ - $5.000 \text{ ml}^{-1}$ ) einer Größe von 3 bis  $>100 \mu\text{m}$ , die durch Polysaccharid-spezifische Färbemethoden sichtbar gemacht werden konnten. TEP werden

von lebenden Phytoplankton- und Bakterienzellen ausgeschieden (PASSOW und ALLDREDGE, 1994), spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Marine Snow und dienen als Substrat und Mikrohabitat für assoziierte Bakterien sowie als Nahrungsquelle für Zooplankton (ALLDREDGE et al., 1993; PASSOW et al., 1994). TEP sind somit für den Kohlenstoffzyklus wichtig, kommen aber im offenen Ozean seltener vor als in küstennahen Regionen (PASSOW und ALLDREDGE, 1994).

Marine Snow, der ubiquitär im Pelagial der Ozeane verteilt ist (ALLDREDGE et al., 1986) und innerhalb weniger Tage in große Tiefen absinken kann (einige 10-100 m am Tag), wird als Haupttransportmittel von Material zum Meeresboden angesehen. Im Allgemeinen kommt er in der oberen Wassersäule und in den produktiveren Gebieten der Ozeane in höheren Konzentrationen vor (LAMPITT, 1998). Die Häufigkeit ist dabei abhängig von der Produktionsrate, dem Abbau und dem Absinken und dies wiederum von den physikalischen, biologischen und chemischen Eigenschaften der Wassersäule und der Partikel selbst. Außerdem wird der Migration des Zooplanktons und der Organismen des Nektons von der Oberfläche (nachts) in bis zu 1.000 m Tiefe (tagsüber) ein starker Einfluss auf den vertikalen Transport von sinkendem Material zugeschrieben, da die Organismen vor allem in den oberen Wasserschichten Nahrung konsumieren, aber in der gesamten Wassersäule respirieren, Fäzes abgeben oder absterben (LAMPITT, 1998). Solange sich ein Aggregat in der euphotischen Zone befindet, kann durch anheftendes Phytoplankton eine Primärproduktion stattfinden, wodurch Sauerstoffblasen entstehen, die eine Verlangsamung des Absinkprozesses oder sogar einen Aufstieg in der Wassersäule verursachen (RIEBESSELL, 1992). Auch Aggregat-assoziierte Bakterien und Protozoen können freie Gase produzieren, die ebenfalls die Sinkgeschwindigkeit der Aggregate reduzieren (LAMPITT, 1998).

Marine Snow wird über zwei Hauptwege gebildet (ALLDREDGE und SILVER, 1988). Zum einen *de novo* durch lebendes Zoo- und Phytoplankton (vor allem schleimige Fangnetze und Scheiden) und zum anderen durch physikalische Aggregation kleinerer Partikel. Mikroaggregate, Phytoplanktonzellen, Fäzes, organisches und anorganisches Material kollidieren durch unterschiedliches Sedimentationsverhalten, Scherkräfte und Brownsche Molekularbewegung und kleben durch verschiedene organische Verbindungen biologischen Ursprungs, wie Exopolymere, zusammen (IRIBERRI und HERNDL, 1995). Auch die Kapselbildung, die bei Partikel-assoziierten Bakterien häufiger und stärker ausgeprägt ist als bei frei lebenden, soll zur Einleitung der Partikelbildung beitragen (HEISSENBERGER et al., 1996). Die aus organischem und anorganischem Material bestehenden Marine Snow-Partikel (KNAUER et al., 1982; ALLDREDGE und SILVER, 1988) variieren sowohl aufgrund ihres unterschiedlichen Ursprungs als auch wegen der ver-

schiedenen auf sie wirkenden biologischen Prozesse stark in ihren Strukturen (fragil, porös, locker bis stabil, gallertartig), ihren Formen (kugelig, fädig oder platt) und in ihren physikalischen Eigenschaften (klebrig, schnell und langsam absinkend; ALLDREDGE und SILVER, 1988; LAMPITT, 1998). Klebrigkeit und Fragilität bestimmen, wie gut die Partikel aggregieren können, und ihre Dichte kontrolliert die Geschwindigkeit, mit der sie in der Wassersäule absinken (LAMPITT, 1998). Der Verlust von Marine Snow geschieht durch Zersetzung (Abbau durch Mikroorganismen), Verzehr durch Zooplankton oder Organismen des Nektons und Sedimentation der Partikel sowie Zerstörung durch Turbulenzen beispielsweise hervorgerufen durch Schwimmaktivität des Zooplanktons (ALLDREDGE und SILVER, 1988; DILLING und ALLDREDGE, 2000).

Aggregate sind Organismen- und Nährstoff-reiche Mikrohabitate, die im Vergleich zum Umgebungswasser erhöhte Nährstoffkonzentrationen (SHANKS und TRENT, 1979) und mikrobielle Aktivitäten in einer sonst oligotrophen Umwelt aufweisen (CARON et al., 1982). Die Abundanz der Mikroorganismen ist auf den Aggregaten um 2-4 Größenordnungen höher als im Umgebungswasser (IRIBERRI und HERNDL, 1995). PLOUG und Mitarbeiter (1999) fanden auf Marine Snow sogar eine >2.000fach höhere Bakteriendichte als im Umgebungswasser. Die spezifischen Wachstumsraten von assoziierten und frei lebenden Bakterien sind aber gewöhnlich vergleichbar (ALLDREDGE et al., 1986; MÜLLER-NIKLAS et al., 1994; IRIBERRI und HERNDL, 1995). Zu den Aggregat-besiedelnden Organismen gehören heterotrophe Bakterien, Cyanobakterien, Phytoplankton, Protozoen und Metazoen (CARON et al., 1982; IRIBERRI und HERNDL, 1995). Anzahl und Art der besiedelnden Mikroorganismen variieren mit dem Alter (ALLDREDGE und SILVER, 1988) sowie der Entstehung und der Zusammensetzung der einzelnen Partikel (CARON et al., 1982; ALLDREDGE et al., 1986). Die hohen Nährstoffkonzentrationen beeinflussen neben der Artenzusammensetzung auch den metabolischen Zustand der Mikroorganismen, die mit den Aggregaten assoziiert sind (SHANKS und TRENT, 1979). So weisen Partikel-assozierte Bakterien einige morphologische und metabolische Eigenschaften auf, die sie von den frei lebenden Arten unterscheiden (IRIBERRI und HERNDL, 1995). CARON und Mitarbeiter (1982) fanden an den Aggregaten mehr Stäbchen, filamentöse, gekrümmte und spiralförmige Bakterien (etwa 54 %) als im Umgebungswasser (etwa 21 %) und außerdem teilweise sehr lange Filamente und Spirochäten-ähnliche Bakterien, die frei lebend nie gefunden wurden. Die assoziierten Bakterien sind in der Regel größer (ALLDREDGE und YOUNGBLUTH, 1985; ALLDREDGE et al., 1986; ACINAS et al., 1999) und verschiedene exoenzymatische Aktivitäten (u. a. Proteasen, Phosphatasen und Glucosidasen) sind bei ihnen höher als im Umgebungswasser. Sie hydrolysieren mehr Substrate als sie verwerten können und geben mehr als 97% der Hydrolysate ins Umgebungswasser ab (SMITH et

al., 1992), die somit den frei lebenden Bakterien zur Verfügung stehen (CHO und AZAM, 1988). Die überschüssigen organischen Substanzen bilden eine chemische „Spur“ hinter dem sinkenden Aggregat und leiten so kleine Zooplanktonorganismen zum Aggregat hin. Außerdem kann das Wachstum frei lebender Bakterien in diesem Bereich gesteigert sein (KIØRBOE, 2001).

Trotz der festgestellten phylogenetischen und funktionalen Unterschiede Partikel-assoziiertes im Vergleich zu frei lebenden Bakterien (DELONG et al., 1993; BIDDLE und FLETCHER, 1995; ACINAS et al., 1997, 1999; RATH et al., 1998; RIEMANN et al., 2000; MOESENEDER et al., 2001) scheint es mittlerweile fraglich, ob diese beiden Gemeinschaften strikt getrennt werden können. So stellten WORM et al. (2001) fest, dass zu Beginn einer Phytoplanktonblüte die funktionelle Diversität assoziierter und frei lebender Bakterien sehr ähnlich ist, was sich im weiteren Verlauf der Blüte ändert, und RIEMANN und WINDING (2001) beobachteten, dass frisch entstandenes partikuläres Material durch Bakterien aus dem Umgebungswasser kolonisiert wird und dass die dominierenden Partikel-assoziierten Phylotypen auch frei lebend vorkommen. Die Autoren vermuten, dass beide Bakteriengemeinschaften nicht als separate Einheiten betrachtet werden können, sondern als interagierende Ansammlungen, deren Übereinstimmung vom partikulären Material abhängig ist. Auch UNANUE und Mitarbeiter (1992) beschreiben ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Gemeinschaften, das durch die Konzentration des partikulären Materials, der Nährstoffe und anderer Umweltfaktoren reguliert wird. Für die Ähnlichkeit beider Gemeinschaften bzw. für die Unterschiede in der Zusammensetzung assoziierter Gemeinschaften verschiedener Standorte sind neben Partikelursprung und -zusammensetzung auch deren Alter und Struktur wichtige Faktoren (RATH et al., 1998; RIEMANN und WINDING, 2001). Die Partikelbesiedlung sowie die Wachstumsrate und hydrolytische Aktivitäten der assoziierten Bakterien verändert sich mit zunehmendem Alter der Partikel (RIEMANN et al., 2000) und ältere Partikel weisen aufgrund der schlechteren Wachstumsbedingungen eine spezialisierte Bakteriengemeinschaft auf (RIEMANN und WINDING, 2001). Außerdem können sich z. B. durch Turbulenzen eigentlich Aggregat-assoziierte Bakterien lösen und ins Umgebungswasser gelangen (RIEMANN und WINDING, 2001). Ferner vermuten AZAM und LONG (2001), dass Partikel-assoziierte Bakterien ihre Nachkommen ins Umgebungswasser abgeben, wo diese die Hydrolyseprodukte der assoziierten nutzen, sich schnell vermehren können und somit dem Fraß entgehen. Damit hätte der hohe Energieaufwand von Aggregat-besiedelnden Bakterien bei der Kolonisierung, der Enzymproduktion und der anschließenden Hydrolyse mit der Freisetzung von ihnen ungenutzten DOMs, zusammen mit der Gefahr gefressen zu werden bzw. mit dem Partikel in große Tiefen zu gelangen, an die sie nicht angepasst sind (niedrige Temperatur, hoher Druck), einen „Sinn“.

Die Probennahme von unveränderten Partikeln stellt wegen deren schleimiger Konsistenz, ihrer Zerbrechlichkeit und heterogenen Verteilung, ebenso wie die Bestimmung des Einflusses von Druckänderungen auf den bakteriellen Metabolismus während der Probennahme, ein methodisches Problem dar (MÜLLER-NIKLAS et al., 1994; LAMPITT, 1998). Große Partikel werden häufig aufgrund ihrer Fragilität während der Probennahme und später erfolgender Filtration zerstört. Sollen die assoziierten Bakterien zudem noch identifiziert werden, kommen die Probleme von Isolation und Charakterisierung noch hinzu.

### **1.3 Identifizierung und Charakterisierung von unbekanntem Bakterien**

Bei der Anwendung klassischer mikrobiologischer Techniken für die Untersuchung mariner Bakterien (Isolation, Bestimmung von Morphologie und biochemischen Charakteristika) wurden schnell Grenzen erreicht, da zunächst nur wenige Bakterien isoliert und auf Agarmedien kultiviert werden konnten (KIRCHMAN und WILLIAMS, 2000). Daraus wurde zunächst gefolgert, dass Bakterien in marinen Habitaten nicht sehr häufig sind. Direkte lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Anzahl der Bakterien um ein Vielfaches höher ist als die koloniebildenden Einheiten auf Agarplatten vermuten lassen (JANNASCH und JONES, 1959), was von STALEY und KONOPKA (1985) als „the great plate count anomaly“ bezeichnet wurde. Diese Diskrepanz beruht zum einen darauf, dass es sich bei einigen mikroskopisch sichtbaren Bakterien um nicht intakte bzw. tote Zellen handelt. So wurde mit Hilfe von DNA-Färbetechniken und Elektronenmikroskopie gezeigt, dass lediglich 2-32% aller pelagischen Bakterien Nukleotide enthalten (ZWEIFEL und HAGSTRÖM, 1995) bzw. nur maximal 51% aller Marine Snow-assoziierten und 34% aller frei lebenden Bakterien intakt, d. h. mit intrazellulären Strukturen ausgestattet sind (HEISSENBERGER et al., 1996). Zum anderen kann es sich um Arten handeln, die auf den klassischen mikrobiologischen Medien nicht wachsen können oder um Bakterien, die sich im Zustand des Hungerns („starvation“; AMY und MORITA, 1983) oder dem Schlaf- bzw. Ruhezustand („dormancy“, KAPRELYANTS et al., 1993) befinden und in diesem Zustand, auch als „viable but non culturable“ bezeichnet (ROSZAK und COLWELL, 1987), unter Laborbedingungen nicht wachsen können. Die Kultivierungspraxis wurde früh in Frage gestellt (JANNASCH und JONES, 1959). Trotz methodischer Weiterentwicklung können unter Laborbedingungen mehr als 99% des Bakterioplanktons nicht auf Agarmedien kultiviert werden.

Im Gegensatz zu den meisten Eukaryonten können nur die wenigsten Bakterien anhand ihrer morphologischen Eigenschaften identifiziert werden, da sie nur wenig morphologische Merkma-

le aufweisen. In der klassischen Bakterienidentifizierung werden zur Bestimmung physiologischer und biochemischer Eigenschaften viele Tests benötigt, die zeitaufwendig und oft schwierig zu standardisieren und zu interpretieren sind (FUHRMAN et al., 1994; BUSSE et al., 1996). Aufgrund der zusätzlichen Probleme bei der Kultivierung mariner Bakterien gewannen die Mitte der 80er Jahre entwickelten Methoden zur Sequenzbestimmung und dem anschließenden Vergleich ribosomaler RNA-Moleküle für die Identifizierung von Bakterien immer mehr an Bedeutung (u. a. OLSEN et al., 1986, PACE et al., 1986) und erbrachten neue Erkenntnisse zur Diversität mariner Bakterioplanktongemeinschaften. In zahlreichen mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen Methoden erstellten 16S rDNA-Genbanken, vor allem aus dem Atlantik und dem Pazifik, konnten die Sequenzen trotz Anwendung verschiedener Methoden zur Gewinnung der rDNA-Fragmente hauptsächlich den Cyanobakterien (*Synechococcus* und *Prochlorococcus*) und den  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -*Proteobacteria* zugeordnet werden (u. a. BRITSCHGI und GIOVANNONI, 1991; SCHMIDT et al., 1991; DELONG et al., 1993; FUHRMAN et al., 1993; MULLINS et al., 1995; ACINAS et al., 1999). In marinen Habitaten wurden außerdem Gram-positive Bakterien, *Cytophaga-Flavobacteria* (CF),  $\beta$ -Proteobakterien und neue Archaea (Archaea Group I und II) gefunden (DELONG, 1992; FUHRMAN et al., 1993; GIOVANNONI et al., 1995; RAPPÉ et al., 1997; SUZUKI et al., 1997; MASSANA et al., 1997). Im oligotrophen Ozean wurden  $\beta$ -Proteobakterien allerdings bisher nicht gefunden, sondern ausschließlich in Küstengewässern und Meeresarmen (COTTRELL und KIRCHMAN, 2000a, 2000b). Dagegen sind sie sowohl frei lebend als auch Partikel-assoziiert (Lake Snow, River Snow) in Süßwasserhabitaten häufig anzutreffen (WEISS et al., 1996; GROSSART und SIMON, 1998; BÖCKELMANN et al., 2000; SCHWEITZER et al., 2001).

Sequenzanalysen zeigten außerdem, dass die rDNA Partikel-assoziiierter Prokaryonten fundamental von der frei lebender abweicht (DELONG et al., 1993; BIDLE und FLETCHER, 1995; ACINAS et al., 1999), wobei die Diversität der assoziierten Gemeinschaft aber geringer ist als die der frei lebenden (ACINAS et al., 1997). Als Partikel-assoziierte heterotrophe Bakterien konnten bisher Vertreter der CF, Planctomycetales, Gram-positiven Bakterien sowie  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -*Proteobacteria* gefunden werden (DELONG et al., 1993; RATH et al., 1998).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Um Informationen über das Abbauverhalten heterotropher Partikel-assoziiierter Bakterien aus dem Südatlantik (Antarktis) zu erhalten, sollten diese in der vorliegenden Arbeit morphologisch, physiologisch, chemotaxonomisch und molekularbiologisch näher charakterisiert und klassifi-

ziert werden. Zwei der Isolate aus dem Südatlantik wurden ergänzend zu den Untersuchungen von HEUCHERT (1999) physiologisch, chemotaxonomisch und molekularbiologisch charakterisiert und identifiziert. Zusätzlich wurden aus verschiedenen Wassertiefen des äquatorialen Atlantiks ebenfalls Partikel-assoziierte heterotrophe Bakterien isoliert und morphologisch sowie molekularbiologisch untersucht, um festzustellen, ob sich die Diversität mit zunehmender Wassertiefe verändert. Ferner sollten die Pigmente ausgesuchter Isolate mittels photometrischer, chromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren eingehender charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

Zur Bearbeitung der Fragestellung standen zum einen Isolate aus dem Südpolarmeer (südlicher Atlantik, Antarktis) zur Verfügung, die bereits während der Diplomarbeit von HEUCHERT (1999) gewonnen wurden, zum anderen wurden während der Fahrt M49/4 mit dem FS Meteor im äquatorialen Atlantik weitere Bakterien isoliert. Im Teil A werden die Methoden dargestellt, die zur Charakterisierung der Isolate aus dem südlichen Atlantik (Antarktis) herangezogen wurden, wobei zum besseren Verständnis auch noch einmal die Probennahme und die Vorgehensweise bei der Isolierung erläutert werden, die bereits von HEUCHERT (1999) durchgeführt worden sind. Diese sind durch \* in der Überschrift gekennzeichnet. Teil B gibt die Versuche wieder, die zur Isolierung sowie zur Beschreibung der Reinkulturen aus dem äquatorialen Atlantik durchgeführt wurden.

### **Teil A: Isolierung von Reinkulturen aus der Antarktis und deren Charakterisierung**

#### **2.1 Herkunft des Probenmaterials**

Während der Fahrt ANT XV/4 mit dem FS POLARSTERN von März bis Mai 1998 von Punta Arenas (Chile) nach Kapstadt (Südafrika) wurden aus unterschiedlichen Tiefen Wasserproben entnommen. In der vorliegenden Arbeit wurden Isolate untersucht, die während der Diplomarbeit (HEUCHERT, 1999) jeweils aus 20 m Wassertiefe an den Stationen 49/020/1<sup>1</sup> (64°48,1'S, 42°29,8'W) und 49/088/2 (66°27,8'S, 00°00,8'E) gewonnen wurden. Die Lage der Stationen ist in Abbildung 6.1 (s. Kap. 6.1) ersichtlich.

Die in den beprobten Tiefen der jeweiligen Station vorherrschenden abiotischen Bedingungen (Messung mit CTD-Sonde bzw. persönliche Mitteilung von Dr. E. Fahrbach, Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven) sind in Tabelle 2.1 aufgeführt (für Einzelheiten zu den Messmethoden s. FAHRBACH et al., 1999 und BAKKER, 1999).

---

<sup>1</sup> Die Stationsbezeichnung setzt sich aus Fahrt/Station/Cast zusammen. Cast ist die fortlaufende Nummerierung der jeweils eingesetzten Geräte an den betreffenden Stationen (z. B. Cast 2: zweites eingesetztes Gerät)

**Tab. 2.1:** Daten der abiotischen Faktoren (CTD-Messung bzw. persönlich Mitteilung von Dr. E. Fahrbach) der beprobten Tiefen der Stationen 49/020/1 und 49/088/2

Stations-Nr.	Tiefe (m) <sup>a</sup>	Druck (dbar) <sup>a</sup>	Temp. (°C) <sup>a</sup>	Salinität (‰) <sup>a</sup>	Sauerstoff (µmol/kg) <sup>b</sup>	Nitrat (µmol/kg) <sup>b</sup>	Nitrit (µmol/kg) <sup>b</sup>	Silikat (µmol/kg) <sup>b</sup>	Phosphat (µmol/kg) <sup>b</sup>
49/020/1	20	19,9	-1,73	33,69	348,76 <sup>c</sup>	25,99	0,26	70,90	1,78
49/020/1	100	100,1	-1,65	34,46	278,59 <sup>c</sup>	29,48	0,20	78,15	2,07
49/020/1	150	149,6	-1,10	34,53	k. M.	31,55	0,03	87,96	2,14
49/020/1	250	249,7	0,20	34,66	k. M.	33,50	0,02	106,77	2,30
49/020/1	350	349,0	0,54	34,69	k. M.	34,27	0,03	115,78	2,35
49/088/2	20	20,0	-1,72	34,22	339,88 <sup>c</sup>	27,72 <sup>c</sup>	0,26 <sup>c</sup>	58,60 <sup>c</sup>	1,95 <sup>c</sup>
49/088/2	100	99,5	0,11	34,56	203,04 <sup>c</sup>	33,99 <sup>c</sup>	0,07 <sup>c</sup>	88,83 <sup>c</sup>	2,37 <sup>c</sup>
49/088/2	200	202,2	1,18	34,70	190,37 <sup>c</sup>	33,16 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup>	96,10 <sup>c</sup>	2,29 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Werte entstammen CTD-Messungen

<sup>b</sup> Werte von Dr. E. FAHRBACH, Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven

<sup>c</sup> Werte, die an einem anderen Cast der Station in derselben Tiefe (m) gemessen wurden  
Temp., Temperatur; k. M., keine Messwerte vorhanden

## 2.2 Bearbeitung des Probenmaterials an Bord des FS POLARSTERN\*

Da marine Prokaryonten im Allgemeinen nicht größer als 1-2 µm sind (SHERR und SHERR, 2000), wurden zur Gewinnung Partikel-assoziiierter Bakterien Filter mit mindestens 5 µm Porengröße verwendet (s. u.). Diese sollten demnach nur Partikel mit assoziierten Bakterien zurückhalten, während sich die frei lebenden entfernen lassen.

An der jeweiligen Station wurde das Meerwasser mit Hilfe von Niskin-Wasserschöpfern entnommen. Je 10 l des Wassers wurden in Nalgene-Kanister abgefüllt, die vor jeder neuen Probenahme mit autoklaviertem Aqua dest. gespült wurden, und anschließend zur Gewinnung von organischen Partikeln mit Hilfe einer Membranpumpe mit 0,2 bar Unterdruck durch Polycarbonatfilter (Millipore, Schwalbach) mit 10 µm- (Station 49/020/1) bzw. 5 µm- (Station 49/088/2) Porengröße filtriert. Die Filter wurden dann in sterilfiltriertes (0,2 µm Polycarbonatfilter, Millipore), autoklaviertes Meerwasser überführt, bis zur Ankunft im Labor der Universität Bremen bei -30 °C und dort schließlich bis zur Bearbeitung bei -18 °C gelagert.

## 2.3 Zusammensetzung des Nährmediums

Zur Isolierung sowie zur Anzucht und Hälterung der Reinkulturen wurde das künstliche Meerwassermedium ASN<sub>III</sub> (modifiziert nach RIPPKA et al., 1979) benutzt, dem als Kohlenstoffquelle zur Anzucht der heterotrophen Bakterien 0,1% Hefeextrakt zugesetzt wurde. Die Komponenten

des Mediums sind in den Tabellen 2.2 bis 2.4 angegeben. Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Millipore) angesetzt.

Das Medium hat normalerweise einen Salzgehalt von 2,7%. Da die untersuchten Bakterien der vorliegenden Arbeit aus einem Habitat mit einer Salinität von ca. 3,3 bis 3,5% isoliert wurden, musste die Salinität durch zusätzliche Gabe von NaCl auf etwa 3,4% erhöht werden. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf 7,8-8,2 eingestellt. Die 7-Vitamine-Lösung (s. Tab. 2.4) wurde sterilfiltriert (0,2 µm Polycarbonatfilter, Millipore) und dem autoklavierten Grundmedium (25 min bei 121 °C) steril zugegeben.

**Tab. 2.2:** Zusammensetzung des künstlichen Meerwassermediums ASN<sub>III</sub> (modifiziert nach RIPPKA et al., 1979). Alle Komponenten gelöst in Aqua dest.

Mineralsalze und organische Komponenten	g/l oder ml/l
NaCl	25 g
MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	2 g
KCl	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	3,5 g
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02 g
Hefe-Extrakt	1 g
Spurenelementelösung SL 10	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3 H <sub>2</sub> O (8 g/l)	2,5 ml
FeNH <sub>4</sub> -Citrat (6 g/l)	0,5 ml
7-Vitamine-Lösung	0,5 ml

**Tab. 2.3:** Zusammensetzung der Spurenelementelösung SL-10 (TRÜPER und PFENNIG, 1992). Alle Mineralsalze gelöst in Aqua dest.

Mineralsalze	mg/l oder ml/l
HCl (7,7 M)	10 ml
FeCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	1500 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg
CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	190 mg
MnCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	80 mg
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	36 mg
NiCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	24 mg
CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	2 mg

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung der 7-Vitamine-Lösung (VOGT, 1997). Alle Vitamine gelöst in Aqua dest.

Vitamine	mg/l
4-Aminobenzoesäure	80
D(+)-Biotin	20
Nikotinsäure	200
Ca-D(+)-Pantothenat	100
Pyridoxaminhydrochlorid	300
Thiamindichlorid	200
Cyanocobalamin	100

## 2.4 Isolation und Kultivierungsbedingungen

### 2.4.1 Isolierung der Bakterien\*

Von beiden Stationen (49/020/1 und 49/088/2) wurden von den Proben aus 20 m Wassertiefe jeweils 50 bzw. 100  $\mu\text{l}$  auf eine  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Agarplatte (s. Kap. 2.4.4.2) gegeben und ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in einem Brutschrank sowie bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ca.  $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in einem Kühlschrank inkubiert und täglich auf Wachstum kontrolliert. Aufgrund der großen Temperaturschwankungen im Kühlschrank wurden die Inkubationen für die Versuchsansätze im Kühlraum ( $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt.

Anhand ihrer Morphologie unterscheidbare Kolonien wurden mit Hilfe des 13-Ösenausstriches auf jeweils neue  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Agarplatten überführt und erneut bei  $27$  bzw.  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis nach mikroskopischer Kontrolle im Stereomikroskop (Stemi SV 6, Zeiss) und im Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskop (Axiolab, Zeiss) Reinkulturen vorlagen.

### 2.4.2 Hälterung der Reinkulturen

Die im Rahmen der Diplomarbeit von HEUCHERT (1999) erhaltenen Reinkulturen wurden auf Schrägagar ( $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Medium mit 2% Agar-Agar) im Kühlschrank (ca.  $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gelagert. Im Laufe der vorliegenden Arbeit (etwa seit Mitte 2001) wurden zur Hälterung der Reinkulturen Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden die einzelnen Isolate in  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Medium angezogen (s. Kap. 2.4.3), erneut auf Reinheit kontrolliert und in sterilen Eppendorfreaktionsgefäßen (ERG) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Glycerol (800  $\mu\text{l}$  Reinkultur in 200  $\mu\text{l}$  sterilem 87%igem Glycerol) eingefroren. Für alle weiteren Untersuchungen wurde den ERG mit Hilfe einer Impföse steril ein wenig Material entnommen und nach Bedarf entweder in  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Flüssigmedium suspendiert oder auf  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Agarplatten ausgestrichen (s. Kap. 2.4.4).

### 2.4.3 Anzucht von Vorkulturen

Von den Reinkulturen wurde mit Hilfe einer Platindraht-Impföse etwas Bakterienmaterial in einen mit etwa 30 ml Kulturmedium (s. Kap. 2.3) gefüllten und mit Wattestopfen verschlossenen 50 ml Erlenmeyerkolben überimpft. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung wurden die Kolben in einem Rotationsinkubator (innova 4000, New Brunswick Scientific) bei 130 U/min und  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) inkubiert.

Das Isolat 88/2-1 hatte im Verlauf dieser Arbeit zunächst sein Wachstum eingestellt. Nach mehreren Anzuchtversuchen aus älteren Reinkulturen, gelang es jedoch, dieses Isolat durch Inkubation bei Raumtemperatur ( $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , RT) wieder zu kultivieren und zum Wachstum zu bringen. Die Inkubation dieses Isolates erfolgte seitdem bei RT auf einem Rotationsschüttler (130 U/min, innova 2003, New Brunswick Scientific) unter aeroben Bedingungen.

#### 2.4.4 Anzucht der Versuchskulturen

##### 2.4.4.1 Flüssigmedium

Je nach Versuchsansatz wurden die einzelnen Kultivierungsparameter oder die Zusammensetzung des  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Mediums (s. Kap. 2.3) variiert. Das jeweilige Medium wurde aus einer ca. 24-48 h alten, homogenen Vorkultur (s. Kap. 2.4.3) 2%ig angeimpft. Wurde dem Medium statt Hefeextrakt und Eisenammoniumcitrat eine andere Kohlenstoffquelle zugesetzt (s. Kap. 2.6.4.1), so wurde mit diesem neuen Medium vor dem eigentlichen Versuchsansatz eine weitere Vorkultur angeimpft, damit sich die Isolate an die neuen Bedingungen adaptieren konnten.

Die Versuchsansätze zur Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (O. D.) erfolgten in sterilen Reagenzgläsern, die mit einer Alukappe verschlossen wurden. Je 5 ml des jeweiligen modifizierten  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Mediums wurden 2%ig mit der Vorkultur (s. o.) angeimpft. Die Reagenzgläser wurden, wenn nicht anders angegeben, zur besseren Sauerstoffversorgung in einem Reagenzglas-Rotationsschüttler (CMV ROM, Fröbel Labortechnik, Lindau) in einem Brutschrank (New Brunswick Scientific Sm 7850) bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bzw. bei RT (Isolat 88/2-1) inkubiert.

##### 2.4.4.2 Festes Nährmedium

Zur Anzucht der Isolate auf festem Nährmedium wurde das  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Medium (s. Kap. 2.3) mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt und nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erkalten des Agars wurde mit einer sterilen Platindraht-Impföse etwas Material aus einer Vorkultur oder aus einem ERG des Glycerolstocks entnommen, auf der Agarplatte ausgestrichen und bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  bzw. RT (Isolat 88/2-1) unter aeroben Bedingungen inkubiert.

## 2.5 Morphologische Untersuchungen

Die Reinheitskontrollen sowie die Untersuchungen der Kolonie- und Zellmorphologie wurden bereits von HEUCHERT (1999) durchgeführt. Die durchgeführten Methoden sind aber auch in Teil B (s. Kap. 2.13.1) noch einmal dargestellt.

### 2.5.1 Untersuchung zur Beweglichkeit

Die Art der Bewegung gibt nach RÜGER (1993) erste Hinweise auf die Anordnung der Geißeln. Eine langsame, taumelnde Fortbewegung deutet auf peritriche Begeißelung hin, während eine schnelle, geradlinige Bewegung mit raschem Wechsel zwischen vor- und rückwärts für polar monotrich begeißelte Bakterien typisch ist.

Eine erste Beobachtung zur Beweglichkeit der Isolate wurde parallel zur Reinheitskontrolle (s. Kap. 2.13.1) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Isolate mittels Schwärmagar und Transmissionselektronenmikroskopie (siehe folgende Kapitel) untersucht.

#### 2.5.1.1 Schwärmagar

Der so genannte Schwärmagar (ASN<sub>III</sub> mit 0,3% Agar, modifiziert nach SÜBMUTH et al., 1999) wurde in der Mitte mit dem zu testenden Bakterium punktförmig beimpft, bei 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1) inkubiert und täglich über eine Dauer von maximal 14 Tagen auf Wachstum kontrolliert. Eine punktförmige Kolonie, die sich ausschließlich an der Impfstelle befindet, zeigt Unbeweglichkeit an. Bewegliche Zellen dagegen haben die Möglichkeit, sich vom Impfpunkt zu entfernen und sich in einem größeren Umkreis zu verteilen.

#### 2.5.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Der Besitz von Geißeln, deren Anzahl und Anordnung haben vor allem bei der Klassifizierung und Identifizierung von Gram-negativen Bakterien eine gewisse Bedeutung (BAST, 1999). Aufgrund ihrer Größe (Durchmesser: 10-30 nm) sind sie im Lichtmikroskop jedoch ohne besondere Vorbehandlung nicht sichtbar. Am besten darstellbar sind sie im Elektronenmikroskop.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und der Methode der Negativkontrastierung nach NAGL (1981) sollte die Anordnung eventuell vorhandener Geißel(n) ermittelt werden. Dazu wurden Kunststoff-beschichtete (0,5% Pioloform in Chloroform) Kupfergrids mit

einem Tropfen einer jungen Zellkultur (Wachstum in ASN<sub>III</sub>-Medium für ca. 24 h bei 27 °C bzw. für Isolat 88/2-1 drei Tage bei RT) versehen. Nachdem die Grids an der Luft getrocknet waren, wurden die Proben für 5 min mit 5% Uranyl-Acetat (in wässriger Lösung) fixiert. Das Fixationsmittel wurde mit Aqua dest. abgespült, die Grids erneut an der Luft getrocknet und anschließend im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10) der Abteilung Physiologische Pflanzenanatomie (Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Bremen) untersucht.

### 2.5.2 Bestimmung der Zellgrößen

Die Ermittlung der Zellgröße erfolgte auf nach PFENNIG und WAGENER (1986) hergestellten Agar-beschichteten Objektträgern (Agar-Slides). Durch die Benutzung von Agar-Slides wird die Mikroskopie von Bakterienzellen stark vereinfacht. Die Zellen werden durch den Agar fixiert und können sich deshalb weder durch Eigenbewegung noch durch Brownsche Molekularbewegung bewegen. Außerdem liegen die Zellen aufgrund der Agarschicht alle in einer horizontalen Ebene, wodurch nicht mehr ständig fokussiert werden muss.

Auf die Agar-Slides, die ein bis drei Tage staubfrei in einem schwach feuchten Milieu gelagert wurden, wurde jeweils ein Tropfen der zu untersuchenden homogenen Kultur (24-48 h Wachstum unter Standardbedingungen, s. Kap. 2.4.3) gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach kurzer Zeit quoll der Agar etwas auf und fixierte so die Bakterien, die dann mit einem Messokular (Zeiss Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskop, Axiolab) vermessen werden konnten. Von jedem Isolat wurden mindestens zehn zufällig ausgewählte Zellen vermessen.

### 2.5.3 Gram-Färbung

Die Anfärbung von Bakterienzellen ist eine hilfreiche Anwendung für die Beschreibung von Bakterien. Zum einen verbessert eine Anfärbung die Sichtbarkeit der Zellen durch die Erhöhung des Kontrasts, zum anderen können bestimmte Zellstrukturen oder -einschlüsse, z. B. Sporen, durch bestimmte Farbstoffe dargestellt werden. Außerdem werden Unterschiede im Färbeverhalten von Bakterien zu deren Differenzierung und Identifikation verwendet. Bei dieser Art der Färbung (Differentialfärbung) werden mindestens zwei verschiedene Farbstoffe benötigt. So auch bei der Gram-Färbung, die in der bakteriellen Klassifikation von großer Bedeutung ist. Bei dieser Methode werden die Bakterien aufgrund von Unterschieden im Zellwandaufbau in zwei große Gruppen, die Gram-positiven und die Gram-negativen, unterteilt (Erklärung für das unterschiedliche Färbeverhalten s. BAST, 1999).

Um das Gram-Färbeverhalten der untersuchten Bakterien zu bestimmen wurde die Gram-Färbung modifiziert nach DREWS (1983) durchgeführt. Im Anschluss an die Hitzefixierung des Präparates wurde der Objektträger mit Grams Kristallviolettlösung (Merck, 1:5 mit Aqua dest. verdünnt) überschichtet. Nach einer Einwirkungszeit von zwei Minuten wurde dieser Farbstoff mit Lugolscher Lösung (1% Iod-Kaliumiodidlösung, Merck) kurz abgespült. Die Lugolsche Lösung wurde nun aufgetropft und nach ebenfalls zwei Minuten abgegossen. Anschließend wurde mit 96%igem Ethanol so lange gespült, bis keine Farbstreifen mehr am Objektträger herabließen. Das Präparat wurde dann mit einer Safraninlösung (s. SÜBMUTH, 1999) gegengefärbt und nach kurzer Einwirkungszeit (ca. 15 s) mit Aqua dest. gespült. Das gefärbte Präparat wurde im Zeiss Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskop (Axiolab) betrachtet, um die Reinheit des jeweiligen Isolates und dessen Färbeverhalten zu beurteilen: Gram-positive Bakterien erscheinen blau-violett, Gram-negative Bakterien rot.

#### 2.5.3.1 KOH-Test

Ein Schnellverfahren zur Gram-Differenzierung ist der KOH-Test nach BUCK (1982), bei dem sich bereits ohne Färbung ein erster Überblick über die Gram-Reaktion unbekannter Isolate gewinnen lässt (RÜGER, 1993). Die Zellwand Gram-negativer Bakterien wird durch 3%ige Kalilauge schnell zerstört, wodurch die DNA frei wird und als viskoser Faden in Erscheinung tritt. Bei Gram-positiven Bakterien wird die Zellwand nicht lysiert (SÜBMUTH et al., 1999). Stark Schleim bildende Bakterien, die durch die KOH-Lösung nicht lysiert werden, können allerdings Gram-positive Reaktionen vortäuschen (RÜGER, 1993).

## 2.6 Physiologische Untersuchungen

### 2.6.1 Temperaturoptimum

Zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperatur wurden zunächst Vorkulturen unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) angesetzt, die Versuchsansätze daraus angeimpft (s. Kap. 2.4.4.1) und bei 5-45 °C (in Abstufungen von ca. 5 °C) inkubiert. Um die gewünschten Temperaturen zu erreichen, wurden die Ansätze in verschiedenen Räumen oder Brutschränken inkubiert (s. dazu Tab. 2.5).

**Tab. 2.5:** Inkubationstemperaturen mit den jeweiligen Inkubationsorten

Inkubationstemperatur (°C)	Inkubationsort
5 ( $\pm 1$ )	Kühlraum
10 ( $\pm 1$ )	kühlbarer Brutschrank <sup>a</sup>
15 ( $\pm 1$ )	kühlbarer Brutschrank <sup>a</sup>
20 bzw. 22 ( $\pm 1$ )	temperiertes Labor bzw. RT
23 ( $\pm 1$ )	RT
30 ( $\pm 1$ )	Brutschrank <sup>b</sup>
35 ( $\pm 1$ )	Brutschrank <sup>b</sup> bzw. Schüttelwasserbad
40	Schüttelwasserbad
45	Schüttelwasserbad

<sup>a</sup> Heraeus Instruments, BK-600; <sup>b</sup> New Brunswick Scientific Sm 7850

Die Versuche wurden in sterilen Reagenzgläsern angesetzt und auf einem Rotationsschüttler (s. Kap. 2.4.4.1) oder leicht schräg gelagert in einem Schüttelwasserbad inkubiert (s. Tab 2.5). Die O. D. wurde direkt im Reagenzglas in einem Novaspec II Photometer (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen die Blindprobe (unbeimpftes ASN<sub>III</sub>-Medium) gemessen. Um Messfehler durch eventuelle Verschmutzungen oder Beschädigungen (Kratzspuren) der Reagenzgläser möglichst gering zu halten, wurde die Ausrichtung der Reagenzgläser bei der ersten Messung markiert. Außerdem wurde vor jeder Versuchsreihe zunächst die O. D. der einzelnen im Versuch eingesetzten Reagenzgläser mit unbeimpftem Medium gemessen und die Werte aus der Versuchsreihe mit diesen korrigiert. Das heißt, bei negativer O. D. des unbeimpften Reagenzglases wurde der Wert zu der in der Versuchsreihe gemessenen O. D. addiert und bei anfänglich positiver O. D. subtrahiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Reagenzgläser sehr unterschiedlich dick sind und somit auch verschiedene „Eigen-O. D.-Werte“ erreichen.

### 2.6.2 pH-Wert-Optimum

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde das ASN<sub>III</sub>-Medium mit Hilfe einer 1 M NaOH bzw. einer 1 M HCl auf verschiedene pH-Werte (pH 4 bis 10, Erhöhung des pH um jeweils eine pH-Einheit) eingestellt. Von dem jeweiligen Medium wurden je 5 ml in ein Reagenzglas gegeben, dieses aus einer Vorkultur mit unverändertem ASN<sub>III</sub>-Medium (pH 7,8-8,2) beimpft und bei RT ( $23 \pm 1$  °C) auf einem Rotationsschüttler (s. Kap. 2.4.4.1) inkubiert. Die Messung der O. D. wurde, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Nach Beendigung der O. D.-Messungen wurde der pH-Wert kontrolliert.

Höhere pH-Werte wurden mit dem ungepufferten Medium nicht eingestellt, da durch den Ausfall von z. B. Calciumcarbonat eine Trübung des Mediums hervorgerufen wurde, so dass die O. D.-Messung negativ beeinflusst worden wäre. Bei pH 10 traten diese Reaktionen zwar ebenfalls auf, waren aber so schwach, dass die Messungen trotzdem durchgeführt wurden.

### 2.6.3 Salinitäts-Optimum

Für die Ermittlung der NaCl-Toleranz der untersuchten Bakterien wurde das ASN<sub>III</sub>-Medium mit NaCl-Gehalten zwischen 0 und 20% in 2%-Schritten hergestellt. Auch in diesem Versuch wurden jeweils 5 ml Medium in Reagenzgläser gefüllt. Zur Beimpfung aus einer Vorkultur mit unverändertem ASN<sub>III</sub>-Medium (Salinität 3,4%) und zur Inkubation siehe Kapitel 2.4.4.1. Die Trübungsmessung wurde wiederum im Novaspec II Photometer (Pharmacia), wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, durchgeführt.

### 2.6.4 Kohlenstoffverwertung

Um das Substratspektrum der einzelnen Isolate herauszufinden, wurden einzelne Kohlenstoffquellen in verschiedenen Konzentrationen getestet und außerdem zusätzlich verschiedene kommerziell erwerbliche Testsysteme (BIOLOG GN sowie API 50 CH) mit jedem Isolat angewendet.

#### 2.6.4.1 Kohlenstoffquellen

Um die durch das jeweilige Isolat verwertbaren Kohlenstoffquellen ermitteln zu können, wurde das ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) ohne Eisenammoniumcitrat und ohne Hefeextrakt angesetzt. Die meisten der Substrate wurden nur in einer Endkonzentration von 1 mM bzw. 5 mM, Cellulose und Tween-20 dagegen 0,05%ig (w/v) zugesetzt. Von den in der folgenden Aufzählung *kursiv* gedruckten Substraten wurde in einer weiteren Versuchsreihe jeweils so viel zugegeben, dass sich 0,03, 0,06 oder 0,1% Kohlenstoff (w/v) im Medium befanden. Oligotrophe Stämme sollten auch in den nährstoffärmeren Medien gut wachsen können.

---

organische Säuren: (als Na-Salze)	Acetat, Citrat, <i>Propionat</i>
Zucker:	Fructose, Glucose, <i>Glucose</i> , Mannose
Alkohol:	<i>Glycerol</i>
Aminosäure:	L-Alanin
Disaccharide:	Cellobiose, Lactose, Saccharose, Maltose
Polysaccharid:	Cellulose
Polymer:	Tween-20

Die Organismen wurden in Vorkulturen unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) an die neuen Substrate adaptiert. Über maximal zwei bis drei Wochen wurde das Wachstum beobachtet. Die Versuchskulturen wurden beimpft (s. Kap. 2.4.4.1), sobald Wachstum erkennbar war (Trübung des Mediums) und bei RT oder 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde in Abhängigkeit von der Zeit anhand der Zunahme in der O. D., die gegen unbeimpftes Medium im Novaspec II Photometer (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde (s. Kap. 2.6.1), über etwa 14 Tage verfolgt.

#### 2.6.4.2 BIOLOG-System

Die BIOLOG-Mikrotiterplatten (GN2 Microplates<sup>TM</sup>, Biolog, Hayward, USA) erlauben es, 95 verschiedene Kohlenstoffquellen parallel für ein Isolat zu testen. Als Substrate werden Kohlenhydrate, Carbonsäuren, Amide, Ester, Aminosäuren, Peptide, Amine, Alkohole, Aromaten, halogenierte, phosphor- und schwefelhaltige Substanzen sowie Polymere angeboten, die in dehydrierter Form zusammen mit einem gering konzentrierten Nährmedium und einem Redoxindikator (Tetrazolium) in den Wells vorliegen. Der zunächst farblose Redoxindikator nimmt durch die Respiration der Bakterien beim Abbau der jeweiligen Kohlenstoffquelle eine violette Farbe an.

Zur Beimpfung der Testplatten wurde die Vorschrift der Herstellerfirma (Biolog-Handbuch, Release 4.0, 1999) in modifizierter Form durchgeführt. Die Isolate wurden für zwei bis sieben Tage auf R2A-Agar (Difco, Detroit, USA), der mit ASN<sub>III</sub>-Medium ohne Hefeextrakt und ohne Eisenammoniumcitrat (sonst wie in Kap. 2.3 angegeben) angesetzt (18,2 g Agar/l) und für 15 min bei 121 °C autoklaviert worden war, bei 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1) inkubiert. Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurde Zellmasse abgenommen und in 18 ml Salzlösung (23,5 g NaCl und 10,6 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O in 1 l Aqua dest., RÜGER und KRAMBECK, 1994) suspendiert. Die Trübung der Zellsuspension wurde den Herstellerangaben entsprechend mit einem Turbidimeter (Biolog,

Hayward, USA) auf eine Transmission von 49-55% eingestellt. Die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte wurden nun mit je 150 µl dieser Suspension befüllt und die Platten bei 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1) in einer feuchten Kammer inkubiert. Täglich (max. 29 Tage lang) wurden die Wells der einzelnen Platten visuell im Vergleich zum Well ohne Kohlenstoffquelle (Negativkontrolle) auf Farbumschlag kontrolliert. Ein deutlicher Farbumschlag wurde als positiv (+) und eine nur leichte Veränderung der Farbe gegenüber der Negativkontrolle als schwach positiv (±) gewertet.

Um zu untersuchen, ob die Isolate beim Abbau der Substrate ein synergistisches Verhalten zeigen, wie es bei äquatorialen Isolaten beobachtet werden konnte (BERKENHEGER et al., 2004, s. Kap. 8), wurde ein Gemisch aller Isolate einer Station (Station 49/088/2 ohne Isolat 88/2-1) auf je einer Mikrotiterplatte inkubiert. Dazu wurden die Kulturen erneut auf R2A-Agar (s. o.) angezogen und ein wenig Bakterienmaterial in Salzlösung (s. o.) suspendiert. Von allen Suspensionen wurde die O. D. bei 600 nm in einem Novaspec II Photometer (Pharmacia) gemessen und so lange mit Salzlösung verdünnt, bis alle in etwa dieselbe O. D. besaßen. Dann wurden die Isolate zu gleichen Teilen gemischt, die Transmission auf 49-55% eingestellt, die Mikrotiterplatten befüllt (s. o.) und in einer feuchten Kammer bei 27 °C für acht (Isolate der Station 49/088/2, ohne Isolat 88/2-1) bzw. 12 Tage (Isolate der Station 49/020/1) inkubiert und dabei täglich auf Wachstum kontrolliert.

#### 2.6.4.3 API 50 CH-System

Mit diesem Testsystem kann der Abbau von 49 verschiedenen Kohlenwasserstoffen getestet werden. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben in der Herstellervorschrift (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich). Die Bakterien wurden für 24-72 h auf R2A-Agar (Herstellung s. Kap. 2.6.4.2) bei 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1) angezogen. Als Suspensionsmedium diente nicht das käuflich erwerbbares, sondern ein nach LABRENZ (1999) modifiziertes Medium (s. Tab. 2.6). Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf 8,0 eingestellt.

Die Bakterienkulturen wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der R2A-Agarplatte abgenommen und in 16 ml des oben beschriebenen Mediums homogen suspendiert. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde die Suspension in die Röhrchen und Becher gefüllt und die Streifen in der Inkubationswanne bei 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1) inkubiert. Eine positive Reaktion (Verwertung der C-Quelle) wurde durch den Umschlag des Indikators (Phenolrot) von rot bis hin zu gelb

angezeigt. Die Ansätze wurden täglich kontrolliert und spätestens nach 14 Tagen bzw. sobald die Blindkontrolle die Bewertungsstufe 3 (orange) erreichte, wurde der Versuch beendet.

**Tab. 2.6:** Zusammensetzung des Suspensionsmediums für API 50 CH (modifiziert nach LABRENZ, 1999). Alle Komponenten gelöst in Aqua dest.

Mineralsalze und organische Komponenten	g/l oder ml/l
Ammoniumsulfat	2 g
Hefeextrakt	0,1 g
Phenolrot	0,18 g
HEPES	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3 H <sub>2</sub> O (8 g/l)	2,5 ml
Spurenelementelösung SL10	1 ml
7-Vitamine-Lösung	0,5 ml
NaCl	25 g
MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	2 g
KCl	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	3,5 g
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02 g

#### 2.6.4.4 Distanzverfahren

Eine quantitative Auskunft über die Ähnlichkeiten zwischen zwei Proben ist durch Distanzverfahren bzw. phenetische Verfahren erhältlich (SWOFFORD et al., 1996). Aus einer Datenmatrix, in der die Merkmalszustände als 1 bzw. 0 angegeben werden, wird eine Distanzmatrix berechnet. In dieser werden die Werte für die Unähnlichkeiten zwischen den untersuchten Proben vergeben. Die Distanzmatrix wiederum dient dann der Erstellung eines Phenogramms (Verwandtschaftsdiagramm). Das UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages)-Verfahren stellt die einfachste Methode für eine solche Phenogramm-Ermittlung dar (SWOFFORD et al., 1996). In diesem Verfahren werden die jeweils ähnlichsten Proben zusammengefasst, ihre Distanzen dabei gemittelt und daraus ein Baum entwickelt. Mit Hilfe des PC-Programmes PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) Version 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) erfolgen sowohl die Berechnungen als auch die Phenogrammdarstellungen.

#### 2.6.5 Enzymtests

##### 2.6.5.1 Katalase

Katalase, ein Eisenporphyrin-haltiges Enzym, ermöglicht es den Bakterien, im Stoffwechsel entstehendes und für die Zelle toxisches Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) abzufangen. Um zu testen, ob die Isolate dieses Enzym besitzen, wurden auf gut gewachsene Bakterienkulturen (ASN<sub>III</sub>-Agar,

s. Kap. 2.4.4.2) einige Tropfen einer 10%igen Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben (modifiziert nach SÜBMUTH et al., 1999). An der Entwicklung von Sauerstoff (Gasbläschen) nach der Reaktion  $2 H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalase}} 2 H_2O + O_2 \uparrow$  sind Katalase-positive Kulturen erkennbar.

#### 2.6.5.2 Oxidase

Die Cytochromoxidase, das terminale Enzym der Atmungskette, ist in den Membranen vieler Bakterien enthalten und katalysiert die Reaktion  $O_2 + 4 e^- \xrightarrow{\text{Oxidase}} 2 O^{2-}$ . Zum Nachweis der Oxidase wurden kommerzielle Teststreifen (Bactident<sup>®</sup> Oxidase-Teststreifen, Merck) verwendet. Mit einer Platindraht-Impföse wurde etwas Bakterienmaterial (ASN<sub>III</sub>-Agar, s. Kap. 2.4.4.2) auf dem Reaktionsfeld des Teststreifens zerrieben. Eine Blaufärbung des Reaktionsfeldes zeigt das Vorhandensein des Enzyms an.

#### 2.6.5.3 Cellulase

Cellulosehaltige Agarplatten (Meerwasser mit 0,1% Hefeextrakt, 1,5% Agar-Agar und 1% Cellulose) wurden strichförmig beimpft und bei 27 °C inkubiert. Eine Cellulose-Verwertung ist durch die Bildung eines klaren Hofes in dem vorher trüben Agar zu erkennen.

#### 2.6.5.4 Gelatine-Hydrolyse

Gelatine, ein aus Knochen, Sehnen und Häuten gewonnenes Gerüsteiweiß, kann von Bakterien, die bestimmte Exoenzyme besitzen, hydrolytisch gespalten und damit verflüssigt werden.

Die Agarplatten (Meerwasser mit 0,1% Hefeextrakt, 2% Agar-Agar und 0,4% Gelatine) wurden strichförmig beimpft und bei 27 °C bebrütet. Bei gutem Wachstum wurden die Platten mit etwa 5 ml einer gesättigten Pikrinsäurelösung in 50% Ethanol überschichtet. Bei Hydrolyse der Gelatine, war um den Impfstrich eine klare Zone erkennbar, da nicht abgebaute Gelatine mit der Pikrinsäure einen gelben Farbkomplex (Niederschlag) bildet (modifiziert nach SÜBMUTH et al., 1999).

#### 2.6.5.5 Amylase

Bakterien, die Exoamylasen besitzen, sind in der Lage, Stärke hydrolytisch abzubauen. Die nicht abgebaute Stärke in einer Agarkultur wird mit Hilfe der Jod-Stärke-Reaktion nachgewiesen.

---

Agarplatten (Meerwasser mit 0,1% Hefeextrakt, 2% Agar-Agar und 2% Stärke) wurden strichförmig beimpft und bei 27 °C bebrütet. Nachdem gutes Wachstum eingetreten war, wurden die Platten mit Lugolscher Lösung (1% Iod-Kaliumiodidlösung, Merck) überschichtet. Ein klarer Hof um den Bakterienausstrich zeigte an, dass Stärke abgebaut wurde (modifiziert nach SÜßMUTH et al., 1999).

## 2.7 Chemotaxonomie

### 2.7.1 Pigmentbestimmung bei Isolat 88/2-1

Die Fähigkeit eines Bakteriums, Farbstoffe zu bilden, ist genetisch fixiert und hat somit Merkmalscharakter. Bei den Farbstoffen kann es sich um Derivate verschiedener Stoffklassen handeln: Carotinoide, Anthocyane u. a. (SCHLEGEL, 1992).

Das Isolat 88/2-1 bildete auf ASN<sub>III</sub>-Agarplatten (s. Kap. 2.4.4.2) gelbe Kolonien aus (s. Abb. 3.20, Kap. 3.6.2) und auch im ASN<sub>III</sub>-Flüssigmedium (s. Kap. 2.4.3) waren die Kulturen leicht gelblich verfärbt. Das für die Färbung verantwortliche Pigment sollte näher untersucht werden. Mit einem Methanolextrakt wurde zunächst ein Wellenlängenscan und dann eine Carotinoid-Bestimmung mittels Reversed Phase HPLC durchgeführt (s. Kap. 2.7.1.1 ff.).

#### 2.7.1.1 Extraktion von Carotinoiden (modifiziert nach PORADA, 2000)

Zunächst wurden ca. 1,2 l einer fünf Tage alten, bei 5 °C angezogenen Kultur (ASN<sub>III</sub>-Medium, s. Kap. 2.3) des Isolates für 15 min bei 10 °C und 6.500 x g zentrifugiert (Beckman Avanti<sup>TM</sup> J-25). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je ca. 10 ml ASN<sub>III</sub>-Medium ohne Hefeextrakt und ohne Eisenammoniumcitrat resuspendiert und anschließend vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation (8.500 x g, 15 min, 10 °C) wurde das Pellet in 6 ml eiskaltem Methanol resuspendiert und auf acht ERG aliquotiert. Jedem ERG wurden zusätzlich 0,5 ml Methanol zugesetzt. Die Extraktion erfolgte bei 4 °C für 5 h im Dunkeln. Anschließend wurden die Ansätze bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (15.000 rpm, Beckman Mikrofuge E<sup>TM</sup>) zentrifugiert und die Überstände in einem mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzglas bei ca. 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Den Pellets wurden erneut 0,5 ml Methanol zugesetzt und bei 4 °C im Dunkeln über Nacht extrahiert. Am nächsten Tag wurde erneut in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (s. o.), und die Überstände wurden denen vom Vortag zugefügt.

### 2.7.1.2 Photometrische Pigmentbestimmung

Von dem unverdünnten Methanolextrakt (s. Kap. 2.7.1.1) wurde ein Wellenlängenscan (200-600 nm) mit Hilfe eines Spektrophotometers (Beckman DU640) aufgenommen. Anhand des Absorptionsspektrums sollte festgestellt werden, ob es sich bei dem Pigment um ein Carotinoid handelt. Carotinoide zeigen ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit mehreren Maxima im Bereich von etwa 400-500 nm, wobei das mittlere Maximum von einer Schulter im kurzwelligeren und einem kleineren Peak im langwelligeren Bereich flankiert wird.

### 2.7.1.3 Carotinoidbestimmung mittels Reversed Phase HPLC

Die Bestimmung der Carotinoide in dem Methanolextrakt wurde, modifiziert nach RABENSTEIN (1997), mit Hilfe eines Merck/Hitachi-HPLC-Systems durchgeführt. Über ein Rheodyne-Ventil wurden 50 µl Methanolextrakt (s. Kap. 2.7.1.1, 1:10 verdünnt) injiziert, von denen über eine Injektionsschleife 20 µl auf die Trennsäule gelangten. Die Auftrennung der Probe erfolgte über eine LiChrospher 100 RP 18-Säule (125-4, 5 µm) mit entsprechender Vorsäule (4-4). Der L-7350 LaChrom-Säulenofen sorgte für eine konstante Säulentemperatur von 35 °C. Das HPLC-System bestand weiterhin aus einer L-6220 Intelligent Pump, die die mobile Phase über einen Mixer an zwei Detektoren, einen Dioden-Array-Detektor (DAD) L-7455 und einen L-4250 UV-Vis-Detektor, weiterleitete. Der DAD nahm jede Sekunde das Absorptionsspektrum der Carotinoide im Wellenlängenbereich von 360-700 nm auf und leitete die Signale an den Computer mit D-7000 HPLC-System-Manager-Software von Merck-Hitachi weiter. Der UV-Vis-Detektor registrierte die Absorptionsspektren bei einer Wellenlänge von 450 nm und sendete seine Signale über ein D-6000A-Interface an einen Chromato-Integrator D-2000. Die mobile Phase als binärer Niederdruckgradient (s. Tab. 2.7) setzte sich aus Eluent A (75% Acetonitril, 15% Methanol und 10% Tetrahydrofuran) und Eluent B (Aqua dest., sterilfiltriert durch 0,2 µm Cellulose-Acetat-Filter von Schleicher & Schuell) zusammen.

**Tab. 2.7:** Elutionsgradient zur Auftrennung von Carotinoiden aus methanolischen Zellextrakten mittels HPLC (modifiziert nach RABENSTEIN, 1997)

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flußrate (ml/min)
0-1	85	15	1,5
1-15	85-100	15-0	1,5
15-25	100	0	1,5
25-27	100-85	0-15	1,5
27-28	85	15	1,5

Das erhaltene Absorptionsspektrum des Carotinoids wurde mit Literaturdaten (KARSTEN und GARCIA-PICHEL, 1996) sowie mit Hilfe käuflich erworbener Standards (s. Tab. 2.8) verglichen und durch eine Cochromatographie mit dem entsprechenden Standard identifiziert.

**Tab. 2.8:** Verwendete Carotinoid-Standards und deren Bezugsquelle

Carotinoid	Bezugsquelle
$\beta$ -Carotin	DHI Water & Environment (Hørsholm, Dänemark)
Astaxanthin	DHI Water & Environment (Hørsholm, Dänemark)
Canthaxanthin	DHI Water & Environment (Hørsholm, Dänemark)
Zeaxanthin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)

### 2.7.2 Bestimmung der zellulären Fettsäuren

Fettsäuren kommen hauptsächlich in der Cytoplasmamembran als Bestandteil von Phospholipiden und Lipopolysacchariden der „outer membrane“ Gram-negativer Bakterien sowie als Lipoteichonsäuren in Gram-positiven Bakterien vor (BUSSE et al., 1996). Die Zusammensetzung der Fettsäuren, d. h. die Dominanz einer einzigen Fettsäure oder eines bestimmten Fettsäuremusters, ist häufig ein charakteristisches Merkmal für eine bestimmte Bakteriengattung oder -art. Die Fettsäurezusammensetzung stellt somit ein wichtiges chemotaxonomisches Merkmal für die Einordnung und Identifizierung von Bakterien dar.

#### 2.7.2.1 Probenaufbereitung

Alle Isolate wurden für 48 h in 20-30 ml ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) bei 27 °C angezogen. Eine Ausnahme stellte das Isolat 88/2-1 dar, das vier Tage bei RT inkubiert wurde, bis sich Wachstum eingestellt hatte. Um einen Vergleich der Fettsäurezusammensetzung einzelner Isolate bei verschiedenen Temperaturen machen zu können, wurden die Isolate 88/2-4 und 88/2-7 zusätzlich noch bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. o.) für 12 Tage inkubiert, da sich erst zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Trübung des Mediums zeigte.

Die Ansätze wurden für 10 min bei 5.000 x g und 20 °C zentrifugiert (Beckman Avanti™ J-25), mit wenig Medium resuspendiert und jeweils in ein ERG überführt. Anschließend wurden sie für 5 min bei max. Geschwindigkeit (13.000 rpm) und RT in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Nach der Entfernung der Überstände wurde das Feuchtgewicht der Pellets bestimmt. Die erhaltenen Mengen an Zellmaterial lagen zwischen 20 und 70 mg Feuchtgewicht. Bis zur Fettsäurenbestimmung wurden die ERG bei -18 °C gelagert. Die weitere Bearbeitung der

Proben wurde durch Herrn Dr. A. Rabenstein (Materialprüfanstalt, Bremen) durchgeführt. Der prinzipielle Ablauf der Fettsäureanalyse ist im Kapitel 2.7.2.2 (RABENSTEIN, persönliche Mitteilung) aufgeführt.

### 2.7.2.2 Herstellung der Fettsäuremethylester und deren Bestimmung mittels GC

Zunächst müssen die Zellmembranen der zu untersuchenden Organismen aufgebrochen und die jeweiligen Zelllipide verseift werden. Dazu wurde das geerntete Zellmaterial zusammen mit 1 ml 5%iger NaOH in 50%igem Methanol zum Aufschluss in 3 ml-Glashochdruckgefäße gegeben, auf einem Vortexer suspendiert und anschließend bei 100 °C für 1 h inkubiert.

Zur Ausfällung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen wurden der auf RT abgekühlten Suspension 1,5 ml 25%ige HCl in Methanol zugegeben. Beides wurde auf dem Vortexer gut durchmischt und anschließend für 20 min bei 80 °C inkubiert. Hierbei reagieren außerdem die gelösten Fettsäuren mit dem Methanol zu Fettsäuremethylestern (FAME).

Nachdem die Lösung erneut auf RT abgekühlt war, wurden 0,5 ml Hexan zugegeben und erneut auf einem Vortexer gut durchmischt. Von den beiden auftretenden Phasen wurde die obere, aus Hexan bestehende Phase in ein ERG überführt. Wenn die Trennung der beiden Phasen nicht vollständig gelang, musste ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (5.000 rpm, 5 min) eingeschoben werden.

Die abgetrennte Hexanphase wurde nun mit 1 ml 60 mM Phosphatpuffer, pH 7, (9,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  plus 11,9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  auf 1.000 ml Aqua dest.) gemischt und gut geschüttelt. Diese nun gereinigte Phase wurde in Microvials überführt und entweder sofort mittels Gaschromatograph analysiert oder bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Die Analyse der FAME erfolgte an einem Gaschromatographen (Shimadzu GC 17A) mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID). Es wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  Probenvolumen injiziert und über eine J&W Scientific DB-5-Säule (32 m x 0,32 mm, 1  $\mu$ ) aufgetrennt, an der ein Temperaturgradient (150-250 °C) angelegt war. Die Injektor- und Detektortemperatur betrug jeweils 250 °C. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 30 ml/min. Die Identifikation des jeweiligen FAME erfolgte mit Hilfe einer Standardmischung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

### 2.7.2.3 Nomenklatur der Fettsäuren

Die Wichtigkeit dieser Methode für die Identifizierung von Bakterien basiert auf dem großen Unterschied in der Struktur dieser Moleküle (BUSSE et al., 1996): a) Variation in der Länge/Anzahl der C-Atome, wobei hauptsächlich Fettsäuren mit einer Länge zwischen acht und 20 C-Atomen gefunden werden, b) gesättigte oder ungesättigte (meist einfach ungesättigte) Fettsäuren, c) verzweigte (iso- oder anteiso-Verbindung) oder methylierte Fettsäuren, d) Fettsäuren mit Cyclopropanring und e) mit Hydroxylgruppen. Zur Namensgebung der Fettsäuren gibt es vier verschiedene Systeme. Zwei der Systeme bezeichnen die Fettsäuren mit einem kompletten Namen (Bezeichnung nach IUPAC und Trivialname), die beiden anderen verwenden Abkürzungen. Tabelle 2.9 beinhaltet die Kurzbezeichnungen, die systematischen Bezeichnungen sowie die Trivialnamen der Fettsäuren aller in der vorliegenden Arbeit identifizierten Fettsäuremethylester (s. Kap. 3.6.1).

### 2.7.2.4 Distanzverfahren

Eine Bestimmung der FAME wurde mit allen elf Isolaten durchgeführt. Das Isolat 88/2-1 wurde unter Berücksichtigung der im Vergleich zu den anderen Isolaten veränderten Inkubationsbedingungen (s. Kap. 2.7.2.1) mit in die Auswertung einbezogen. Als Merkmalszustände galten hier „FAME vorhanden“ (1) bzw. „FAME nicht vorhanden“ (0). Zur Berechnung und Phenogrammdarstellung siehe Kapitel 2.6.4.4.

**Tab. 2.9:** Fettsäureklassen, Kurzbezeichnungen, systematische Bezeichnungen sowie Trivialnamen der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Fettsäuremethylester (modifiziert nach BUSSE et al., 1996)

Fettsäureklasse/ Kurzbezeichnung <sup>a</sup>	Systematische Bezeichnung der Fettsäure als Methylester (ME)	Trivialname <sup>b</sup> der Fettsäure
<b>gesättigte Fettsäuren</b>		
C11:0	Undecanoat-ME	
C12:0	Dodecanoat-ME	Laurinsäure
C13:0	Tridecanoat-ME	
C14:0	Tetradecanoat-ME	Myristinsäure
C15:0	Pentadecanoat-ME	
C16:0	Hexadecanoat-ME	Palmitinsäure
C17:0	Heptadecanoat-ME	Margarinsäure
C18:0	Octadecanoat-ME	Stearinsäure
C19:0	Nonadecanoat-ME	
<b>ungesättigte Fettsäuren</b>		
C16:1 c 9	cis-9-Hexadecenoat-ME	Palmitoleinsäure
C18:1 c 9	cis-9-Octadecenoat-ME	Ölsäure
C18:1 t 9 <sup>c</sup>	trans-9-Octadecenoat-ME	
C18:1 c 11 <sup>c</sup>	cis-11-Octadecenoat-ME	cis-Vaccensäure
C18:2 c 9,12	cis-9,12-Octadecadienoat-ME	Linolsäure
<b>verzweigte Fettsäuren</b>		
CH3-C14:0 / i C15:0	13-Methyltetradecanoat-ME	
CH3-C14:0 / a C15:0	12-Methyltetradecanoat-ME	
CH3-C15:0 / i C16:0	14-Methylpentadecanoat-ME	Iso-Palmitinsäure
CH3-C16:0 / i C17:0	15-Methylhexadecanoat-ME	15-Methyl-Palmitinsäure
<b>Fettsäuren mit Hydroxylgruppe</b>		
3OH-C12:0	3-Hydroxydodecanoat-ME	3-Hydroxylaurinsäure
2OH-C14:0	2-Hydroxytetradecanoat-ME	2-Hydroxymyristinsäure
3OH-C14:0	3-Hydroxytetradecanoat-ME	3-Hydroxymyristinsäure

<sup>a</sup> Gesamtzahl der Kohlenstoffatome (C):Anzahl der Doppelbindungen; c (cis) bzw. t (trans) gibt die Stellung der Doppelbindung wieder, die Bezeichnung i (iso) bzw. a (anteiso) beschreibt die Art der Verzweigung und die Zahl vor der Hydroxylgruppe gibt deren Position an.

<sup>b</sup> wo vorhanden

<sup>c</sup> Diese beiden FAME können aufgrund der Methode (s. Kap. 2.7.2.2) nur gemeinsam identifiziert werden. Sie werden daher weiterhin als C18:1 t 9 + c 11 aufgeführt, aber als zwei FAME gezählt.

## 2.8 Molekularbiologische Untersuchungen

Da eine taxonomische Einordnung anhand morphologischer und physiologischer Charakteristika bei Eubakterien in der Regel schwierig ist, wurden mit den Isolaten verschiedene molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

---

### 2.8.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Zur ersten gröberen Einordnung der Isolate in bestimmte bakterielle Gruppen wurde die Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Mit dieser Methode, die auf der Bindung fluoreszenzmarkierter Oligonucleotid-Sonden an komplementäre 16S rRNA beruht, lassen sich besonders gut stoffwechselaktive Zellen nachweisen, da diese einen hohen Anteil an rRNA aufweisen und daher ein deutliches Hybridisierungssignal geben.

Für die Hybridisierung wurden 48 h alte Reinkulturen (ASN<sub>III</sub>-Agarplatte, s. Kap. 2.4.4.2) eingesetzt, von denen jeweils eine Impföse Bakterienmaterial in 1 ml 0,85%iger NaCl-Lösung gegeben und auf dem Vortexer homogen suspendiert wurde. Zur Fixierung wurden 100 µl 37%iges sterilfiltriertes Formaldehyd zugegeben. Nach einer Fixierungsdauer von 30 min wurden 2 µl der Bakteriensuspension in jeweils eine Vertiefung des Objektträgers gegeben. Trocknung, Dehydratisierung und Nachfixierung wurden wie bei HEUCHERT et al. (2004, s. Kap. 8) beschrieben durchgeführt. Auf jedes Feld der Objektträger wurden 9 µl Hybridisierungspuffer (s. HEUCHERT et al., 2004) mit 1 µl der jeweiligen fluoreszenzmarkierten (CY3) Oligonucleotid-Sonde (50 ng/µl) gegeben und gemischt. Bei der BET42a-Sonde wurden nur 8 µl Hybridisierungspuffer zugegeben, da zusätzlich noch 1 µl des unmarkierten GAM42a-Oligonucleotids (GAM42a-Competitor) hinzugefügt werden musste. Ebenso verhielt es sich bei der GAM42a-Sonde. Hier musste noch 1 µl unmarkiertes BET42a-Oligonucleotid (BET42a-Competitor) zugegeben werden. Die eingesetzten Oligonucleotid-Sonden, ihre Sequenz und ihre Spezifität sind Tabelle 2.10 zu entnehmen.

Die Objektträger wurden jeweils in ein verschließbares Greiner-Röhrchen (50 ml) gelegt, das mit Zellstoff ausgelegt war, der wiederum mit 1,9 ml Hybridisierungspuffer getränkt war. Die Hybridisierung und das Waschen erfolgten wie bei GLÖCKNER et al. (1996) beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Hybridisierung zunächst durch das Abspülen der Objektträger mit 1 ml 48 °C warmem Waschpuffer (Zusammensetzung s. GLÖCKNER et al., 1996) beendet wurde. Im Anschluss an das Waschen wurden die Objektträger vorsichtig mit sterilfiltriertem (0,2 µm Polycarbonatfilter, Millipore) Aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

Nach der Gegenfärbung (s. HEUCHERT et al., 2004) wurde der Objektträger in einem Gemisch aus fünf Teilen Citifluor (Citifluor, Ltd., Canterbury, UK) und einem Teil Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) eingebettet und für etwa 10 min im Dunkeln inkubiert, um ein zu schnelles Ausbleichen des Präparates während der Mikroskopie zu vermeiden. Die Aus-

wertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiolab) mit den Standard-Filtersets für DAPI (Filtersatz 02, Zeiss) und CY3 (Chroma HQ, AHF Analystechnik).

**Tab. 2.10:** Eingesetzte Oligonucleotid-Sonden, deren Sequenz und Spezifität

Sonde	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Literatur
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bacteria	AMANN et al., 1990
ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Archaea	STAHL und AMANN, 1991
ALF968	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	<i>α-Proteobacteria</i>	NEEF, 1997
BET42a <sup>a</sup>	GCC TTC CCA CTT CGT TT	<i>β-Proteobacteria</i>	MANZ et al., 1992
GAM42a <sup>a</sup>	GCC TTC CCA CAT CGT TT	<i>γ-Proteobacteria</i>	MANZ et al., 1992
CF319a	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	<i>Cytophaga-Flavobacteria</i>	MANZ et al., 1996

<sup>a</sup> benötigen einen Competitor (Erklärung siehe Text)

### 2.8.2 Bestimmung des Guanin + Cytosin (G+C)-Gehaltes der DNA

Der molare prozentuale Anteil der Basen Guanin und Cytosin an den Gesamtbasen dient der ersten Charakterisierung von Bakterien-DNA (SÜBMUTH et al., 1999). Es wird vermutet, dass sich der G+C-Gehalt der DNA eines Organismus nicht ändert. Ein großer Unterschied im G+C-Gehalt zweier Organismen weist darauf hin, dass diese nicht eng miteinander verwandt sind. Wohingegen eine Übereinstimmung im G+C-Gehalt nicht automatisch bedeutet, dass sie eng verwandt sind (JOHNSON, 1994). Viele verschiedene Gattungen haben einen ähnlichen G+C-Gehalt. Bei den Gattungen *Alcaligenes*, *Paracoccus* und *Pseudomonas* und noch einigen anderen mehr liegt er z. B. zwischen 60 und 70% (BUSSE et al., 1996). Bei der Identifizierung von Bakterien spielt diese Methode daher keine große Rolle. Hierfür müssen andere Methoden (z. B. DNA-DNA-Hybridisierung) herangezogen werden.

Zwei häufig angewendete Methoden zur Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA sind zum einen die photometrische Bestimmung des  $T_m$  und zum anderen die Bestimmung mittels HPLC. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden angewendet (s. Kap. 2.8.2.3 und 2.8.2.4). Die DNA-Isolierung (s. Kap. 2.8.2.1) sowie die Konzentrationsbestimmung der DNA (s. Kap. 2.8.2.2) waren für beide Methoden identisch.

#### 2.8.2.1 Extraktion der genomischen DNA

Die Extraktion der DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN<sup>®</sup> Genomic-tip 100/G (Qiagen, Hilden) modifiziert nach den Herstellerangaben (Handbuch, September 1997) durchgeführt. Zunächst wurde der Titer der unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) angezogenen Bakterienkulturen mit Hilfe einer Thoma-Kammer ausgezählt. Es wurden maximal  $2 \times 10^{10}$  Zellen eingesetzt. Die

Probe wurde dann bei 5.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Beckman Avanti™ J-25), der Überstand möglichst vollständig dekantiert und das Zellsediment im Zentrifugationsröhrchen auf Eis gelagert.

Zum Lysieren der Zellen und zur Denaturierung bzw. Degradierung eines Großteils der RNA sowie löslicher Zellproteine wurden 70 µl einer RNase A-Stammlösung (Serva, 88 U/mg) zu 3,5 ml Puffer B1<sup>2</sup> gegeben. Die RNase A-Stammlösung wurde folgendermaßen angesetzt: 10 mg RNase A/ml Aqua dest. wurden für 10 min bei 100 °C gekocht und in 50% Glycerol bei -18 °C gelagert. Die sedimentierten Zellen wurden in dem Gemisch aus Puffer und RNase A vollständig resuspendiert. Dann wurden 80 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml; Fluka) und 100 µl Proteinase K-Lösung (33,3 U/mg; Amresco, Solon, USA) zugegeben und nach kurzem Schütteln bei 37 °C für wenigstens 30 min inkubiert. Die Denaturierung der Proteine mit Puffer B2<sup>2</sup>, die Reinigung der DNA über die DEAE-Säule (Qiagen, Hilden) sowie deren vorherige Äquilibrierung erfolgten nach Herstellerangaben (Handbuch September 1997, Qiagen).

Bei der Eluierung wurde die DNA in einem Reagenzglas aufgefangen und anschließend durch Hinzufügen von 3,5 ml Isopropanol und gutem Mischen präzipitiert. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde die DNA herausgezogen und in eiskaltem 70%igem Ethanol zur Entfernung der restlichen Salze und des Isopropanols sowie zu ihrer vollständigen Dehydrierung gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die DNA in 0,5 ml 0,1 x SSC (0,015 M NaCl und 0,0015 M Natriumcitrat) gegeben und bei -18 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Da der  $T_m$ -Wert, wie alle DNA-Präparationen, durch die Ionenkonzentration der verwendeten Puffer stark beeinflusst wird, ist es wichtig, dass sowohl Proben- als auch Referenz-DNA in einem Puffer mit gleichem Salzgehalt gemessen werden (JOHNSON, 1994).

### 2.8.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe eines Beckman DU 640 Spektrophotometers wurde die Konzentration der isolierten DNA bestimmt. Dazu wurden 250 µl der in 0,1 x SSC gelösten DNA in eine Quarzküvette (Beckman  $T_m$  Cuvette, 1 cm Schichtdicke) pipettiert. Anschließend wurde ein Spektrum im Bereich von 200-320 nm in dem o. a. Photometer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wur-

---

<sup>2</sup> Zusammensetzung nach Angaben im Handbuch (Qiagen, September 1997)

de rechnerisch ermittelt. Eine Absorption von 1 (1 cm Schichtdicke der Küvette) bei 260 nm ( $A_{260}$ ) entspricht 50  $\mu\text{g}$  dsDNA/ml.

Mit Hilfe des Verhältnisses von  $A_{260}/A_{280}$  kann eine Aussage über die Reinheit der DNA getroffen werden. Idealerweise sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein kleinerer Wert zeigt eine Verunreinigung durch Proteine an und ein größerer Wert deutet auf die Gegenwart von RNA hin (MOORE et al., 1999). Die Autoren schlagen außerdem das Verhältnis von  $A_{230}/A_{260}$  als weiteren Indikator einer Kontamination vor. Hier sollte der Wert zwischen 0,3 und 0,9 liegen, wobei größere Werte auf die Gegenwart von Polysacchariden hindeuten. Zur Überprüfung der Reinheit wurden in der vorliegenden Arbeit beide Verhältnisse betrachtet (s. Kap. 3.7.1).

### 2.8.2.3 Thermische Denaturierung der DNA (Bestimmung des $T_m$ )

Für die Bestimmung des  $T_m$  wurde, modifiziert nach SLY et al. (1986), eine Schmelzkurve der DNA im Beckman DU 640 Spektrophotometer aufgenommen. Es wurden 12,5 und 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNA für die thermische Denaturierung eingesetzt. In eine Quarzküvette wurden 250  $\mu\text{l}$  DNA (in 0,1 x SSC) pipettiert und 30 min unter Vakuum in einem Exsikkator entgast. Im Photometer wurde dann die DNA langsam erhitzt (50-95  $^{\circ}\text{C}$ ; 0,5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  Temperaturerhöhung<sup>3</sup>) und die Extinktionsänderung bei 260 nm verfolgt. Der für die jeweilige DNA geltende  $T_m$  wurde vom Photometerprogramm berechnet. Zum Teil, wenn der Schmelzkurvenverlauf nicht eindeutig und damit  $T_m$  vom Programm nicht berechenbar war, wurden die erhaltenen Extinktionswerte gegen die Temperatur aufgetragen und aus der Graphik die Schmelztemperatur der DNA ( $T_m$ ) bestimmt, die etwa bei der halbmaximalen Extinktion ( $1/2 \Delta T$ ) liegt.

Mit Hilfe von  $T_m$  ist der G+C-Gehalt (mol%) berechenbar (MARMUR und DOTY, 1961), wenn bei jeder Messung *E. coli* (hier Stamm K12) als Vergleichswert mitgemessen wird:

$$\%GC = \frac{\{T_m \text{ Isolat} + (90,5 - T_m \text{ E. coli})\} - 69,3}{0,41}$$

%GC: Mol% Gehalt der DNA an Guanin und Cytosin  
 $T_m$ : Schmelzpunkt der DNA

<sup>3</sup> weitere Einstellung des Programms zur  $T_m$ -Bestimmung: Verzögerung 2 min, Read intervall 0,5  $^{\circ}\text{C}$

#### 2.8.2.4 Bestimmung des G+C-Gehaltes mittels HPLC

Zusätzlich zur Bestimmung des DNA-Schmelzpunktes ( $T_m$ , s. Kap. 2.8.2.3) wurde der G+C-Gehalt der DNA weitestgehend nach der Methode von MESBAH et al. (1989) mit Hilfe der HPLC ermittelt. Die anschließende Berechnung des G+C-Gehaltes erfolgte nach folgender Formel (Herleitung s. MESBAH et al., 1989):

$$\text{mol\% G+C} = (xG + xC)/(xG + xC + xA + xT) \times 100 \quad (x = \text{area counts})$$

##### 2.8.2.4.1 Abbau der DNA

Die in 0,1 x SSC aufgenommene DNA (s. Kap. 2.8.2.1) wurde mit Aqua dest. zunächst 1:10 verdünnt, damit sie in 0,01 x SSC vorlag. Dadurch verringerte sich ihre Konzentration auf 0,29-0,49  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ . Nur Isolat 88/2-7 wies eine Konzentration von 2,8  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$  auf, da dessen DNA bei der Extraktion direkt in 0,01 x SSC aufgenommen wurde. Als Vergleich diente *Lambda*-Phagen-DNA (2  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$  0,01 x SSC; aus *E. coli* GM119, nicht methyliert, Sigma-Aldrich). Die jeweils 25  $\mu\text{l}$  DNA wurden in ein ERG gegeben und wie bei MESBAH et al. (1989) beschrieben weiterbehandelt. Nach Zugabe des Glycin-NaOH-Puffers (pH 10,4) und der alkalischen Phosphatase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden die Ansätze über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie dann für 4 min bei 12.500 x g zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico), der Überstand in ein neues ERG überführt und bei -18 °C bis zur Messung in der HPLC gelagert.

##### 2.8.2.4.2 HPLC-Messung

Die Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA erfolgte als Doppelbestimmung mit einem Merck/Hitachi-HPLC-System. Die Probenaufnahme erfolgte über einen AS-2000A Autosampler, der jeweils 20  $\mu\text{l}$  Probe in das System einbrachte. Die Auftrennung der Probe erfolgte über eine LiChrospher 100 RP 18-Säule (125-4, 5  $\mu\text{m}$ ) mit entsprechender Vorsäule (4-4). Der L-7350 LaChrom-Säulenofen sorgte für eine konstante Säulentemperatur von 37 °C. Das HPLC-System bestand weiterhin aus einer L-6220 Intelligent Pump, die die mobile Phase an einen L-4250 UV-Vis-Detektor weiterleitete. Die Detektion erfolgte bei 254 nm und die Signale wurden über ein D-6000A-Interface an einen Chromato-Integrator D-2000 weitergeleitet. Die Proben wurden isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml/min durch den Eluenten (12% Methanol mit 20 mM Triethylamin-Phosphat; sterilfiltriert durch 0,45  $\mu\text{m}$  Cellulose-Acetat-Filter, Schleicher & Schuell) getrennt.

---

### 2.8.3 Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

Die ARDRA ist eine effiziente Methode, um Bakterien taxonomisch auf Gattungs- und Spezies-Ebene einordnen zu können. Bei dieser Methode wird das 16S rRNA-Gen amplifiziert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Fragmente werden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt (GURTLENER et al., 1991). Eine Einordnung der Stämme in so genannte ARDRA-Gruppen geschieht über einen Vergleich der verschiedenen Bandenmuster, die meist aus weniger als 10 Fragmenten bestehen (VANECHOUTTE et al., 1992) und sich innerhalb der Spezies und Subspezies nur wenig unterscheiden. Je mehr Fragmente eine identische Laufgeschwindigkeit zeigen, desto größer ist der Verwandtschaftsgrad der untersuchten Organismen. Diese Methode wird häufig genutzt, um eine Vorauswahl für zeit- und kostenintensivere Untersuchungen (z. B. Sequenzierungen) zu treffen.

#### 2.8.3.1 Amplifikation der 16S rRNA

Zur Amplifikation der 16S rRNA wurde ein Aliquot der bereits extrahierten DNA der jeweiligen Isolate verwendet (s. Kap. 2.8.2.1). Als Primer für die Anfangssequenz wurde 10-30F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') und für die Endsequenz 1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCARCC-3') eingesetzt. Beide Primer hatten sich bereits bei den von HEUCHERT (1999) untersuchten Antarktisisolaten bewährt.

Ein Amplifikationsansatz bestand aus etwa 25-30 ng genomischer DNA, je 0,4 µM PCR-Primer (s. o.), 200 µM dNTP-Mix, 4 µl BSA (2 mg/ml), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10x REDTaq PCR Reaktionspuffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 2 U Taq-Polymerase (REDTaq™, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Aqua dest. ad 50 µl Endvolumen. Nach dem Hot-Start wurde dem Mix aus Primern, dNTP's, BSA, MgCl<sub>2</sub>, Puffer und DNA, der mit Paraffinöl als Verdunstungsschutz überschichtet war, die Taq-Polymerase zugefügt. Als Blindprobe wurde eine Negativkontrolle ohne DNA eingesetzt.

Die PCR wurde mit folgendem Programm in einem Biometra Personal Cycler™ durchgeführt. Nach einem „Hot-Start“ (95 °C für 5 min) und einer Abkühlung auf 85 °C folgten 30 gleichartige Temperaturzyklen, die aus einem Denaturierungsschritt (93 °C für 30 s), einer Primer-Anlagerung (Annealing, bei 52 °C für 30 s) und einer Kettenverlängerung (72 °C für 60 s) bestanden. Nach Beendigung der 30 Zyklen erfolgte eine Schlusspolymerisierung für 5 min bei 72 °C mit anschließender Abkühlung auf RT.

### 2.8.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR (das 16S rDNA-Amplifikat sollte bei 1,5 kb eine kräftige Bande aufweisen) wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1%iges Agarosegel (Ultra Pure Agarose, GIBCO BRL) in 1 x TBE-Puffer (10 x TBE-Puffer, pH 8,2: 0,89 M Tris, 0,89 M Bor-säure und 0,02 M Na<sub>2</sub>EDTA) hergestellt, in eine Gelform gegossen, mit 1 x TBE-Puffer bedeckt und mit einem Aliquot der PCR-Produkte beladen.

Zur qualitativen Bewertung der DNA-Proben wurden für den optischen Vergleich 5 µl GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix (0,1 mg DNA/ml; MBI Fermentas), versehen mit 7 µl Aqua dest., aufgetragen. Die Proben (5 µl Amplifikat) wurden vor dem Auftragen ebenfalls mit 5 µl Aqua dest. und 2 µl 6x Slotmarker (2,5 mg/ml Bromphenolblau, 100 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM EDTA, pH 8, 120 mM NaCl, 50% Glycerol) versetzt und anschließend in die Proben-taschen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei RT in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Biometra) bei 100 V und 75 mA für etwa 30 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in 0,1%igem Ethidiumbromid (in 1 x TBE) für 15-30 min gefärbt und mit Hilfe eines UV-Transilluminators (366 nm) und einer Video-Print-Anlage (Easy Image Plus Rev 4.15 (C), Herolab) dokumentiert.

### 2.8.3.3 DNA-Restriktion

Das Reaktionsvolumen bei einem Restriktionsansatz enthielt 5 µl Amplifikat, 0,3 µl Restriktionsenzym (4-Basen cutter; 10 U/µl, s. Tab. 2.11, alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl Puffer (s. Tab. 2.11, alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und Aqua dest. ad 10 µl Endvolumen. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 2.8.3.2 beschrieben, mit der Ausnahme, dass ein 2%iges Agarose-Gel verwendet wurde. Der DNA-Ladder-Mix (10 µl) wurde mit 2 µl Aqua dest. und der Restriktionsansatz (10 µl) mit 2 µl 6x Slotmarker versetzt und beides anschließend in die Proben-taschen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei RT fast ausschließlich in einer Biometra-Elektrophoresekammer bei 60-87 V und 75 mA für 79-130 min durchgeführt. Nur nach der Restriktion mit *Hin* 6I (s. Tab. 2.11) fand die Elektrophorese bei 46 V und 80 mA für 125 min in einer Biorad-Elektrophoresekammer statt (Power Pac 300). Die Färbung der Gele und die Dokumentation wurden, wie in Kapitel 2.8.3.2 beschrieben, durchgeführt.

**Tab. 2.11:** Restriktionsenzyme<sup>a</sup>, deren Schnittstelle und die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer<sup>a</sup>

Restriktionsenzym <sup>b</sup>	Schnittstelle (5'-3')	Puffer
<i>Alu</i> I ( <i>Alu</i> I)	AG↓CT	33 mM Tris-Acetat (pH 7,9 bei 37 °C), 10 mM Magnesium-Acetat, 66 mM Kalium-Acetat, 0,1 mg/ml BSA
<i>Hin</i> 6I	G↓CGC	
<i>Hpa</i> II ( <i>Hpa</i> II)	C↓CGG	
<i>Bsh</i> 1236I ( <i>Fnu</i> DII)	CG↓CG	10 mM Tris-HCl (pH 8,5 bei 37 °C), 10 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 0,1 mg/ml BSA
<i>Bsu</i> RI ( <i>Hae</i> III)	GG↓CC	
<i>Mbo</i> I ( <i>Mbo</i> I)	↓GATC	

<sup>a</sup> alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot; <sup>b</sup> in Klammern der Name des Prototyps

Mit den Enzymen *Alu* I, *Hin* 6I und *Hpa* II wurde eine DNA-Restriktion bei allen Isolaten durchgeführt, die weiteren drei Enzyme (*Bsh* 1236I, *Bsu* RI und *Mbo* I) wurden nur bei den Isolaten angewendet, die bei der Restriktion mit den ersten drei Enzymen keine Unterschiede in ihrem Bandenmuster aufwiesen (s. Kap. 3.1).

#### 2.8.4 Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Die Kombination von PCR (Polymerase Chain Reaction) mit mehr oder weniger willkürlich gewählten 10-mer-Oligonucleotid-Primern, die einen hohen G+C-Anteil aufweisen und zufallsbedingt an polymorphe DNA binden, ist eine Methode zur schnellen und sensitiven Beschreibung von Bakterienstämmen (NEILAN, 1995; BUSSE et al., 1996; MÜLLER, 2001). Die RAPD-Methode gibt keine Informationen über die zugrunde liegende DNA-Sequenz. Die zufällige Amplifikation unbekannter Sequenzen führt zu einem spezifischen, reproduzierbaren DNA-Bandenmuster („Fingerprint“), mit dem taxonomische Untersuchungen sowohl auf Genus-Ebene als auch auf Art- und Stamm-Niveau durchgeführt werden können (NEILAN, 1995). In dieser Arbeit wurden zwei Zufalls-10-mer-Oligonucleotid-Primer eingesetzt. Bei der durchgeführten Methode handelt es sich somit um eine Multiplex-RAPD-PCR, die eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

Für die RAPD-PCR wurde die gleiche extrahierte DNA verwendet, die auch schon für die Bestimmung der G+C-Gehalte (s. Kap. 2.8.2.1) herangezogen worden war. Die Methode der RAPD-PCR ist bei NEILAN (1995) beschrieben. Als Primer wurden CRA22 und CRA23 (MWG-Biotech, s. Tab. 2.12) genutzt, da sich diese bereits bei den von HEUCHERT (1999) untersuchten Antarktisisolaten bewährt hatten.

Das Reaktionsvolumen enthielt 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), je 0,4 µM PCR-Primer (s. Tab. 2.12), 10-100 ng genomische DNA, 10x REDTaq PCR

Reaktionspuffer (Sigma-Aldrich), 1,25 U Taq-Polymerase (REDTaq™, Sigma-Aldrich) und Aqua dest. ad 50 µl Endvolumen. Als Blindprobe wurde eine Negativkontrolle ohne DNA eingesetzt.

Als Verdunstungsschutz wurden die Ansätze mit etwas Paraffinöl überschichtet. Die Taq-Polymerase wurde dem Mix aus Primern, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Puffer und DNA erst nach dem „Hot-Start“ hinzugefügt. Die PCR wurde ebenfalls in einem Biometra Personal Cycler™ mit folgendem Programm durchgeführt: nach dem „Hot-Start“ (96 °C für 5 min) und einer Abkühlung auf 85 °C folgten 30 gleichartige Temperaturzyklen, die aus einem Denaturierungsschritt (94 °C für 20 sec), der Primer-Anlagerung (Annealing, 45 °C für 30 sec) und einer Kettenverlängerung (72 °C für 60 sec) bestanden. Nach Beendigung der 30 Zyklen folgte auch hier eine Schlusspolymerisierung für 5 min bei 72 °C mit anschließender Abkühlung auf RT.

**Tab. 2.12:** Sequenzen, Schmelztemperaturen und G+C-Gehalte der verwendeten 10-mer Primer (MWG-Biotech) für die Multiplex-RAPD-PCR (modifiziert nach NEILAN, 1995)

Primer	Sequenz (5'-3')	Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> )	G+C-Gehalt (%)
CRA22	CCGCAGCCAA	34 °C	70
CRA23	GCGATCCCCA	34 °C	70

#### 2.8.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte (s. Kap. 2.8.4) wurde eine Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.8.3.2 beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Proben vor dem Auftragen nicht mit dem 6x Slotmarker versetzt wurden. Die Elektrophorese wurde bei RT in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Biometra) bei 100 V und 45 mA für 105 min durchgeführt. Die Färbung des Gels und die Dokumentation erfolgten wie in Kapitel 2.8.3.2 beschrieben.

#### 2.8.4.2 Distanzverfahren

Für RAPD-Daten sind Distanzverfahren die einzigen geeigneten Auswerteverfahren, da aus ihnen direkt Distanzmaße gebildet werden können (HEYDUCK-SÖLLER, 2003). Zur Berechnung und Phenogrammdarstellung siehe Kapitel 2.6.4.4. Das Phenogramm wurde in diesem Fall aus einer Distanzmatrix erstellt, in die die visuell ausgewerteten RAPD-Fingerprints der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate eingebracht wurden.

---

### 2.8.5 16S rRNA-Sequenzierung

Die meisten phylogenetischen Untersuchungen beruhen auf der RNA (WOESE, 1987). Ein Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen nah verwandter Arten zeigt, dass sich zusätzlich zu den für phylogenetische Untersuchungen wichtigen konservierten Regionen auch Fragmente in diesem Molekül befinden, die sehr variabel sind. Gerade die Sequenz dieser variablen Regionen kann für die Unterscheidung dieser Arten herangezogen werden. Allein durch die Sequenzierung kurzer Fragmente und deren Vergleich mit Fragmenten von Referenzorganismen können Bakterien bestimmten Familien oder Gattungen zugeordnet werden (BUSSE et al., 1996).

Für eine Sequenzierung werden Primer eingesetzt, die zu den konservierten Regionen der 16S rRNA komplementär sind (LANE, 1991). Je nach Sequenzierungssystem und der zu sequenzierenden Region sind etwa 170-500 Basen mit einem Primer analysierbar. Für eine vollständige Sequenzierung müssen die passenden Primer ausgewählt werden (BUSSE et al., 1996).

#### 2.8.5.1 16S rRNA-PCR

Auch für diese Methode fand ein Aliquot der bereits extrahierten DNA (s. Kap. 2.8.2.1) Verwendung. Der Amplifikationsansatz und die Durchführung der PCR erfolgten wie in Kapitel 2.8.3.1 gezeigt. Die Durchführung der Gelelektrophorese ist in Kapitel 2.8.4.1 beschrieben.

#### 2.8.5.2 DNA-Elution aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen)

Die Rückgewinnung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden), modifiziert nach den Herstellerangaben (Handbuch, Juli 1997). Nachdem die aus dem Agarose-Gel (s. Kap. 2.8.5.1) geschnittenen DNA-Banden ausgewogen, das Gel wieder aufgelöst und die Farbe des Gemisches kontrolliert worden waren, wurde die Probe auf die vorbereitete QIAquick Säule pipettiert und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (15.000 rpm) in einer Tischzentrifuge (Beckman Mikrofuge E™) zentrifugiert. Um alle Reste der Agarose zu entfernen, wurden 500 µl des zum Kit gehörenden Puffers QG in das Zentrifugationsgefäß gegeben und erneut zentrifugiert (s. o.). Das zum Entfernen der Salze nötige Waschen wurde zweimal gemäß Vorschrift (s. o.) durchgeführt, wobei die Proben erst 3 min nach Pufferzugabe zentrifugiert (s. o.) wurden. Nach einer weiteren Zentrifugation (s. o.) zur Entfernung des restlichen Ethanol, der in dem verwendeten Puffer enthalten ist, wurde das ERG erneuert und zur Elution der DNA wurden 30 µl des zum Kit gehörenden Puffers EB (1:10 ver-

dünnt) in das Zentrum der QIAquick Säule pipettiert. Nach 1 min wurde der Ansatz erneut für 1 min zentrifugiert (s. o.). Auch dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt, so dass die DNA schließlich in 60 µl EB-Puffer vorlag.

Je 5 µl der eluierten Proben wurden mit 1 µl 6x Slotmarker (s. Kap. 2.8.3.2) vermischt, auf ein Gel aufgetragen und die Konzentration der DNA mittels Gelelektrophorese bestimmt (s. Kap. 2.8.4.1).

### 2.8.5.3 Entsalzung der DNA

Da der Puffer EB (s. o.) 10 mM Tris-HCl enthält, mussten die Proben mit Hilfe der Mikrodialyse entsalzt werden. Dazu wurden die nach der Gelelektrophorese verbliebenen 55 µl Probe auf einen auf Aqua dest. schwimmenden Mikrodialysefilter (0,025 µm Nitrocellulosefilter, Millipore, Schwalbach) gegeben und für 20 min dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse wurde die Probe auf zweimal 25 µl aufgeteilt und in einer Speed Vac<sup>®</sup> Sc 110 (Fa. Savant) auf jeweils 6 µl eingetrocknet.

### 2.8.5.4 Teilsequenzierung der 16S rRNA

Die Sequenzierung der 16S rRNA aller Isolate wurde von der Firma GAG BioScience GmbH (Bremen) mit einem automatischen Sequenziergerät (Applied Biosystems, Typ 373 A) durchgeführt. Die von GAG BioScience verwendeten Primer waren 518-534F GM1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3') und GM3F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3').

### 2.8.5.5 Vollständige 16S rRNA-Sequenzierung von Isolat 88/2-4 und Isolat 88/2-7

Die vollständige Sequenzierung der 16S rRNA der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 wurde, wie bei HEUCHERT et al. (2004, s. Kap. 8) beschrieben, freundlicherweise durch Mitarbeiter des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie (Bremen) vorbereitet und von der GAG Bioscience GmbH (Bremen) durchgeführt. Als genomische DNA wurde die mittels QIAGEN<sup>®</sup> Genomic-tip 100/G isolierte DNA eingesetzt (s. Kap. 2.8.2.1).

### 2.8.6 Phylogenie

Um die Isolate bestimmten Gattungen zuordnen zu können und zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes wurden die ermittelten 16S rRNA-Sequenzen mit den Sequenzen einer bzw. zweier (Isolat 88/2-7) Datenbanken verglichen (s. Kap. 2.8.6.1 und 2.8.6.2).

#### 2.8.6.1 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Die Suche mittels BLAST in DNA- und Proteinsequenzdatenbanken ist in der Forschung mittlerweile unentbehrlich (CUMMINGS et al., 2002). Mit Hilfe von BLAST können z. B. ermittelte 16S rRNA-Sequenzen (Voll- oder auch Teilsequenzen) mit bereits in Datenbanken eingegebenen Sequenzen verglichen werden. Somit können nah verwandte Gattungen oder Arten ermittelt werden. Die Anwendung BLAST ist über die NCBI-Webseite ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zugänglich.

#### 2.8.6.2 ARB (lateinisch "arbor" = Baum)

Für das Isolat 88/2-7 wurde von Dr. F. O. Glöckner (Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen) freundlicherweise eine vergleichende Analyse der 16S rRNA-Sequenzen mittels ARB durchgeführt. Das Software-Paket ARB wird für die Erstellung phylogenetischer Bäume genutzt, die auf ribosomalen RNAs und funktionalen Proteinen basieren. Die von dem Isolat erhaltene 16S rRNA-Sequenz (s. Kap. 2.8.5.5 und 6.4) wurde mit Hilfe des ARB-Programmpaketes (LUDWIG et al., 2004) der rRNA-Sequenzdatenbank der Technischen Universität München (release Januar 2001) zugefügt. Die weitere Vorgehensweise bis zur Erstellung des phylogenetischen Baumes kann HEUCHERT et al. (2004, s. Kap. 8) entnommen werden.

### 2.8.7 DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung ist eine wichtige Methode zur Untersuchung des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen verschiedenen Bakterienarten und wird für die Beschreibung einer neuen Spezies verlangt.

In der vorliegenden Arbeit war diese Methode für das Isolat 88/2-7 interessant, das nach der vollständigen Sequenzierung mittels Datenbanken (s. Kap. 2.8.6) der Gattung *Psychrobacter* zugeordnet werden konnte. Mit der DNA-DNA-Hybridisierung sollte nun geklärt werden, ob es sich bei dem Isolat 88/2-7 um eine neue Art handelte.

### 2.8.7.1 Probenaufbereitung

Das Isolat 88/2-7 sollte mit zwei laut BLAST und ARB nächst verwandten Arten (s. Kap. 3.7.1 und 3.7.2) hybridisiert werden. Für die DNA-DNA-Hybridisierung wurden die Stämme *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>) sowie *Psychrobacter glacincola* (DSM 12194<sup>T</sup>) ausgewählt. Beide Spezies wurden von der DSMZ (Braunschweig) bezogen.

Da für die DNA-DNA-Hybridisierung jeweils ein Feuchtgewicht von etwa 3 g Zellmaterial benötigt wird, wurden für die Anzucht jeder Spezies ca. 7,5-9 l ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3, 60 min autoklaviert) auf jeweils sechs 2 l Erlenmeyerkolben verteilt. Die Anzucht der Organismen erfolgte bei RT auf einem Rotationsschüttler (100 rpm, innova 2003, New Brunswick Scientific). Nach etwa 48 h Wachstum wurden die Ansätze für 10 min bei 5.000 x g und 5 °C zentrifugiert (Beckman Avanti<sup>TM</sup> J-25). Die jeweiligen Pellets wurden in etwas ASN<sub>III</sub>-Medium (s. o.) resuspendiert, vereint, in ein Reagenzglas mit Gewinde überführt und bei 4.000 x g und 5 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen von *Psychrobacter proteolyticus* ließen sich nur schwer abzentrifugieren. Obwohl sie in diesem letzten Schritt bei 10.000 x g und 5 °C für 10 min zentrifugiert wurden, entstand kein festes Pellet. Der „Überstand“ wurde daher so weit wie möglich vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen. Anschließend wurden die Reagenzgläser mit Isopropanol/Aqua dest. (1:1, v/v) gefüllt, damit die Zellpellets während des Versands zur DSMZ nicht austrocknen konnten.

### 2.8.7.2 Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung der drei in Kapitel 2.8.7.1 aufgeführten Stämme wurde an der DSMZ in Braunschweig durchgeführt (s. auch HEUCHERT et al., 2004, Kap. 8).

## 2.9 Flockenbildung von Isolat 88/2-7

Es sollte geklärt werden, ob sich auch in einem anderen Vollmedium (1% Pepton im ASN<sub>III</sub>-Medium) die temperaturabhängige Flockenbildung zeigt (s. Kap. 2.9.1). Außerdem wurde die Größe der in Vollmedien gebildeten Flocken bestimmt (s. Kap. 2.9.2). Anschließend sollte durch Zugabe verschiedener chemischer Substanzen untersucht werden, ob eventuell Extracellular polymeric substances (EPS) für die Flockenbildung verantwortlich sind (s. Kap. 2.9.3ff.).

### 2.9.1 Einfluss von Pepton auf die Flockenbildung

Um herauszufinden, ob das eingesetzte Kulturmedium einen Einfluss auf das Flockungsverhalten des Isolates hat, sollte es mit einem weiteren Vollmedium angezogen werden. Dazu wurden der Hefeextrakt und das Eisenammoniumcitrat im ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) durch 1% Pepton ersetzt. Mit dem Medium wurden dann Kulturen bei 5 °C und 27 °C inkubiert (s. Kap. 2.4.3) und täglich auf Wachstum kontrolliert.

### 2.9.2 Größenbestimmung der Flocken

Zur Bestimmung der Flockengröße wurde das Isolat 88/2-7 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (s. Kap. 2.3) bzw. mit 1% Pepton (s. Kap. 2.9.1) im Kühlraum bei 5 °C ( $\pm 1$  °C) auf einem Rotationsschüttler (unimax 2010, Heidolph) angezogen. Nach 10 bis 21 Tagen Wachstum wurde der Inhalt des jeweiligen Erlenmeyerkolbens in eine mit 70%igem Ethanol gespülte Plastikschaale mit Deckel ( $\varnothing$  5 cm) umgefüllt. Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi SV6, Zeiss) und eines unter die Plastikschaale gelegten Millimeterpapiers wurde dann die Größe der Aggregate bestimmt.

Die Form der Flocken wurde auch mit dem Zeiss Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskop (Axiolab) betrachtet. Um das Zerdrücken der Flocken zwischen Objektträger und Deckglas zu vermeiden, wurde in den Agar eines Agar-Slides (s. Kap. 2.5.2) eine kleine Vertiefung gestanzt. In diese wurden dann mit Hilfe einer Eppendorfpipette, deren sterile Spitze abgeschnitten wurde, um mögliche Scherkräfte, die die Flocken zerstören könnten, zu reduzieren, ein Flocken enthaltendes Aliquot aus einer 11 Tage alten Kultur (5 °C, ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt, s. o.) gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

### 2.9.3 Einfluss von Calciumchlorid auf die Flockenbildung

Um Hinweise auf den Auslöser der Flockenbildung zu erlangen, wurde nach Rücksprache mit Herrn Prof. H.-C. Flemming und Dr. J. Wingender (Fachgebiet Aquatische Mikrobiologie, Gerhard-Mercator-Universität, Duisburg) zunächst die Konzentration des CaCl<sub>2</sub> im ASN<sub>III</sub>-Medium erhöht.

Dazu wurde das ASN<sub>III</sub>-Medium mit drei verschiedenen Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O angesetzt: i) „Standard“, 3,4 mM (0,5 g/l, s. Kap. 2.3), ii) 10 mM (1,47 g/l) und iii) 100 mM (14,7 g/l). Nach dem Autoklavieren (25 min, 121 °C) war der 100 mM Ansatz leicht trüb. Von

---

diesen drei Medien wurden jeweils etwa 20 ml in je einen 50 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt, die 2%ig aus einer vier Tage alten, bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-„Standard“ angezogenen Vorkultur von Isolat 88/2-7 (noch keine Flockenbildung) angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte im Kühlraum bei 5 °C und 100 rpm auf einem Rotationsschüttler (unimax 2010, Heidolph) jeweils in Parallelansätzen. Die Ansätze wurden zehn Tage lang täglich auf Wachstum und Flockenbildung kontrolliert.

#### 2.9.4 Einfluss von EDTA auf die Flocken

Zur chemischen Extraktion von EPS bei periphytischen marinen Bakterien setzten LABARE et al. (1989) 3,72 g/l EDTA (ca. 10 mM) bei 15-minütigem Rühren ein.

Zu jeweils einem Ansatz der 10 Tage alten Kulturen (s. Kap. 2.9.3) wurden 40 µl einer sterilen 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8) gegeben, was in den Ansätzen einer Konzentration von etwa 1 mM EDTA entsprach. Die Kulturen wurden weiter bei 5 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Nach einem Tag wurde die EDTA-Konzentration auf 10 mM erhöht und einen Tag später auf 20 mM. Da nach zwei weiteren Tagen noch immer keinerlei Veränderung bei den Flocken erkennbar war, wurde die EDTA-Konzentration auf 30 mM erhöht. Die Kulturen wurden über eine Dauer von sechs Tagen weiter täglich kontrolliert.

#### 2.9.5 Einfluss von Natriumhydroxid auf die Flocken

SATO und OSE (1980) nutzten 2 N NaOH zur chemischen Extraktion von EPS bei *Escherichia coli*. Um festzustellen, ob NaOH zu einer Auflösung der Flocken von Isolat 88/2-7 führt, wurde eine Kultur von diesem Isolat mit NaOH versetzt. Zu einer 10 Tage alten bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) angezogenen Kultur, bei der das Medium klar war und die Zellen alle zu Flocken verklumpt waren, sowie zu einer identischen Menge unbeimpften Mediums wurde zunächst 1 ml einer 5 M NaOH gegeben (Endkonzentration etwa 2 M). Anschließend wurde in der Kultur und im unbeimpften Medium der pH-Wert gemessen.

In einem zweiten Ansatz wurden zu einer 11 Tage alten ebenfalls bei 5 °C angezogenen Kultur in ASN<sub>III</sub>-Medium (Medium klar und Zellen zu Flocken verklumpt) und zu unbeimpftem Medium (Kontrolle) in verschiedenen Zeitabständen mehrmals kleinere Mengen 5 M NaOH zugegeben, um eventuelle Veränderungen in der Kultur beobachten zu können. Über eine Dauer von fünf Tagen wurden zunächst mehrmals jeweils 2 µl einer 5 M NaOH zugegeben, anschließend über weitere fünf Tage jeweils 4 µl. Dann wurden noch einmal über fünf Tage jeweils 5 µl der

oben angegebenen NaOH und letztlich bis zur Beendigung des Versuches (weitere drei Tage) nochmals jeweils 10  $\mu\text{l}$  zugegeben, so dass am Versuchsende (nach insgesamt 25 Tagen) insgesamt 314  $\mu\text{l}$  einer 5 M NaOH (Endkonzentration dann etwa 77 mM) zugefügt worden waren. Bei jeder erneuten Zugabe von NaOH wurde kontrolliert, ob die Flocken Auflösungserscheinungen zeigten. Nach Beendigung des Versuches wurde der pH-Wert gemessen und mit dem Anfangswert verglichen.

## Teil B: Isolation von Reinkulturen aus dem äquatorialen Atlantik und deren Charakterisierung

### 2.10 Herkunft des Probenmaterials

Die Wasserproben wurden mit dem FS METEOR von April bis Mai 2001 auf dem Fahrtabschnitt M49/4 von Salvador da Bahia (Brasilien) nach Halifax (Kanada) aus unterschiedlichen Tiefen entnommen. Die einzelnen Probennahmestellen, die zur Gewinnung von Partikelassoziierten Bakterien herangezogen wurden, und die jeweiligen Wassertiefen sind in Tabelle 2.13 aufgeführt und in Abbildung 6.1 ist die Lage der Probennahmestandorte dargestellt.

**Tab. 2.13:** Position der Probennahmestellen während der Fahrt M49/4 mit Angabe des Probennahmedatums und der beprobten Wassertiefen

Stationsnummer (GeoB)	Breitengrad	Längengrad	Probennahmedatum	Beprobte Wassertiefen [m]
7002-3	07°30,0'S	28°11,3'W	07.04.01	20, 100, 150, 200
7004-1	03°03,9'N	33°30,0'W	14.04.01	20, 100, 150, 200
7006-1	07°01,8'N	46°30,1'W	17.04.01	20, 100, 150, 200
7015-1	16°00,0'N	55°58,0'W	27.04.01	20, 100, 150, 200

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Station 7004-1 aus dem westlichen äquatorialen Atlantik bearbeitet. Die an dieser Station in den beprobten Tiefen vorherrschenden abiotischen Bedingungen (Messung mit CTD-Sonde plus Sauerstoffsensoren und Fluorometer, für Einzelheiten der Messung s. FISCHER, 2002) sind in Tabelle 2.14 aufgeführt.

**Tab. 2.14:** Daten (CTD-Messung) der abiotischen Faktoren an der Station 7004-1

Stations-Nr.	Tiefe (m)	Druck (dbar) <sup>a</sup>	Temperatur (°C) <sup>a</sup>	Salinität (‰) <sup>a</sup>	Sauerstoff (ml/l) <sup>a</sup>	Chlorophyll-Gehalt (mg/m <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>
7004-1	20	19,89	28,15	33,89	9,11	0,05
7004-1	100	99,436	14,35	33,46	4,31	0,05
7004-1	150	149,22	13,17	33,26	4,46	0,03
7004-1	200	198,81	12,30	33,70	4,80	0,02

<sup>a</sup> Werte auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet

### 2.11 Bearbeitung des Probenmaterials an Bord des FS METEOR

Wie schon in Kapitel 2.2 erwähnt, wurde auch hier davon ausgegangen, dass bei der Filtration durch Filter mit 10 µm Porengröße nur Partikel mit assoziierten Bakterien zurückgehalten werden, da die frei lebenden Bakterien in der Regel viel kleiner sind.

---

Auch auf diesem Fahrtabschnitt wurde an den jeweiligen Stationen mit Hilfe von Niskin-Wasserschöpfern Meerwasser aus verschiedenen Wassertiefen entnommen (s. Tab. 2.13). Je 10 l des Wassers wurden in Nalgene-Kanister abgefüllt und anschließend durch 10 µm-Polycarbonatfilter (Millipore, Schwalbach) zur Gewinnung der organischen Partikel mit Hilfe einer Membranpumpe mit 0,2 bar Unterdruck filtriert. Die Filter wurden geviertelt, und ein Viertel wurde auf eine ASN<sub>III</sub>-Agarplatte (s. Kap. 2.4.4.2) gelegt, leicht angedrückt und nach wenigen Minuten wieder entfernt. Die Agarplatte wurde im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Die übrigen Filterstücke wurden in einer Petrischale bei –18 °C gelagert.

## 2.12 Isolation und Kultivierungsbedingungen

Die ASN<sub>III</sub>-Agarplatten (s. Kap. 2.11; „Stammplatten“) wurden täglich auf Wachstum kontrolliert. Nach sechs Tagen Wachstum wurden alle makroskopisch sichtbaren Kolonien mit Hilfe einer Impföse entnommen („gepickt“), auf ein Feld einer in mehrere Felder aufgeteilten ASN<sub>III</sub>-Agarplatte (Wachstum verschiedener Isolate auf einer Platte) übertragen und erneut bei 4 °C inkubiert<sup>4</sup>. Alle Platten wurden täglich auf Wachstum kontrolliert. Auf den „Stammplatten“ waren schon nach etwa 24 h neue Kolonien erkennbar, die noch sehr klein und den bisher „gepickten“ sehr ähnlich waren. Nach weiteren vier Tagen Inkubation wuchsen auf den „Stammplatten“ Pilze, da dem Medium kein Actidion zum Abtöten eukaryontischer Zellen zugegeben worden war. Dadurch war es nicht möglich, weitere Bakterienkolonien zu „picken“. Ein Teil der beim ersten Überimpfen von der „Stammplatte“ „gepickten“ Kolonien konnte nach fünf Tagen Inkubation erneut überimpft werden. Alle Agarplatten wurden bis zur Ankunft der Proben im Institutslabor bei 4 °C inkubiert bzw. gelagert.

Nach dem Eintreffen der Proben im Labor wurden zunächst die Isolate aller Tiefen neu überimpft. Aufgrund der Menge an „gepickten“ Kolonien wurden die ersten Überimpfungen sowohl an Bord als auch die ersten im Universitätslabor mehrmals (etwa drei- bis viermal) als einfacher Ausstrich vorgenommen. Zum Erhalt von Reinkulturen wurde dann ein 3-Ösenausstrich durchgeführt.

Die Agarplatten der Proben aus 100 und 150 m Wassertiefe wurden zunächst bei 5 °C gehältert. Die frisch überimpften Organismen der Probe aus 20 m Wassertiefe wurden dagegen nun bei

---

<sup>4</sup> In einem Vorversuch wurden die Platten bei RT inkubiert. Diese waren aber nach etwa 24 h so dicht bewachsen, dass keine einzelnen Kolonien mehr entnommen werden konnten.

27 °C inkubiert und täglich auf Wachstum kontrolliert. Es wurden so lange Einzelkolonien überimpft, bis nach mikroskopischer Kontrolle unter dem Stereomikroskop (Stemi SV 6, Zeiss) und im Durch- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskop (Axiolab, Zeiss) Reinkulturen vorlagen. Von diesen Reinkulturen wurden Glycerolstocks angelegt (s. Kap. 2.4.2) und dann die im Folgenden näher beschriebenen Untersuchungen (Kap. 2.13 ff.) durchgeführt. Parallel dazu wurden jetzt auch die Isolate aus 100 m Tiefe überimpft und bei 27 °C inkubiert, während die aus 150 m weiterhin bei 5 °C gelagert wurden. Mit den Isolaten dieser beiden Tiefen wurde dann weiterhin so verfahren wie für die Isolate aus 20 m Wassertiefe beschrieben.

## **2.13 Morphologische Untersuchungen**

### **2.13.1 Reinheitskontrolle, Kolonie- und Zellmorphologie**

Eine makroskopische Reinheitskontrolle sowie die Beschreibung von Wuchsform und -farbe vereinzelter Kolonien wurde mit Hilfe des Zeiss Stereomikroskops Stemi SV 6 durchgeführt. Die mikroskopische Reinheitskontrolle von Flüssig- (s. Kap. 2.4.4.1) bzw. Plattenkulturen (s. Kap. 2.4.4.2) sowie die Beschreibung der Zellmorphologie (Zellform und Beweglichkeit) erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Durch- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskops (Axiolab) im Phasenkontrast. Dazu wurde ein Tropfen einer homogenen Flüssigkultur bzw. eine Kolonie einer Agarplatte in einem Tropfen 0,85%iger NaCl-Lösung auf einen mit 70%igem Ethanol gereinigten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und im Mikroskop betrachtet.

Die weiteren Untersuchungen zur Zellmorphologie (Untersuchung der Beweglichkeit mit Hilfe von Schwärmagarplatten, Agar-Slide-Fixierung, Gram-Färbung und KOH-Test) wurden, wie in Teil A (s. Kap. 2.5) beschrieben, durchgeführt. Die Inkubation der Reinkulturen erfolgte hier jedoch ausschließlich bei 27 °C.

Aufgrund der großen Anzahl an Kulturen wurden die Schwärmagarplatten zum Teil nicht nur mit einem Isolat beimpft, sondern mit bis zu sechs Isolaten. Waren die Isolate während der Inkubation ineinander gewachsen, wurde der Versuch für die umwachsene Kultur wiederholt.

## **2.14 Enzymtests**

Mit allen Isolaten wurden ein Katalase- (s. Kap. 2.6.5.1) und ein Oxidase-Test (s. Kap. 2.6.5.2) durchgeführt.

## 2.15 Chemotaxonomie

### 2.15.1 Pigmentbestimmung

Von den auf ASN<sub>III</sub>-Agar (s. Kap. 2.4.4.2) farbige wachsenden Kulturen aus 150 m Wassertiefe wurden sieben zufällig ausgewählt, um eine Bestimmung ihrer Pigmente durchzuführen. Zunächst wurde versucht, die Pigmente photometrisch und mittels Reversed Phase HPLC (s. Kap. 2.15.1.2) zu charakterisieren. Im Anschluss daran wurden die Pigmente von zwei der ausgewählten Kulturen, die im HPLC-Chromatogramm keinen Peak zeigten, noch mittels verschiedener Massenspektrometrie-Methoden (s. Kap. 2.15.1.3) untersucht.

#### 2.15.1.1 Photometrische Pigmentbestimmung

Von dem unverdünnten Methanolextrakt (s. Kap. 2.15.1.2.1) wurde zunächst ein Wellenlängenscan aufgenommen (s. Kap. 2.7.1.2).

#### 2.15.1.2 Reversed Phase HPLC

##### 2.15.1.2.1 Modifiziert nach RABENSTEIN (1997)

Die Methanolextraktion wurde gegenüber der unter Kapitel 2.7.1.1 beschriebenen leicht modifiziert. Je ca. 100 ml einer Kultur wurden nach 24-48 h Wachstum unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) für 10 min bei 6.500 x g und 10 °C in je zwei Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (Beckman Avanti<sup>TM</sup> J-25). Der Überstand wurde verworfen und eines der Pellets in 1 ml Methanol resuspendiert. Nach etwa 1 h Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurde diese Lösung auf das zweite Pellet gegeben. Dieses wurde dann ebenfalls resuspendiert, in ein ERG überführt und bei 4 °C für 4 h im Dunkeln extrahiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (15.000 rpm; Beckman Mikrofuge E<sup>TM</sup>) abzentrifugiert, die Überstände in ein neues ERG gegeben und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Dem Pellet wurden erneut 0,5 ml Methanol zugesetzt. Die Probe wurde über Nacht bei 4 °C im Dunkeln extrahiert, im Anschluss daran erneut zentrifugiert (s. o.) und der Überstand den Extrakten vom Vortag zugefügt.

Die Messungen in der HPLC erfolgten wie in Kapitel 2.7.1.3 beschrieben und die erhaltenen Absorptionsspektren der Carotinoide wurden mit Literaturdaten (KARSTEN und GARCIA-PICHEL, 1996) sowie mit Hilfe käuflich erworbener Standards verglichen (s. Tab. 2.8).

---

#### 2.15.1.2.2 Modifiziert nach STEPNOWSKI und BLOTEVOGEL (persönliche Mitteilung)

Unter Standardbedingungen angezogene (s. Kap. 2.4.3), vier Tage alte Kulturen wurden für 10 min bei 6.500 x g und 10 °C in je zwei Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (Beckman Avanti™ J-25) und die Überstände verworfen. Die Extraktion der Pigmente erfolgte mit Methanol-Aceton (4:1, v/v) über Nacht bei 4 °C im Dunkeln. Am nächsten Morgen wurden die Ansätze bei 27.000 x g und 15 °C für 10 min zentrifugiert (Beckman Avanti™ J-25). Zur Hydrolyse von eventuell vorhandenen Carotinoid-Estern wurde nun je ein Ansatz pro Isolat mit 2 ml 0,01 M NaOH in Methanol versetzt (Verseifung). Aus den ERG aller Ansätze wurde der Sauerstoff durch ca. dreiminütige Begasung mit Stickstoff ausgetrieben. Die Ansätze wurden dann bis zur Messung in der HPLC bei RT im Dunkeln gehalten.

Die Bestimmung der Carotinoide im oben angegebenen Methanol-Aceton-Extrakt wurde mit Hilfe eines Merck/Hitachi-HPLC-Systems durchgeführt. Die Trennung erfolgte bei RT mit einer Flussrate von 0,7 ml/min isokratisch. Die mobile Phase setzte sich aus Acetonitril, Methanol mit 0,1 M Ammoniumformiat und Dichlormethan (71:22:7, v/v/v) zusammen. Die Zusammensetzung des Systems entsprach ansonsten der unter Kapitel 2.7.1.3 beschriebenen.

#### 2.15.1.3 Gewinnung und Aufreinigung der Pigmente für die Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) wurde lediglich mit den Isolaten 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe (s. Tab. 6.7c, Kap. 6.5) durchgeführt, da bei diesen beiden nur nach der in Kapitel 2.15.1.2.2 beschriebenen Methode ein Pigment nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 3.10.2).

##### 2.15.1.3.1 Methanolextraktion der Pigmente

Um eine ausreichende Menge an Pigment für eine MS-Analyse zu erhalten, wurden von den beiden Isolaten ca. 1,3 l-Kulturen (ASN<sub>III</sub>-Medium, s. Kap. 2.3) bei 27 °C auf einem Rotationsinkubator (100 rpm, innova 4000, New Brunswick Scientific) angezogen. Nach 48 h Wachstum wurden die Zellen für 15 min bei 5.000 x g und 10 °C (Beckman Avanti™ J-25) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 50 ml 0,8%iger NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (6.000 x g und 10 °C für 15 min, Beckman Avanti™ J-25). Anschließend wurde das Pellet in 100 ml Methanol resuspendiert und unter Helium (10 min Begasung) über Nacht bei 4 °C im Dunkeln stehen gelassen, um dann für 5 min bei 17.500 x g und 4 °C (Beckman Avanti™ J-25) zentrifugiert zu werden. Danach wurde der Überstand über einen Papierfilter (Schleicher & Schuell) in einen 250 ml-Rundkolben überführt. Der Rundkolben wurde ebenfalls für 10 min mit

Helium begast, damit keine Oxidation der Pigmente stattfinden konnte. Über einen Rotationsverdampfer wurde das Methanol abgezogen und die Pigmentprobe zur vollständigen Eintrocknung anschließend an eine Ölpumpe angeschlossen. Der Kolben wurde danach mit Argon begast.

### 2.15.1.3.2 Dünnschichtchromatographie

Vor der Aufreinigung der Pigmente über eine Säulenchromatographie mussten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zunächst ein geeignetes Lösungsmittel und eine geeignete stationäre Phase (Aluminiumoxid- oder Kieselgelplatten, Fluka, Neu Ulm) gefunden werden. Auf eine mit einem weichen Bleistift etwa 1 cm über dem unteren Rand der jeweiligen stationären Phase gezogene Linie wurde mit einer Glaskapillare ein wenig Probenmaterial (in Methanol gelöstes Pigment, das vor der Eintrocknung entnommen wurde) aufgebracht und trocknen gelassen. Die jeweilige stationäre Phase wurde dann in eine mit ca. 10 ml Laufmittel und einem Stück Filterpapier gefüllte kleine Chromatographiekammern gestellt. Als eventuelle mobile Phase wurden verschiedene Kombinationen an Lösungsmitteln getestet (s. Tab. 2.15) und anschließend aus dem Verhältnis der Laufstrecke der Testsubstanz zur Laufstrecke der mobilen Phase der Rf-Wert errechnet, um das optimale Laufmittel zu ermitteln.

Als optimales Laufmittel erwies sich Dichlormethan-Methanol in einem Mischungsverhältnis von 3:1 (v/v). Auf Kieselgelplatten (s. o.) wiesen die beiden untersuchten Isolate mit diesem Laufmittel die höchsten Rf-Werte auf (Isolat 3 einen Rf-Wert von 0,85 und Isolat 4a1c einen Rf-Wert von 0,87, weitere Daten nicht gezeigt).

**Tab. 2.15:** In der Dünnschichtchromatographie getestete Lösungsmittel und deren Mischungsverhältnisse zur Ermittlung einer optimalen mobilen Phase für die Säulenchromatographie

Lösungsmittel	Mischungsverhältnis
Acetonitril	-
Chloroform : Methanol	10:1 (v/v)
Chloroform : Aceton	9:1 (v/v)
Chloroform : Essigsäureethylester	9:1 (v/v)
Dichlormethan : Essigsäureethylester	4:1 (v/v)
Dichlormethan : Essigsäureethylester	1:2 (v/v)
Dichlormethan : Methanol	1:2 (v/v)
Dichlormethan : Methanol	3:1 (v/v)

### 2.15.1.3.3 Säulenchromatographie

Die eingetrocknete Pigmentprobe (s. Kap. 2.15.1.3.1) enthielt neben dem zu untersuchenden Pigment noch weitere Zellbestandteile (z. B. Proteine, Lipide), die mit Hilfe einer Säulenchromatographie entfernt werden sollten.

Die Probe wurde zunächst in dem als optimal ermittelten Laufmittel gelöst (s. Kap. 2.15.1.3.2, Dichlormethan-Methanol, 3:1, v/v). Zur Kontrolle, ob es sich bei dem Pigment nur um eine einzige Substanz handelte, wurde mit dem optimalen Laufmittel und der optimalen stationären Phase (Kieselgel) noch einmal eine Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 2.15.1.3.2) durchgeführt. Anschließend wurden etwa 30 g Kieselgelpulver in Dichlormethan-Methanol (3:1, v/v) aufgenommen und in eine Chromatographiesäule aus Glas ( $\varnothing$  3 cm) überführt. Die im Laufmittel gelöste Pigmentprobe (s. o.) wurde auf die Säule gegeben, damit sie ins Kieselgel einziehen konnte. Danach wurde so viel Laufmittel auf die Säule gegeben, dass die Pigmentprobe aus der Säule eluiert werden konnte, ohne dass die Säule dabei trocken lief. Die Pigmentfraktion wurde in einem 50 ml Rundkolben aufgefangen und das Lösungsmittel erneut in einem Rotationsverdampfer abgezogen. Zur vollständigen Eintrocknung wurde die Probe dann an eine Ölpumpe gehängt und der Kolben im Anschluss mit Argon begast.

### 2.15.1.3.4 Massenspektrometrie

Die MS ist eine Methode zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Eine Ionenquelle erzeugt aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen, die in einem Massenanalysator hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) aufgetrennt und schließlich in einem Detektor als Massenspektrum dargestellt werden (LOTTSPREICH und ZORBAS, 1998). Die Analytmoleküle werden durch Aufnahme oder Abgabe eines Elektrons ionisiert, was z. B. durch Elektronen- (Elektronenstoß-Ionisation, EI) und Atom- oder Ionenbeschuss (Fast-Atom-Bombardment, FAB-Ionisation) erreicht wird. Durch Versprühen der Probe in einem elektrischen Feld (Elektrospray-Ionisation, ESI) können ebenfalls Ionen erzeugt werden. Die MS-Spektren sind daher durch das Auftreten von Quasi-Molekülionen charakterisiert, wie  $[M + H]^+$  oder  $[M + Na]^+$  ( $M = \text{Masse}$ ). Im Folgenden sind die einzelnen Methoden kurz dargestellt.

Die EI war die erste verfügbare Ionisationstechnik und ist immer noch die am häufigsten genutzte Methode zur Aufzeichnung von Massenspektren von Carotinoiden (ENZELL und BACK, 1995). Die in einen gasförmigen Zustand gebrachte Probe wird mit 70 eV Elektronen bombardiert, wobei häufig ein einfach positiv geladenes Molekülion zurückbleibt (LEHMANN, 1996). Im Allge-

---

meinen ist ein EI-Spektrum für jede Substanz und deren chemische Struktur charakteristisch (CHAPMAN, 1985).

Das FAB ist besonders zur Untersuchung von polaren Verbindungen mit funktionellen Gruppen geeignet, die die Bildung von positiv und negativ geladenen Ionen begünstigen (LEHMANN, 1996). FAB-Spektren werden für nichtflüchtige und oft auch empfindliche Substanzen genutzt, die in einer flüssigen, hochsiedenden Matrix (z. B. Nitrobenzylalkohol) löslich sein müssen ([www.organik.uni-erlangen.de/vostrowsky/mass\\_spec/massen01.html](http://www.organik.uni-erlangen.de/vostrowsky/mass_spec/massen01.html)). Die Matrix wird verdampft und ionisiert. Dabei werden aus ihrer Oberfläche die Probensubstanzen herausgerissen und durch Ionentransfer geladen, wobei sich Quasi-Molekülonen bilden (LEHMANN, 1996; [www.organik.uni-erlangen.de/vostrowsky/mass\\_spec/massen01.html](http://www.organik.uni-erlangen.de/vostrowsky/mass_spec/massen01.html)).

Das Ionisierungsprinzip bei der ESI beruht auf einer Desolvatisierung, d. h. dem Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase (Zerfall des Flüssigkeitsstroms in winzige, aneinander gereihte Tröpfchen, „Elektrospray“), was unter Atmosphärendruck und durch Anlegung eines elektrischen Feldes geschieht. Die Analyse der freien Ionen findet im Hochvakuum (ca.  $10^{-5}$  torr) statt (LOTTSPREICH und ZORBAS, 1998). Die Massenanalyse geschieht dann mit einem Quadrupolmassenspektrometer oder, wie in der vorliegenden Untersuchung, mit einer Ionenfalle. Eine weitere Strukturaufklärung ist durch die so genannte MS/MS (Tandem-MS) möglich. Bei der MS/MS sind zwei Analysatoren über eine Stoßkammer verbunden. Der erste Analysator lässt lediglich das interessierende Ion passieren, von dem in der Stoßkammer durch Stöße zwischen Ionen und Gasmolekülen erneut Fragmentationen erzeugt werden, die dann in dem zweiten Analysator massenanalysiert werden (LEHMANN, 1996). Bei Verwendung einer Ionenfalle geschehen diese Vorgänge in einem einzigen Analysator. Sie sind dann nicht räumlich, sondern zeitlich getrennt ([www.missile.ucd.ie/massspec/MS-MS.htm](http://www.missile.ucd.ie/massspec/MS-MS.htm)).

Mit Hilfe der DCI (Direkte Chemische Ionisation bzw. Desorption durch Chemische Ionisation) lassen sich schwer verdampfbare oder thermisch labile Proben untersuchen (LEHMANN, 1996). Die Probe wird gelöst und auf einen heizbaren Draht gebracht, der nach Verdampfen des Lösungsmittels direkt in ein Reaktandgas eingebracht wird, wo die Probe dann ionisiert wird ([www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~mundta/ac1/keck/Ms-home/MS-HOME.html](http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~mundta/ac1/keck/Ms-home/MS-HOME.html)). Als Reaktandgase können z. B.  $\text{NH}_3$  oder  $\text{CH}_4$  herangezogen werden (BUDZIKIEWICZ, 1992).

Bei einer Massenfeinbestimmung (Hochauflösung) wird die exakte Masse eines Ions bestimmt, aus der sich dann die Elementarzusammensetzung berechnen lässt (als Berechnungsgrundlage

werden wahrscheinlich enthaltene Elemente vorgegeben, wie C, H und O). Als Differenz zwischen gemessener und berechneter Masse sind im Allgemeinen bis zu 2,5 ppm zulässig ([www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~mundta/ac1/keck/Ms-home/MS-HOME.html](http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~mundta/ac1/keck/Ms-home/MS-HOME.html)).

Mit den zu untersuchenden Proben wurden von Herrn Dr. T. Dülcks (Abt. Instrumentelle Analytik, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Bremen) mit Hilfe eines Finnigan MAT 8200 (Fa. Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen) bzw. Bruker Esquire LC (Fa. Bruker Daltonics, Bremen) freundlicherweise verschiedene Methoden der Massenspektrometrie durchgeführt. Dazu gehörten: EI, FAB, ESI, DCI sowie abschließend eine Hochauflösungs-EI.

## 2.16 Molekularbiologische Untersuchungen

Mit Hilfe der FISH sollten die Isolate zunächst bakteriellen Gruppen zugeordnet werden (s. Kap. 2.16.1). Von den beiden mittels MS näher untersuchten Isolaten aus 150 m Wassertiefe (Station 7004-1) wurden anschließend noch die G+C-Gehalte bestimmt und ihre 16S rRNAs sequenziert (s. Kap. 2.16.2 und 2.16.3).

### 2.16.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Bei den Isolaten, die ein Gram-negatives Färbeverhalten zeigten, wurde die Methode der FISH, wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, angewendet und die dort in Tabelle 2.10 genannten Oligonucleotidsonden eingesetzt. Für die Gram-positiven Isolate wurde die Methode modifiziert nach WAGNER et al. (1998) durchgeführt. Die hierfür neben der Eubakterien-Sonde (EUB338, s. Tab. 2.10) eingesetzten Oligonucleotid-Sonden, deren Sequenz und Spezifität sind Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Von einer 48 h alten Reinkultur eines Gram-positiven Isolates (ASN<sub>III</sub>-Agarplatte, s. Kap. 2.4.4.2) wurde eine Impföse Bakterienmaterial in 479 µl 0,85%iger NaCl-Lösung in einem ERG suspendiert. Zur Fixierung wurden 521 µl 96%iges Ethanol zugegeben (Endkonzentration 50%) und nach einer Fixierungsdauer von 30 min 2 µl der Bakteriensuspension in jeweils eine Vertiefung eines teflonbeschichteten Objektträgers gegeben. Trocknung, Dehydratisierung und Nachfixierung wurden, wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, durchgeführt.

**Tab. 2.16:** Eingesetzte Oligonucleotid-Sonden, deren Sequenz und Spezifität

Sonde	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Literatur
HGC69a	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	<i>Actinobacteria</i>	Roller et al., 1994
LGC354a-c	YSG AAG ATT CCC TAC TGC	Gram-positive, niedriger G+C-Gehalt	Meier et al., 1999

Um die Zellwände aufzulösen und um den Sonden das Eindringen zu erleichtern, wurden zunächst auf jedes Well 20  $\mu$ l Lysozym-Lösung (10 mg/ml, 100450 U/mg, in 100 mM Tris/HCL, 50 mM EDTA, pH 8,0; Fluka, Neu Ulm) gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt und die Objektträger erneut bei 46 °C getrocknet. Anschließend wurde erneut eine Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (s. Kap. 2.8.1) durchgeführt. Auf jedes Well wurden nun 20  $\mu$ l Proteinase K (0,05 mg/ml Aqua dest., ca. 33 U/mg; Amresco, Solon, USA) gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Auch hier wurde die Reaktion durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt, die Objektträger bei 46 °C getrocknet und anschließend zur Dehydratisierung noch einmal in eine aufsteigende Ethanolreihe gegeben. Die Hybridisierung, das Waschen, die Gegenfärbung sowie die mikroskopische Betrachtung erfolgten wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben.

#### 2.16.2 Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA mittels thermischer Denaturierung ( $T_m$ -Bestimmung)

Von den beiden Isolaten 3 und 4a1c, bei denen die enthaltenen Pigmente mittels MS näher untersucht wurden, wurden die G+C-Gehalte der zuvor extrahierten DNAs bestimmt (s. Kap. 2.8.2.1 bis 2.8.2.3).

#### 2.16.3 16S rRNA-Sequenzierung

Ein Aliquot der bereits extrahierten DNAs (s. Kap. 2.16.2) der beiden Isolate 3 und 4a1c wurde außerdem für eine 16S rRNA-PCR genutzt (s. Kap. 2.8.5.1 bis 2.8.5.3). Die anschließende Sequenzierung mit dem Primer 518-534F GM1 (s. Kap. 2.8.5.4) wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

### 2.17 Herkunft der Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wiesen überwiegend p. A.-Qualität bzw. HPLC-grade auf und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (New Jersey), Fluka (Neu Ulm), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (jetzt VWR, Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 3 Ergebnisse

### Teil A: Isolate aus dem Südatlantik (Antarktis)

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in dieser Arbeit vor allem auf der Ermittlung physiologischer Merkmale der Isolate. Chemotaxonomische und molekularbiologische Untersuchungen sollten einer groben Einordnung der Isolate dienen. Durch weitere Untersuchungen, vor allem einer DNA-DNA-Hybridisierung, konnte das Isolat 88/2-7<sup>5</sup> als neue Art identifiziert werden (s. dazu auch HEUCHERT et al., 2004, Kap. 8).

#### 3.1 ARDRA

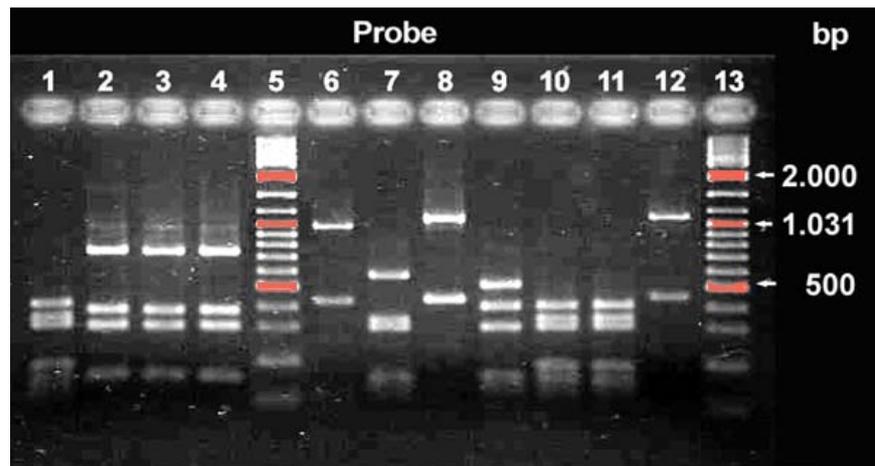
Die ARDRA sollte zunächst klären, ob es sich bei den untersuchten Isolaten um verschiedene Arten handelte. Bei allen elf Antarktisisolaten wurde eine Restriktion mit verschiedenen Enzymen (*Hin* 6I, *Alu* I und *Hpa* II) durchgeführt. Bei drei in ihren „Fingerprints“ bis dahin kaum unterscheidbaren Isolaten (20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6) wurde mit drei weiteren Enzymen restringiert (*Bsu* RI, *Bsh* 1236I und *Mbo* I). Für die Auswertung wurden nur Fragmente mit einer molekularen Größe über 200 bp herangezogen.

Die Restriktion mit *Hin* 6I (s. Abb. 3.1) ergab bei sechs Isolaten ein identisches Bandenmuster mit je zwei anderen Isolaten (20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 sowie 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6). Bei drei weiteren Isolaten (88/2-1, 88/2-3 und 88/2-7) waren die „Fingerprints“ sehr ähnlich. Deutliche Polymorphismen zeigten lediglich die Isolate 88/2-2 und 88/2-4.

Die Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 wiesen je vier identische Fragmente auf, die alle kleiner als 1.031 bp waren. Mit ebenfalls jeweils vier Banden, alle <500 bp, zeigten die Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 ebenfalls keinerlei Unterschiede. Zwei (Isolat 88/2-3 und 88/2-7) der drei in ihren Bandenmustern ähnlichen Isolate wiesen je zwei Banden bei etwa 1.100 und 450 bp Länge auf. Das Isolat 88/2-3 besaß zusätzlich noch ein sehr schwaches Fragment von ca. 1.031 bp. Ein nur geringfügig anderes Bandenmuster im Vergleich mit diesen beiden Isolaten zeigte das Isolat 88/2-1. Es besaß ebenfalls nur zwei Banden bei etwa 1.031 und 450 bp.

---

<sup>5</sup> Bezeichnung der Isolate: setzt sich aus der während der Fahrt ANT XV/4 beprobten Station (s. Kap. 2.1), dem Cast und dem Isolat zusammen (Station/Cast-Isolat)



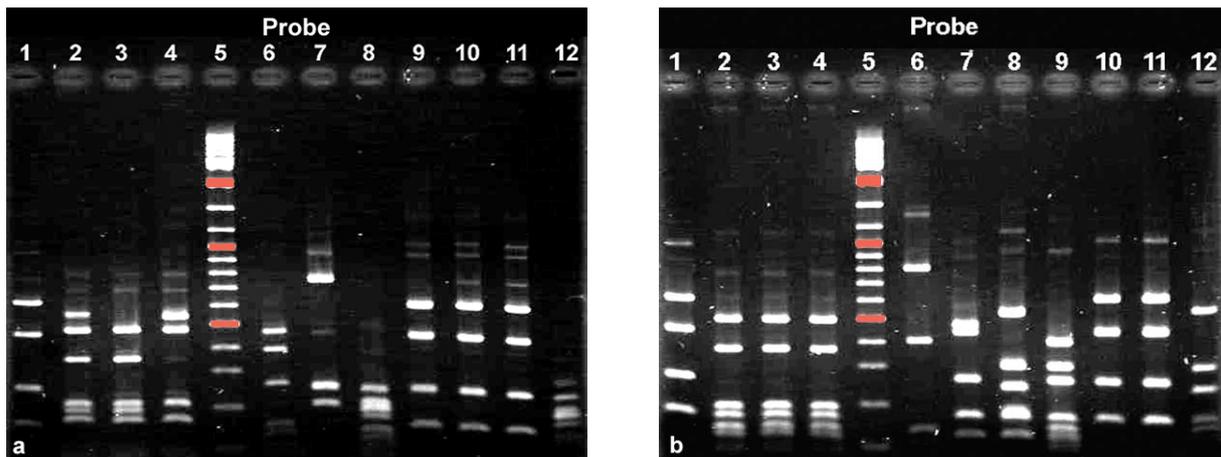
**Abb. 3.1:** ARDRA-Bandenmuster der elf Antarktisisolate nach Restriktion mit *Hin 6I*.  
 Probe 5 und 13: GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, MBI Fermentas  
 (drei Bandenlängen farbig markiert)

Probe 1: Isolat 20/1-1	Probe 2: Isolat 20/1-2
Probe 3: Isolat 20/1-3	Probe 4: Isolat 20/1-4
Probe 6: Isolat 88/2-1	Probe 7: Isolat 88/2-2
Probe 8: Isolat 88/2-3	Probe 9: Isolat 88/2-4
Probe 10: Isolat 88/2-5	Probe 11: Isolat 88/2-6
Probe 12: Isolat 88/2-7	

Nach einer Restriktion mit den Enzymen *Alu I* und *Hpa II* (s. Abb. 3.2a und b) zeigten lediglich die Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 keinerlei Polymorphismen. Beim erstgenannten Isolat waren die Banden um 1.031 bp allerdings nur sehr schwach ausgeprägt. Isolat 88/2-4 zeigte nach der Restriktion mit *Alu I* ein diesen drei Isolaten ähnliches Bandenmuster. Ihm fehlte lediglich ein Fragment bei etwa 700 bp. Nach der Restriktion mit *Hpa II* unterschied es sich, wie schon nach der mit *Hin 6I* (s. Abb. 3.1), aber wieder deutlich von diesen Isolaten.

Die in der Untersuchung mit *Hin 6I* (s. Abb. 3.1) hinsichtlich ihrer „Fingerprints“ ebenfalls identischen Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 zeigten auch nach der Restriktion mit *Hpa II* keinerlei Polymorphismen (s. Abb. 3.2b). Unterschiede in ihren Bandenmustern, von nur zwei bzw. drei Banden, wiesen sie nur nach der Restriktion mit *Alu I* auf (s. Abb. 3.2a). Somit konnten auch diese Isolate verschiedenen ARDRA-Gruppen zugeordnet werden (s. Kap. 2.8.3).

Das Bandenmuster von Isolat 88/2-2 unterschied sich wiederum deutlich von allen anderen Isolaten und stellt somit ebenfalls eine eigene ARDRA-Gruppe dar. Auch das Isolat 88/2-1 ließ sich nun in eine eigene Gruppe einteilen, da sich das Bandenmuster nach der Restriktion mit *Alu I* und *Hpa II* eindeutig von denen der anderen Isolate unterscheiden ließ. Die Isolate 88/2-3 und 88/2-7, die sich nach der Restriktion mit *Hin 6I* (s. Abb. 3.1) nur geringfügig unterschieden, zeigten auch mit *Alu I* und *Hpa II* wiederum sehr ähnliche „Fingerprints“. Sie sind demnach eng miteinander verwandt, konnten aber eigenen ARDRA-Gruppen zugeordnet werden.



**Abb. 3.2:** ARDRA-Bandenmuster der elf Antarktis isolates nach Restriktion mit *Alu* I (a) und *Hpa* II (b).

Probe 1: Isolat 20/1-1

Probe 3: Isolat 20/1-3

Probe 5: GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, MBI Fermentas (rot markierte Banden s. Abb. 3.1)

Probe 6: Isolat 88/2-1

Probe 8: Isolat 88/2-3

Probe 10: Isolat 88/2-5

Probe 12: Isolat 88/2-7

Probe 2: Isolat 20/1-2

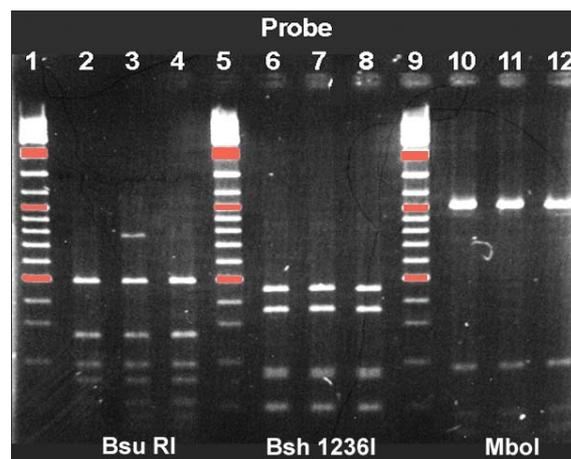
Probe 4: Isolat 20/1-4

Probe 7: Isolat 88/2-2

Probe 9: Isolat 88/2-4

Probe 11: Isolat 88/2-6

Zur weiteren Unterscheidung der Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 wurde eine zusätzliche Restriktion mit *Bsh* 1236I, *Bsu* RI und *Mbo* I durchgeführt (s. Abb. 3.3). Die Fingerprints der Isolate 20/1-1 und 88/2-6 zeigten nach der Restriktion mit diesen Enzymen keinerlei Unterschiede. Das Isolat 88/2-5 wies lediglich nach der Restriktion mit *Bsu* RI bei etwa 800 bp eine zusätzliche Bande auf. Demnach bildeten die Isolate 20/1-1 und 88/2-6 eine ARDRA-Gruppe und das mit ihnen eng verwandte Isolat 88/2-5 eine weitere.



**Abb. 3.3:** ARDRA-Bandenmuster der Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 nach Restriktion mit *Bsu* RI (Probe 2 bis 4), *Bsh* 1236I (Probe 6 bis 8) und *Mbo* I (Probe 10 bis 12).

Probe 1, 5 und 9: GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, MBI Fermentas (rot markierte Banden s. Abb. 3.1)

Probe 2, 6 und 10: Isolat 20/1-1

Probe 3, 7 und 11: Isolat 88/2-5

Probe 4, 8 und 12: Isolat 88/2-6

### 3.1.1 Einteilung in ARDRA-Gruppen

Werden die Ergebnisse aller durchgeführten Restriktionen (drei bzw. sechs verschiedene Enzyme) zusammen betrachtet, so können die elf Isolate in zehn verschiedene ARDRA-Gruppen eingeteilt werden (s. u.). Neun Isolate zeigten bei zumindest einem Enzym ein von allen anderen Isolaten unterscheidbares Bandenmuster. Die Gruppen sind zum Teil aber sehr eng miteinander verwandt, da teilweise der Unterschied lediglich in dem Vorhandensein einer einzigen Bande bestand. Eine ganz eigene ARDRA-Gruppe stellte das Isolat 88/2-2 dar, da es bei den verwendeten Restriktionsenzymen (*Hin* 6I, *Alu* I und *Hpa* II) immer deutliche Polymorphismen aufwies, und lediglich die Isolate 20/1-1 und 88/2-6 bildeten zusammen eine Gruppe. Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede in den „Fingerprints“ wurden die Isolate in folgende Gruppen eingeteilt:

<b>I</b>	Isolat 88/2-2	<b>II</b>	Isolat 20/1-1 und Isolat 88/2-6
<b>III</b>	Isolat 88/2-5	<b>IV</b>	Isolat 20/1-2
<b>V</b>	Isolat 20/1-3	<b>VI</b>	Isolat 20/1-4
<b>VII</b>	Isolat 88/2-3	<b>VIII</b>	Isolat 88/2-7
<b>IX</b>	Isolat 88/2-1	<b>X</b>	Isolat 88/2-4

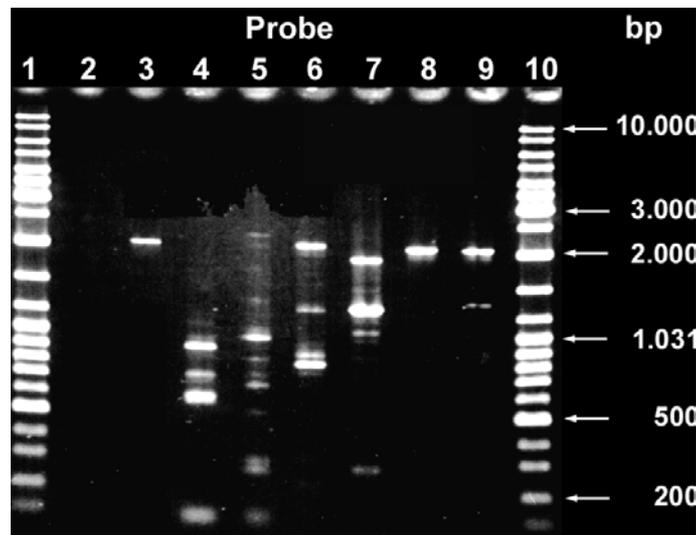
Dabei sind eng verwandte Isolate (wenige unterschiedliche Banden) in den gleichen Farben dargestellt. Die beiden Isolate 88/2-1 und 88/2-4 zeigten lediglich bei jeweils einer Restriktion ein den Gruppen VII und VIII bzw. II und III ähnliches Bandenmuster und wurden deshalb in einer Farbe dargestellt, die den jeweiligen Gruppen ähnlich ist.

### 3.2 Analyse der RAPD-PCR

Die RAPD-PCR wurde lediglich mit sieben Isolaten durchgeführt, da von HEUCHERT (1999) diesbezüglich bereits vier Isolate (20/1-2, 88/2-3, 88/2-4 und 88/2-7) untersucht worden waren. Da bei der RAPD-PCR eine Unterscheidung bis hin zum Stamm-Niveau möglich ist, konnten mit Hilfe dieser Methode die Ergebnisse der ARDRA ergänzt werden. In den Abbildungen 3.4a und b sind die nach durchgeführter Multiplex-Primer-Reaktion (s. Kap. 2.8.4) erhaltenen Bandenmuster im Vergleich mit einem DNA-Standard (GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, MBI Fermentas) dargestellt.

Die RAPD-Analyse ergab insgesamt 22 verschiedene Fragmente zwischen 2000 und 200 bp Länge (s. Abb. 3.4b). Keines der sieben Isolate zeigte ein mit einem anderen Isolat übereinstimmendes Bandenmuster. Die Isolate 20/1-1 (Probe 3), 88/2-5 (Probe 8) und 88/2-6 (Probe 9) zeigten sehr ähnliche „Fingerprints“ mit nur einer bzw. zwei zusätzlichen Banden (s. Abb. 3.4b). Diese drei Isolate hatten schon während der ARDRA sehr ähnliche „Fingerprints“ gezeigt (s. Kap. 3.1) und konnten zwei eng miteinander verwandten ARDRA-Gruppen zugeordnet werden.

Basierend auf einer in PAUP berechneten Distanzmatrix (s. Tab. 6.1, Kap. 6.3) erfolgte die phenetische Auswertung der RAPD mit dem UPGMA-Verfahren (s. Kap. 2.6.4.4). Die insgesamt 22 Fragmente zwischen 2000 und 200 bp gingen als „Bande vorhanden“ (1) bzw. „Bande nicht vorhanden“ (0) in die Datenmatrix ein. Im UPGMA-Phenogramm (s. Abb. 3.5) war keine Clusterbildung erkennbar.



**Abb. 3.4a:** RAPD-Bandenmuster von sieben Antarktisisolaten nach Multiplex-Primer-Reaktion mit CRA22 und CRA23

Probe 1 und 10: GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, MBI Fermentas

Probe 2: Blindprobe, ohne DNA

Probe 4: Isolat 20/1-3

Probe 6: Isolat 88/2-1

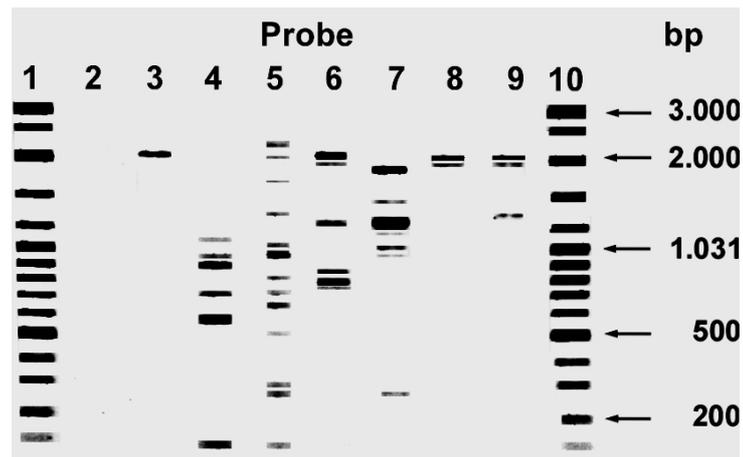
Probe 8: Isolat 88/2-5

Probe 3: Isolat 20/1-1

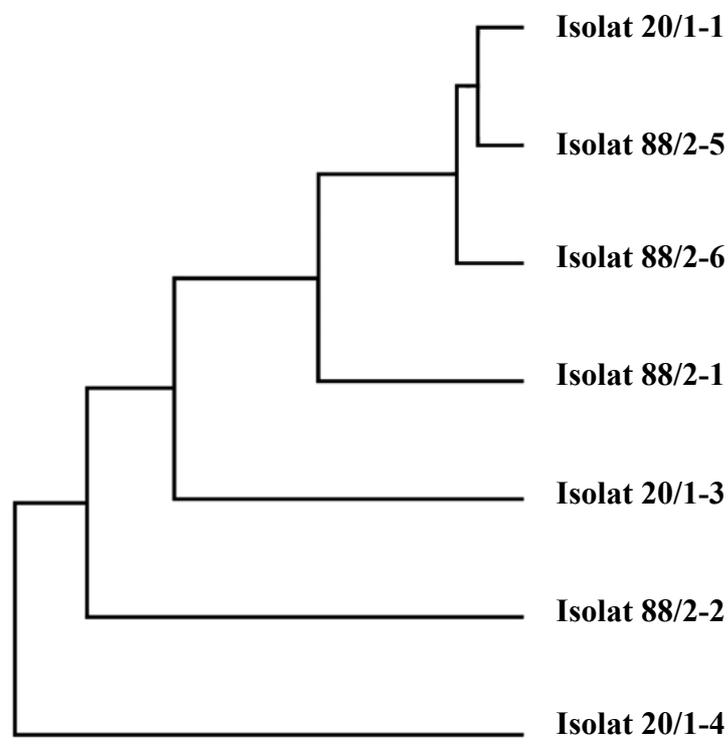
Probe 5: Isolat 20/1-4

Probe 7: Isolat 88/2-2

Probe 9: Isolat 88/2-6



**Abb. 3.4b:** Visuell markierte RAPD-Bandenmuster von sieben Antarktisisolaten nach Multiplex-Primer-Reaktion mit CRA22 und CRA23. Die unterschiedlichen Dicken und Farbstärken der Banden entsprechen deren Intensitäten. Die Bezeichnung der Proben ist der Legende von Abb. 3.4a zu entnehmen.



**Abb. 3.5:** Auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.1; Kap. 6.3) der visuell ausgewerteten RAPD-Bandenmuster (s. Abb. 3.4a und b) basierendes UPGMA-Phenogramm von sieben Antarktisisolaten. Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

### 3.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sollte der Eingliederung der Reinkulturen in die Bakteriengruppen Eubacteria (Sonde EUB338), Archaea (ARCH915), *Cytophaga-Flavobacteria* (CF319a) sowie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* (ALF968, BET42a und GAM42a) dienen. Alle Isolate hybridisierten mit der EUB338-Sonde. Die vier Isolate 20/1-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6

zeigten jeweils mit der  $\alpha$ - und die zwei Isolate 20/1-3 und 20/1-4 jeweils mit der  $\gamma$ -Proteobakterien-Sonde ein Signal. Nur das Isolat 88/2-1 gehörte der Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria* an und hybridisierte mit der Sonde CF319a (s. Tab. 3.1). Das Isolat 20/1-2, das bei den von HEUCHERT (1999) durchgeführten Untersuchungen mit keiner der Sonden hybridisiert hatte, zeigte bei den in der vorliegenden Arbeit erneut durchgeführten Hybridisierungen ein eindeutiges Signal mit der  $\gamma$ -Proteobakterien-Sonde. Damit konnten jeweils fünf der elf isolierten Reinkulturen aus der Antarktis den  $\alpha$ - bzw. den  $\gamma$ -Proteobakterien zugeordnet werden (s. Tab. 3.1), da die Ergebnisse von HEUCHERT (1999) schon gezeigt hatten, dass das Isolat 88/2-4 den  $\alpha$ - und die Isolate 88/2-3 und 88/2-7 den  $\gamma$ -Proteobakterien zugeordnet werden konnten.

**Tab. 3.1:** Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der elf Antarktisisolate mit verschiedenen Oligonucleotid-Sonden<sup>a</sup>

Isolat	Oligonucleotid-Sonde					
	EUB338	ARCH915	ALF968	BET42a	GAM42a	CF319a
20/1-1	+	-	+	-	-	-
20/1-2	+	-	-	-	+	-
20/1-3	+	-	-	-	+	-
20/1-4	+	-	-	-	+	-
88/2-1	+	-	-	-	-	+
88/2-2	+	-	+	-	-	-
88/2-3 <sup>b</sup>	+	-	-	-	+	-
88/2-4 <sup>b</sup>	+	-	+	-	-	-
88/2-5	+	-	+	-	-	-
88/2-6	+	-	+	-	-	-
88/2-7 <sup>b</sup>	+	-	-	-	+	-

<sup>a</sup> EUB338, Eubacteria; ARCH915, Archaea; ALF968,  $\alpha$ -Proteobacteria; BET42a,  $\beta$ -Proteobacteria; GAM42a,  $\gamma$ -Proteobacteria; CF319a, *Cytophaga-Flavobacteria*

<sup>b</sup> Daten von HEUCHERT (1999)

+, Signal; -, kein Signal

### 3.4 Morphologie

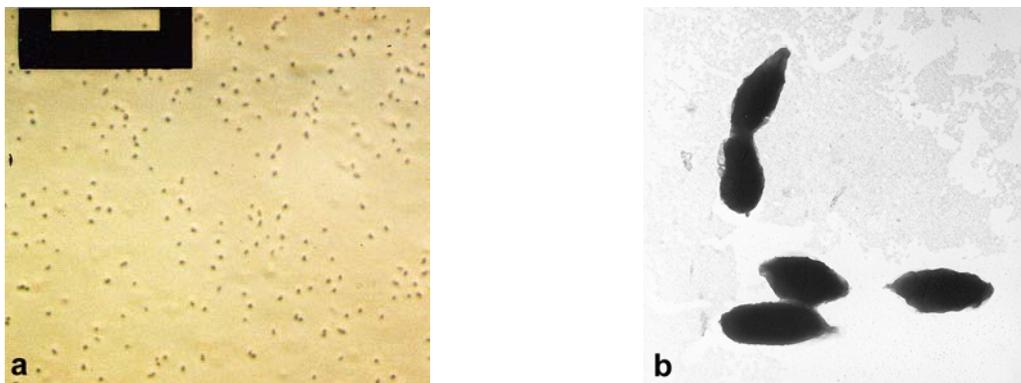
Zum besseren Vergleich der einzelnen Antarktisisolate werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (Bestimmung der Zellgrößen<sup>6</sup>, Schwärmagar-Test<sup>7</sup> und Untersuchung im TEM<sup>7</sup>) durch eine kurze Darstellung der bereits bei HEUCHERT (1999) beschriebenen Kolonie- und Zellmorphologie der auf bzw. in ASN<sub>III</sub>-Agar und –Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität

<sup>6</sup> gilt für die Isolate 20/1-1, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6

<sup>7</sup> gilt für die Isolate 20/1-1, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6

3,4%, pH 7,8-8,2) unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) gewachsenen Isolate ergänzt. Bei allen untersuchten Isolaten handelte es sich um aerobe, heterotrophe Zellen.

**Isolat 20/1-1** Die milchig weißen Kolonien waren rund, konvex, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich kurze Gram-negative Stäbchen ( $0,7 \pm 0,07 \mu\text{m} \times 1,27 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ) mit runden, teilweise leicht spitz zulaufenden Zellenden, die hauptsächlich einzeln vorlagen (s. Abb. 3.6a) und unbeweglich waren. Auf einer über 13 Tage beobachteten Schwärmagarplatte (s. Kap. 2.5.1.1) wuchs die Kultur bei  $27^\circ\text{C}$  nur am Impfpunkt und nach einer Negativkontrastierung waren keine Geißeln erkennbar (s. Abb. 3.6b).



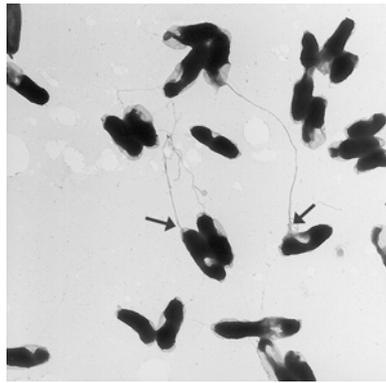
**Abb. 3.6:** Photographien von Isolat 20/1-1

a) Lichtmikroskopische Aufnahme einer 5 Tage alten unter Standardbedingungen inkubierten Kultur (s. Kap. 2.4.3). Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht  $20 \mu\text{m}$ .

b) Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung,  $20.000 \times$ ) einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur.

**Isolat 20/1-2** Die grau durchscheinenden Kolonien waren rund, flach, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Es waren Gram-negative Stäbchen ( $<1 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ) mit runden Zellenden, die einzeln vorlagen und monopolar monotrich begeißelt waren (HEUCHERT, 1999).

**Isolat 20/1-3** Dieses Isolat wuchs auf  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Agar (s. Kap. 2.4.4.2) als graue, durchscheinende, runde und konvexe Kolonien, die einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und eine weiche Konsistenz besaßen. Es handelte sich um Gram-negative Stäbchen ( $<1 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$ , DE SILVA, 2001) mit runden Zellenden, die einzeln vorlagen. Das Isolat war beweglich, nach 24 h Inkubation bei  $27^\circ\text{C}$  auf Schwärmagar hatte es sich über einen Durchmesser von 1,3 cm ausgebreitet. Mit Hilfe der Negativkontrastierung wurde eine monopolar monotriche Begeißelung nachgewiesen (s. Abb. 3.7).



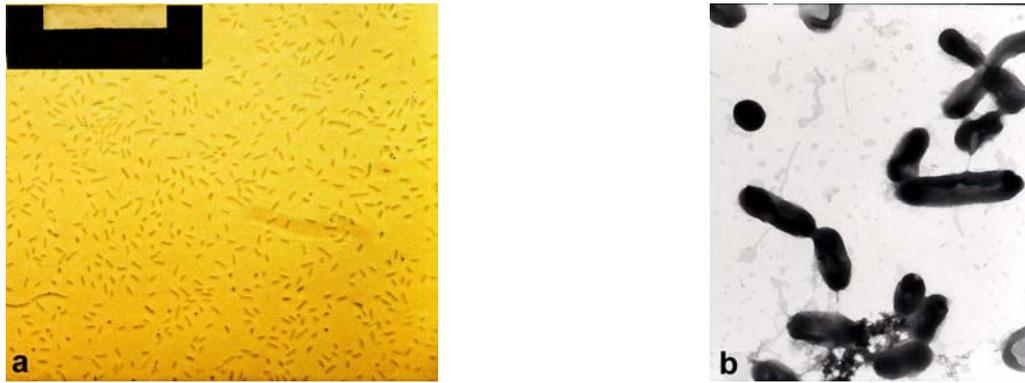
**Abb. 3.7:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung, 8.000 x) einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur von Isolat 20/1-3, das eine monopolar monotriche Begeißelung aufweist (←).

**Isolat 20/1-4** Die durchscheinenden Kolonien waren rund, flach, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Es waren Gram-negative Stäbchen ( $<1 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$ , DE SILVA, 2001) mit runden bis spitzen Enden, die einzeln oder zu zweit vorlagen und beweglich waren. Das Isolat hatte sich innerhalb von 24 h Inkubation bei  $27^\circ\text{C}$  auf Schwärmagar über einen Durchmesser von 0,7 cm ausgebreitet. Die Negativkontrastierung zeigte hier ebenfalls eine monopolar monotriche Begeißelung (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung, 12.500 x) einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur von Isolat 20/1-4, das eine monopolar monotriche Begeißelung aufweist (←).

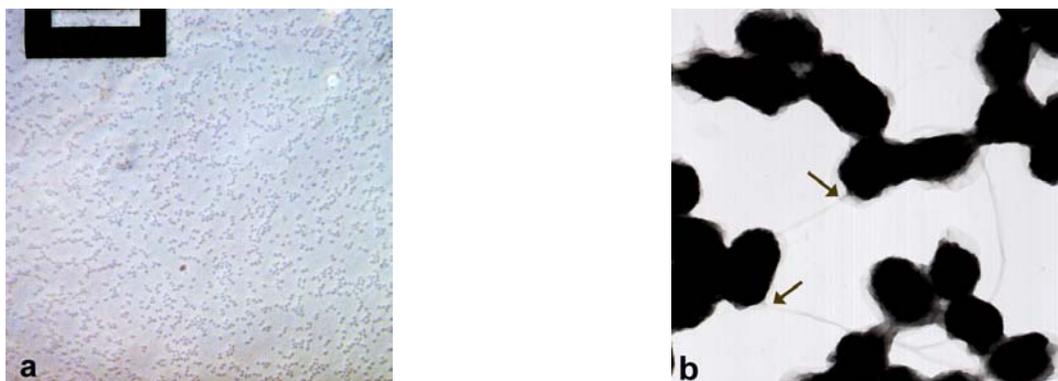
**Isolat 88/2-1** Die gelb-orangefarbenen Kolonien (s. Abb. 3.20) waren rund, konvex, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich kurze und lange Gram-negative Stäbchen ( $0,3 \pm 0,05 \mu\text{m} \times 2,34 \pm 1,15 \mu\text{m}$ , max.  $0,37 \mu\text{m} \times 18,61 \mu\text{m}$ ) mit runden Zellenden, die einzeln oder in kurzen Ketten vorlagen (s. Abb. 3.9a). Sowohl die Untersuchung der Beweglichkeit auf Schwärmagar (bis 13 Tage nach Beimpfung) als auch die Negativkontrastierung zeigten, dass das Isolat unbeweglich war und keinerlei Geißeln besaß (s. Abb. 3.9b).



**Abb. 3.9:** Photographien von Isolat 88/2-1

- a)** Lichtmikroskopische Aufnahme einer 2 Tage alten unter Standardbedingungen inkubierten Kultur (s. Kap. 2.4.3). Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht 20 µm.  
**b)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung, 16.000 x) einer 3 Tage bei RT (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur.

**Isolat 88/2-2** Die milchig cremefarbenen Kolonien, deren Zentren sich mit zunehmendem Alter bräunlich färbten, waren rund, flach, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich Gram-negative kokkoide Stäbchen ( $0,85 \pm 0,13 \mu\text{m} \times 1,18 \pm 0,16 \mu\text{m}$ ), die einzeln vorlagen (s. Abb. 3.10a) und beweglich waren. Nach der Negativkontrastierung wiesen sie eine bis zwei polare oder subpolare Geißeln auf (s. Abb. 3.10b). Auf Schwärmagar breitete sich das Isolat innerhalb von sechs Tagen über einen Durchmesser von etwa 0,2 cm aus.



**Abb. 3.10:** Photographien von Isolat 88/2-2

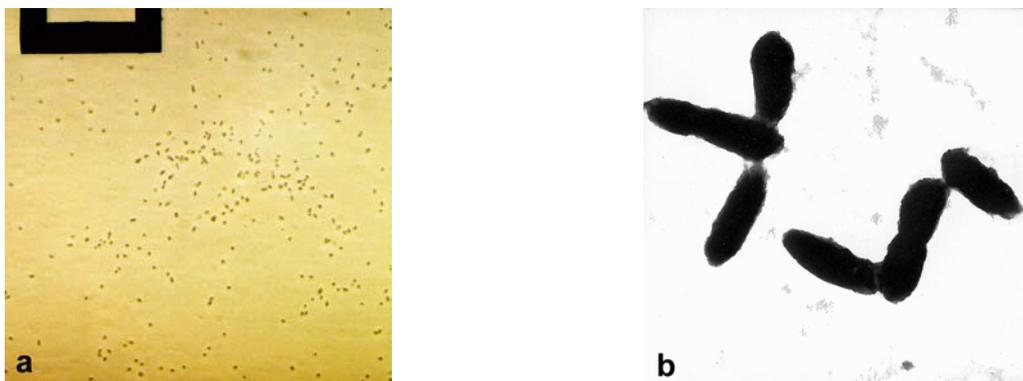
- a)** Lichtmikroskopische Aufnahme einer 3 Tage alten unter Standardbedingungen inkubierten Kultur (s. Kap. 2.4.3) auf einem Agarslide. Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht 20 µm.  
**b)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung, 16.000 x) polar bzw. subpolar begeißelter (←) Zellen einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur.

**Isolat 88/2-3** Die milchig weißen Kolonien waren rund, konvex, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen

Bild zeigten sich kokkoide, unbewegliche Gram-negative Stäbchen ( $1\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ ) mit abgeflachten Zellenden, die einzeln, zu zweit oder in kurzen Ketten vorlagen (HEUCHERT, 1999).

**Isolat 88/2-4** Die grauen Kolonien waren rund, flach, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich kurze und lange Gram-negative Stäbchen ( $<1\ \mu\text{m} \times 1,5\ \mu\text{m}$  bis zu  $1\ \mu\text{m} \times 22\ \mu\text{m}$ ) mit runden Zellenden, die einzeln, zu zweit oder in kurzen Ketten vorlagen. Die Zellen zeigten eine geradlinige, schnelle Bewegung und besaßen eine oder mehrere subpolare Geißeln (HEUCHERT, 1999).

**Isolat 88/2-5** Die beigefarbenen Kolonien waren rund, konvex, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich hauptsächlich einzeln vorliegende Gram-negative Stäbchen ( $0,7 \pm 0,11\ \mu\text{m} \times 1,43 \pm 0,23\ \mu\text{m}$ ) mit runden Zellenden (s. Abb. 3.11), die sich im Schwärmagar während einer Inkubationszeit von 13 Tagen nicht ausbreiteten und nach Negativkontrastierung keine Geißeln erkennen ließen (s. Abb. 3.11b).

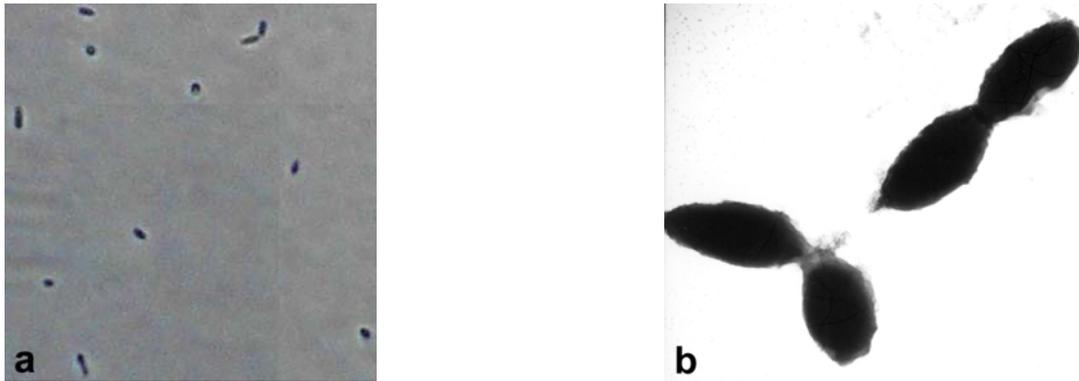


**Abb. 3.11:** Photographien von Isolat 88/2-5

**a)** Lichtmikroskopische Aufnahme einer 5 Tage alten unter Standardbedingungen inkubierten Kultur (s. Kap. 2.4.3). Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

**b)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung,  $16.000 \times$ ) einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur.

**Isolat 88/2-6** Die beigefarbenen Kolonien waren rund, konvex, hatten einen glatten Rand sowie eine glänzende, glatte Oberfläche und besaßen eine weiche Konsistenz. Im mikroskopischen Bild zeigten sich Gram-negative Stäbchen ( $0,76 \pm 0,05\ \mu\text{m} \times 1,48 \pm 0,33\ \mu\text{m}$ ) mit runden Zellenden, die einzeln oder zu zweit vorlagen (s. Abb. 3.12a). Im Lichtmikroskop zeigten die Zellen eine taumelnde Bewegung, breiteten sich im Schwärmagar während einer Inkubationszeit von 14 Tagen allerdings nicht aus. Im TEM waren keine Geißeln erkennbar (s. Abb. 3.12b).



**Abb. 3.12:** Photographien von Isolat 88/2-6

a) Lichtmikroskopische Aufnahme einer 3 Tage alten unter Standardbedingungen inkubierten Kultur (s. Kap. 2.4.3).

b) Elektronenmikroskopische Aufnahme (Negativkontrastierung, 25.000 x) einer 24 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Kultur.

**Isolat 88/2-7** Die Eigenschaften dieses Isolates sind bei HEUCHERT et al. (2004; s. Kap. 8) eingehend beschrieben.

### 3.5 Physiologie

#### 3.5.1 Temperaturoptimum, pH-Wert und NaCl-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, pH-Wert und NaCl-Konzentration) wurde die O. D. der Kulturen bei 600 nm photometrisch über eine Dauer von maximal 14 Tagen bestimmt. Die resultierenden Wachstumskurven der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate 20/1-1, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6 sind im Anhang (s. Kap. 6.2) dargestellt. Da die Versuche in Reagenzgläsern durchgeführt wurden, konnten während der O. D.-Messungen keine Verdünnungen hergestellt werden. Zu Versuchsbeginn lag die O. D.<sub>600nm</sub> im Durchschnitt bei etwa 0,002 (bis max. 0,023; Daten nicht gezeigt). O. D.-Werte zwischen 0,05 und 0,2 wurden als geringes Wachstum eingestuft, bei Werten <0,05 lag die jeweilige Bedingung außerhalb des Wachstumsbereiches des jeweils getesteten Isolates. Diese Daten wurden im Anhang nicht dargestellt.

Alle untersuchten Isolate (s. o.) zeigten im Bereich von 5-30 °C bzw. 5-40 °C (Isolat 88/2-2) Wachstum (s. Tab. 3.2, Wachstumskurven s. Kap. 6.2.1). Ihre optimalen Wachstumstemperaturen lagen in Bereichen von 10-35 °C (Isolat 88/2-2), 10-23 °C (Isolat 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6) bzw. 15-23 °C (Isolat 88/2-1). Bei den höheren Temperaturen (30 bzw. 40 °C) trat bei allen Isolaten leicht vermindertes bzw. sehr schlechtes (Isolat 88/2-2) Wachstum auf. Bei Temperaturen unterhalb des Optimums (5 bzw. 10 °C) erreichten die Isolate meistens ebenfalls die maximale

---

O. D., zeigten allerdings dann eine längere lag-Phase (15-40 h). Nur Isolat 88/2-6 wies bei 5 °C neben einer längeren lag-Phase auch eine verminderte O. D. auf.

Mit Ausnahme von Isolat 88/2-6 benötigten alle Isolate zum Wachstum NaCl (s. Tab. 3.2, Wachstumskurven s. Kap. 6.2.2). Dieses Isolat zeigte bei einer NaCl-Konzentration von 0-4% (w/v) optimales Wachstum, das sich bei höheren Konzentrationen aber immer stärker verminderte. Ab 14% (w/v) NaCl stellte das Isolat sein Wachstum ein. Bei den anderen untersuchten Isolaten zeigte sich ohne NaCl kein Wachstum. Die optimale NaCl-Konzentration der Isolate 20/1-1, 88/2-1 und 88/2-5 lag zwischen 2 und 4% (w/v). Bei 6% (w/v) NaCl zeigten sie vermindertes und bei höheren Konzentrationen nur noch sehr geringes Wachstum (O. D.-Werte <0,1) oder stellten es ein. Das Isolat 88/2-2 zeigte bei 2-10% (w/v) optimales Wachstum, bei 12% (w/v) vermindertes und ab 14% (w/v) NaCl kein Wachstum mehr.

Beim Wachstum mit verschiedenen pH-Werten des ungepufferten Mediums zeigten die untersuchten Isolate verschiedene optimale Bereiche (s. Tab. 3.2, Wachstumskurven s. Kap. 6.2.3). So konnten die Isolate 20/1-1 und 88/2-5 bei einem pH von 5 bis 10 optimal wachsen. Während Isolat 88/2-5 aber auch nur in diesem Bereich Wachstum aufwies, konnte das Isolat 20/1-1, wenn auch nur sehr schwach und erst nach einer langen lag-Phase (>6 Tage), noch bei einem pH von 4 wachsen. Im Bereich von pH 5 bis 10 zeigten auch die Isolate 88/2-2 und 88/2-6 Wachstum. Für das zuerst genannte Isolat waren die pH-Werte 6 bis 10, für das zuletzt genannte die pH-Werte 6 bis 9 optimal. Bei pH 5 erreichten beide Isolate ebenfalls die maximalen O. D.-Werte, die sie auch bei den optimalen pH-Werten erreichten, wiesen dabei aber beide eine längere lag-Phase auf (ca. 50 h bzw. ca. 30 h). Bei pH 10 wies das Isolat 88/2-6 nur noch vermindertes Wachstum auf.

Den engsten Wachstumsbereich (pH 6-10), mit einem optimalen pH von 7 bis 8, wies das Isolat 88/2-1 auf. Bei allen gemessenen pH-Werten zeigte das Isolat eine relativ lange lag-Phase (zwischen 30 und 75 h). Möglicherweise wurde aus einer Vorkultur beimpft, die sich nicht in der log-Phase befand, denn bei der Bestimmung der optimalen Temperatur wies der Ansatz bei 23 °C eine solche lag-Phase nicht auf.

Die Überprüfung der pH-Werte nach Beendigung der jeweiligen O. D.-Messungen zeigte (Daten nicht dargestellt), dass die Bakterien den pH-Wert der Medien während des Wachstums immer auf einen Wert von etwa 8,1 bis 8,7 (je höher der Ausgangs-pH, desto höher auch der pH bei der Überprüfung) eingestellt hatten, während die unbeimpften Medien (Kontrollen) in etwa den sel-

ben pH-Wert aufwiesen wie zu Beginn des Versuches. Lediglich die Kontrolle des pH 10-Ansatzes wies ebenfalls einen niedrigeren pH auf (etwa 8,5). Wann hier die pH-Wert-Änderung eingetreten war, konnte nicht geklärt werden.

**Tab. 3.2:** Optimale Wachstumsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, NaCl-Konzentration) sowie Wachstumsbereiche der fünf Antarktisisolate 20/1-1, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6

Isolat	Temperatur (°C)		NaCl-Konzentration (%)		pH-Wert	
	Wachstumsbereich <sup>a</sup>	optimal	Wachstumsbereich <sup>a</sup>	optimal	Wachstumsbereich <sup>a</sup>	optimal
20/1-1	5-30	10-23	2-6	2-4	4-10	5-10
88/2-1	5-30	15-23	2-6	2-4	6-10	7-8
88/2-2	5-40	10-35	2-12	2-10	5-10	6-10
88/2-5	5-30	10-23	2-8	2-4	5-10	5-10
88/2-6	5-30	10-23	0-12	0-4	5-10	6-9

<sup>a</sup> Zur Festlegung des Wachstumsbereiches siehe 1. Absatz in Kapitel 3.5.1.

### 3.5.2 Enzyme

Nahezu alle untersuchten Isolate waren sowohl Katalase- als auch Oxidase-positiv, es fand eine mehr oder weniger starke Entwicklung von Sauerstoffbläschen bzw. eine Blaufärbung des Teststreifens statt (Daten nicht gezeigt). Eine Ausnahme bildete Isolat 88/2-1, das keines der beiden Enzyme besaß.

Das Polysaccharid Stärke konnte neben den zu den  $\gamma$ -Proteobakterien gehörenden Isolaten 20/1-3 und 20/1-4 (DE SILVA, 2001) nur noch das Isolat 88/2-1 hydrolysieren, der einzige Vertreter der Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria* (s. Tab. 3.3). Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolaten sind die Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 zwar in der Lage, Glucose und auch das Disaccharid Cellobiose abzubauen, sie besitzen aber keine Amylase, um das ebenfalls aus Glucoseeinheiten aufgebaute Stärkemolekül hydrolysieren zu können. Dies war auch schon bei den Isolaten 88/2-4 und 20/1-2 (HEUCHERT, 1999) festgestellt worden. Alle anderen Isolate besitzen ebenfalls keine Amylase, bei ihnen färbte sich die gesamte Agarplatte nach Zugabe von Lugolscher Lösung blau.

Der Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria* (Isolat 88/2-1) und zwei  $\gamma$ -Proteobakterien (Isolat 20/1-3 und 20/1-4) waren neben dem schon von HEUCHERT (1999) untersuchten Isolat 20/1-2 ( $\gamma$ -Proteobacteria) die einzigen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate, die Gelatine hydrolysieren konnten (s. Tab. 3.3). Die Überschichtung der Agarplatte mit gesättigter Pikrinsäurelösung ergab nur bei diesen Organismen einen klaren Hof um den Bakterienausstrich. Bei

---

allen anderen bildete die nicht abgebaute Gelatine mit der Pikrinsäurelösung (s. o.) einen gelben Farbkomplex.

Der Besitz von Cellulase konnte mit Hilfe des durchgeführten Tests bei keinem untersuchten Isolat nachgewiesen werden (s. Tab. 3.3). Einige zeigten zwar Wachstum auf den Cellulosehaltigen Agarplatten (Isolat 20/1-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6), eine Hofbildung konnte aber über einen Zeitraum von 14 Tagen nie beobachtet werden.

### 3.5.3 Kohlenstoffverwertung

In diesen Versuchen (Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium, BIOLOG GN und API 50 CH) sollten die für die jeweiligen Isolate verwertbaren Kohlenstoffquellen ermittelt werden. Die Substrattests mit den einzelnen C-Quellen in ASN<sub>III</sub>-Medium sollten außerdem einem Vergleich mit dem API- und BIOLOG-Testssystem dienen und zeigen, ob diese das „tatsächliche“ Substratspektrum der Isolate wiedergeben konnten.

#### 3.5.3.1 Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit unterschiedlichen C-Quellen in verschiedenen Konzentrationen (1 mM und 5 mM bzw. 0,03%, 0,06% oder 0,1% Kohlenstoff) in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) sind in Tabelle 3.3 für alle Antarktisisolate dargestellt. Auch für die bereits in den Diplomarbeiten von HEUCHERT (1999) und DE SILVA (2001) näher untersuchten Isolate 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-3, 88/2-4 und 88/2-7 wurden in der vorliegenden Arbeit noch weitere C-Quellen als mögliche Substrate getestet. Die in den Diplomarbeiten erzielten Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgeführt und wurden farblich gekennzeichnet.

Durch die Versuchsdurchführung bedingt (Ansätze in Reagenzgläsern), konnten bei den O. D.-Messungen keine Verdünnungen hergestellt werden. Zu Versuchsbeginn lag die O. D.<sub>600 nm</sub> im Durchschnitt bei etwa 0,002 (bis max. 0,023; Daten nicht gezeigt). Ein Substrat galt als verwertbar, wenn die maximale O. D. den Wert 0,05 im Versuchszeitraum von maximal 14 Tagen überstieg. Unterhalb dieses Wertes variierte die O. D. von einer Messung zur nächsten zu stark, um eine Aussage treffen zu können. Das Wachstum eines Isolates wurde als schwach ( $\pm$ ) gewertet, wenn die maximale O. D.<sub>600 nm</sub> zwischen 0,05 und 0,2 lag.

Bei den Versuchsansätzen mit 0,03%, 0,06% und 0,1% (w/v) Kohlenstoff aus Glucose wurde die Verwertbarkeit durch die Isolate nicht mittels O. D.-Messung bestimmt, sondern anhand der

---

Trübung des Mediums im Erlenmeyerkolben in positiv (+, starke Trübung), mittel ( $\pm$ , schwache Trübung) und negativ (-, Medium blieb klar) unterschieden (s. Tab. 3.3). Bei DE SILVA (2001) wurde das ASN<sub>III</sub>-Medium für die beiden Isolate 20/1-3 und 20/1-4 dagegen mit 0,03%, 0,06% und 0,1% (w/v) der jeweiligen getesteten C-Quelle versetzt.

Der einzige Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*, Isolat 88/2-1, konnte keines der 13 angebotenen Substrate verwerten. In den beiden hauptsächlich vertretenen Bakteriengruppen ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria*) waren dagegen jeweils Isolate mit großem und kleinem Substratspektrum vertreten. Alle  $\alpha$ -Proteobakterien konnten zumindest das Monosaccharid Glucose verwerten, aber nur das Isolat 88/2-4 aus dieser Gruppe konnte die Aminosäure L-Alanin nutzen (s. Tab. 3.3). Bei den  $\gamma$ -Proteobakterien schien das Substratspektrum ortsabhängig zu sein. Die Vertreter dieser Gruppe von der Station 49/088/2 (Isolat 88/2-3 und 88/2-7) zeigten sich als Spezialisten, die nur Acetat (Isolat 88/2-3) bzw. L-Alanin (Isolat 88/2-7) schwach verwerten konnten, wohingegen die Isolate dieser Gruppe von der Station 49/020/1 (Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4) alle ein relativ breites Substratspektrum aufwiesen und aus nahezu jeder Substratgruppe (Mono-, Disaccharide, Aminosäure etc.) zumindest eine angebotene Kohlenstoffquelle nutzen konnten (s. Tab. 3.3).

Beim Vergleich der beiden Probennahmestationen 49/020/1 und 49/088/2 fiel auf, dass alle Isolate der ersten Station (Isolate 20/1-1, 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4) ein relativ breites Substratspektrum aufwiesen, während vier der sieben Isolate von der zweiten Station Spezialisten waren, die keines (Isolat 88/2-1) bzw. nur eines der angebotenen Substrate (Isolate 88/2-3 und 88/2-7, s. o., sowie Isolat 88/2-2) nutzen konnten (s. Tab. 3.3). Das Isolat 88/2-2 zeigte mit Glucose lediglich bei einer Kohlenstoffkonzentration von 0,03% (w/v) schwaches Wachstum (geringe Trübung). Die übrigen drei Isolate der Station 49/088/2, die Isolate 88/2-5 und 88/2-6 sowie das bereits bei HEUCHERT (1999) untersuchte Isolat 88/2-4, konnten dagegen einen großen Teil der angebotenen Kohlenstoffquellen verwerten (s. Tab. 3.3).

Aus Tabelle 3.3 ist ersichtlich, dass die meisten Isolate mit der höheren Substratkonzentration besser wachsen konnten. Lediglich drei der elf untersuchten Isolate (Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6, alles  $\alpha$ -Proteobakterien) zeigten bei mindestens zwei Substraten (Fructose und Cellobiose) mit der geringeren Substratkonzentration besseres Wachstum bzw. keins bei der höheren Konzentration. Beim Isolat 88/2-6 war diese Tendenz zusätzlich noch beim Wachstum mit Glycerol zu beobachten. Die beiden Isolate 88/2-2 und 20/1-4 zeigten bei den höheren Glucosekonzentrationen ( $\geq 0,06\%$  C und 5 mM) und bei der niedrigsten (1 mM) kein Wachstum, konnten aber mit 0,03% C schwach wachsen.

**Tab. 3.3:** Enzymnachweis (s. Kap. 2.6.5.3-2.6.5.5) und Verwertung<sup>a</sup> verschiedener Kohlenstoffquellen unterschiedlicher Konzentrationen (1 und 5 mM oder 0,03, 0,06 bzw. 0,1% Kohlenstoff) in ASN<sub>III</sub>-Medium (3,4%, pH 7,8-8,2) durch die Antarktisololate (Inkubationstemperaturen RT bzw. 30 °C)

Enzyme bzw. Substrate	Substratkonzentration	Phylogenetische Gruppen und Isolate										CF 88/2-1
		<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					
		20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	
<b>Enzymnachweis</b>												
Amylase	2% (w/v) Stärke	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Gelatinase	0,4% (w/v) Gelatine	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Cellulase	1% (w/v) Cellulose	kH	kH	-	kH	kH	kH	-	-	kH	kH	nd
<b>Kohlenhydrate</b>												
Glucose	1 mM	±	-	±	±	±	±	±	-	-	-	nd
	5 mM	+	-	+	+	+	+	nd	nd	-	-	-
	0,03% C	+	±	+	+	+	±	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-	-	-
	0,06% C	+	-	+	+	+	+	±	± <sup>b</sup>	-	-	-
	0,1% C	+	-	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	-	-	-
Fructose	1 mM	±	-	±	±	±	±	±	-	-	-	nd
	5 mM	-	-	+	-	-	+	nd	nd	-	-	-
Maltose	5 mM	-	-	-	-	-	-	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-	-	-
Lactose	1 mM	-	-	+	-	-	±	±	±	-	-	nd
Mannose	1 mM	±	-	±	±	±	-	-	-	-	-	nd
	5 mM	+	-	+	±	nd	±	nd	nd	-	-	-
Saccharose	1 mM	+	-	+	+	+	-	nd	nd	-	-	-
	5 mM	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	nd
Cellobiose	1 mM	+	-	+	+	+	±	+	±	-	-	-
	5 mM	-	-	+	-	-	+	nd	nd	-	-	-
<b>Aminosäure</b>												
L-Alanin	5 mM	-	-	+	-	-	±	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-	±	-
<b>Carboxylsäuren (als Na-Salze)</b>												
Acetat	5 mM	+	-	±	±	-	±	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	±	-	-
Citrat	5 mM	+	-	+	±	-	+	± <sup>b</sup>	-	-	-	-
Propionat	0,03% C	+	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	0,06% C	+	-	+	+	+	±	± <sup>b</sup>	-	-	-	-
<b>Alkohol</b>												
Glycerol	0,03% C	±	-	+	-	+	±	-	-	-	-	-
	0,1% C	±	-	+	±	±	±	-	± <sup>b</sup>	-	-	-
<b>Polymer</b>												
Tween 20	0,05% (w/v)	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-

<sup>a</sup> +, Wachstum (O. D.<sub>600 nm</sub> >0,2); ±, schwaches Wachstum (O. D.<sub>600 nm</sub> 0,05-0,2); -, kein Wachstum (O. D.<sub>600 nm</sub> <0,05) innerhalb des maximalen Inkubationszeitraumes von 14 Tagen; zur Festlegung der Definition „kein Wachstum“ siehe 2. Absatz in Kapitel 3.5.3.1.

<sup>b</sup> Konzentration der C-Quelle hier: 0,03%, 0,06% bzw. 0,1% (w/v)

makroskopische Bewertung des Wachstums im Erlenmeyerkolben: +, starke Trübung, ±, nur leichte Trübung, -, kein Wachstum

kH, Wachstum, aber keine Hofbildung; nd, keine Daten; C, Kohlenstoff; Ergebnisse aus HEUCHERT (1999), Ergebnisse aus DE SILVA (2001)

Die phenetische Auswertung erfolgte mit Hilfe des UPGMA-Verfahrens (s. Kap. 2.6.4.4), basierend auf einer in PAUP berechneten Distanzmatrix (s. Tab. 6.2, Kap. 6.3). Die Messwerte aller

---

Kohlenstoffquellen (Merkmalszustände) wurden in eine binäre Matrix übersetzt, indem positive Reaktionen (Substrat verwertet, Wachstum) als 1 und negative Reaktionen (Substrat nicht verwertet, kein Wachstum) als 0 gesetzt wurden. Dabei wurde ein in den Tests eventuell als schwach beurteiltes Wachstum hier ebenfalls als „Substrat verwertet“ (1) eingestuft.

Für die Bildung der Datenmatrix der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium wurden nur die Kohlenstoffquellen herangezogen, mit denen alle elf Isolate inkubiert worden waren (s. Tab. 3.3), d. h. Lactose wurde nicht mit in die Auswertung einbezogen, da das Isolat 88/2-1 mit diesem Substrat nicht getestet worden war. Die unterschiedlich eingesetzten Kohlenstoffkonzentrationen wurden hier nicht beachtet, sondern lediglich, ob ein Isolat mit dem getesteten Substrat bei mindestens einer Konzentration Wachstum zeigte.

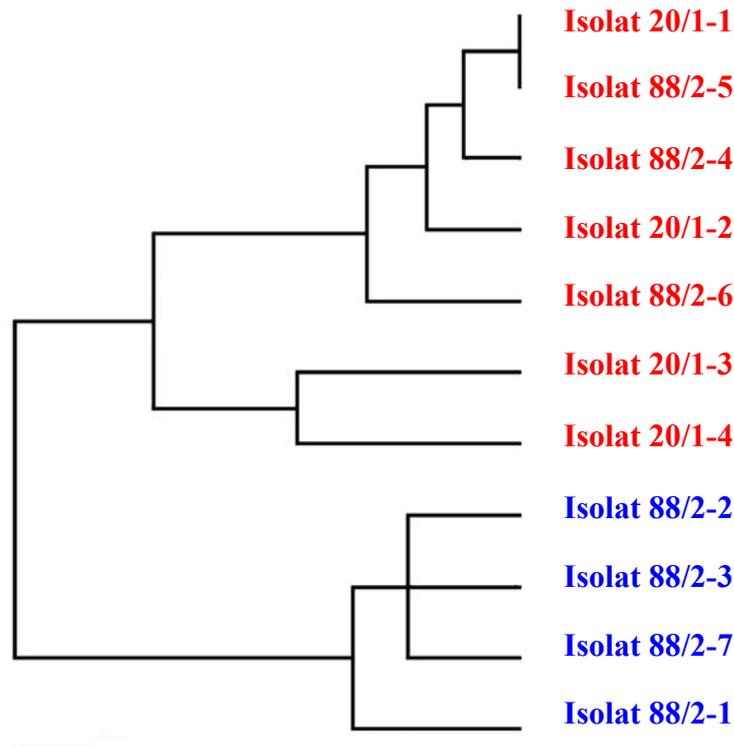
Im UPGMA-Phenogramm ergaben sich somit zwei Hauptcluster (s. Abb. 3.13):

Cluster 1 mit den Isolaten 20/1-1, 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-4, 88/2-5 und 88/2-6 und

Cluster 2 mit den Isolaten 88/2-1, 88/2-2, 88/2-3 und 88/2-7.

Die beiden Isolate 20/1-1 und 88/2-5 sind laut Phenogramm identisch. Die Daten zur Kohlenstoffverwertung in Tabelle 3.3 zeigen allerdings, dass die beiden Isolate diesbezüglich nicht absolut identisch sind. Bei manchen der untersuchten Substrate verwerteten die Organismen unterschiedliche Konzentrationen und zeigten zum Teil auch unterschiedlich gutes Wachstum. Diese beiden „Eigenschaften“ wurden hier zur Erstellung der Datenmatrix aber nicht berücksichtigt (s. o.).

Das Phenogramm lässt erkennen, dass in beiden Clustern Isolate existieren, die deutliche Abstände (Änderungen/Unähnlichkeiten) zu anderen aufweisen, also eine „Untergruppe“ bilden. Im Cluster 1 sind dies die Isolate 20/1-3 und 20/1-4, deren identischer Abstand zu den anderen Isolaten dieses Clusters relativ groß ist. Im zweiten Hauptcluster hebt sich rein optisch das Isolat 88/2-1 von den anderen Isolaten dieser Gruppe ab.



**Abb. 3.13:** Auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.2, Kap. 6.3) des Verwertungsspektrums der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Tab. 3.3) basierendes UPGMA-Phenogramm der elf Antarktisisolate. **Cluster 1, Cluster 2**  
Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

### 3.5.3.2 Auswertung des BIOLOG GN-Systems

Zusätzlich zu den Wachstumsversuchen mit verschiedenen konzentrierten Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium wurde mit Hilfe des BIOLOG-Systems die Metabolisierung 95 verschiedener Kohlenstoffquellen untersucht. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der makroskopischen Auswertung der BIOLOG-Testplatten der Isolate aus der jeweiligen Gruppe der  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Proteobakterien bzw. *Cytophaga-Flavobacteria* (Isolat 88/2-1) vergleichend dargestellt.

Die Auswertung der BIOLOG-Testplatten nach 5-6 Tagen Inkubationszeit zeigte, dass sich alle Isolate hinsichtlich ihres Substratspektrums voneinander unterschieden. Isolate mit wenigen positiven Reaktionen (Isolate 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6) wurden noch bis maximal 29 Tagen weiter inkubiert, zeigten aber auch über diesen Zeitraum keine zusätzlichen Veränderungen. Auffällig ist der große Unterschied zwischen den Verwertungsspektren der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien. Letztere zeigten alle ein relatives breites Substratspektrum, sind also eher Generalisten, die aus allen angebotenen Substratgruppen Kohlenstoffquellen nutzen konnten und zumindest immer schwaches Wachstum aufwiesen. Bei den  $\alpha$ -Proteobakterien scheint es sich mit Ausnahme des Isolates 88/2-4 um Spezialisten zu handeln, die nur ganz bestimmte Substrate zum Wachstum

---

und zur Vermehrung nutzen konnten. Die Isolate 88/2-2 und 88/2-6 konnten in diesem Test lediglich eines und Isolat 88/2-5 nur zwei der 95 Substrate verwerten. Alle drei genannten Isolate zeigten ebenso wie das Isolat 20/1-1 ausschließlich schwach positive Reaktionen. Im Vergleich mit allen hier untersuchten Isolaten, auch den  $\gamma$ -Proteobakterien und dem Vertreter aus der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe (CF), wies das Isolat 88/2-4 ( $\alpha$ -Proteobacteria) das größte Substratspektrum auf. Bis auf die angebotenen Amine und phosphorylierten Kohlenstoffquellen konnte Isolat 88/2-4 zumindest immer eines der angebotenen Substrate jeder Gruppe verwerten. Dieses Isolat ist damit das einzige seiner Gruppe, das einige der angebotenen Polymere sowie aromatischen und bromierten Substrate nutzen konnte. Diese Reaktionen waren allerdings nur schwach positiv. Aus der Gruppe der Polymere konnten dagegen alle untersuchten  $\gamma$ -Proteobakterien und auch das Isolat 88/2-1 (CF) mindestens zwei der Substrate zum Wachstum nutzen. Ebenso konnten diese Isolate mindestens ein Substrat aus der Gruppe der aromatischen und bromierten Substanzen verwerten. Keines der elf untersuchten Isolate konnte dagegen die angebotenen Amine oder phosphorylierten Substrate verwerten. Das Isolat 88/2-1 (CF) konnte außerdem mit den angebotenen Amiden, Alkoholen, Estern sowie der Brombernsteinsäure nicht wachsen. Es verwertete aber einige wenige Kohlenwasserstoffe, Aminosäuren und die Polymere Glycogen und Dextrin gut sowie einzelne Carboxylsäuren und aromatische Substrate schwach.

Um zu untersuchen, ob die Isolate ein synergistisches Verhalten zeigen, wurde eine BIOLOG GN-Testplatte mit jeweils gleichen Anteilen aller Isolate einer Station beimpft. Die Auswertung der Platten zeigte, dass die Isolate der jeweiligen Station untereinander eher eine hemmende Wirkung zu haben scheinen. Die Isolate der Station 49/020/1 ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria) profitierten lediglich bei der Verwertung von Lactulose, p-Hydroxyphenylelessigsäure und  $\alpha$ -Keto-buttersäure von der gemeinschaftlichen Inkubation. Hier waren nach fünf Tagen Inkubation positive bzw. schwach positive Farbumschläge zu beobachten, obwohl die einzelnen Isolate lediglich zu schwach positiven bzw. keinen Farbumschlägen geführt hatten. Bei einer Reihe von Substanzen wurden schwächere Farbumschläge beobachtet (negativ statt schwach positiv bzw. schwach positiv statt positiv) als bei der Auswertung der einzeln inkubierten Isolate. Dazu gehörten D-Arabitol, i-Erythritol, D-Sorbitol,  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure,  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure, Chinasäure und Glycyl-L-asparaginsäure bzw. Methylpyruvat, Monomethylsuccinat, Cis-Aconitsäure, Brombernsteinsäure und L-Asparaginsäure (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 3.4:** BIOLOG-Auswertung aller Isolate (*α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* sowie *Cytophaga-Flavobacteria*, CF). Positive Reaktionen sind jeweils mit kräftiger Farbe, schwach positive Reaktionen mit hellen Farbtönen dargestellt

Kohlenstoffquellen	Phylogenetische Gruppen und Isolate										
	<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					CF
	20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	88/2-1
<b>Kohlenwasserstoffe</b>											
N-acetyl-D-galactosamin											
N-acetyl-D-glucosamin											
Adonitol											
L-Arabinose											
D-Arabitol											
Cellobiose											
i-Erythritol											
D-Fructose											
L-Fucose											
D-Galactose											
Gentiobiose											
α-D-Glucose											
m-Inositol											
α-D-Lactose											
Lactulose											
Maltose											
D-Mannitol											
D-Mannose											
D-Melibiose											
β-Methyl-D-glucosid											
D-Psicose											
D-Raffinose											
L-Rhamnose											
D-Sorbitol											
Saccharose											
D-Trehalose											
Turanose											
Xylitol											
<b>Carboxylsäuren</b>											
Essigsäure											
Cis-Aconitsäure											
Citronensäure											
Ameisensäure											
D-Galactonsäurelacton											
D-Galacturonsäure											
D-Gluconsäure											
D-Glucosaminsäure											
D-Glucuronsäure											
α-Hydroxybuttersäure											
β-Hydroxybuttersäure											
γ-Hydroxybuttersäure											
p-Hydroxyphenylelessigsäure											
Itaconsäure											
α-Ketobuttersäure											
α-Ketoglutarsäure											
α-Ketovaleriansäure											
D,L-Milchsäure											
Malonsäure											
Propionsäure											
Chinasäure											

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 3.4

Kohlenstoffquellen	Phylogenetische Gruppen und Isolate										
	<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					CF
	20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	
<b>Carboxylsäuren</b>											
D-Glucarsäure											
Sebacinsäure											
Bernsteinsäure			■			■	■	■	■	■	
<b>Aminosäuren</b>											
D-Alanin			■						■	■	
L-Alanin			■			■	■	■	■	■	
L-Alanyl-glycin			■			■	■	■	■	■	■
L-Asparagin			■			■	■	■	■	■	
L-Asparaginsäure			■			■	■	■	■	■	
L-Glutaminsäure			■			■	■	■	■	■	■
Glycyl-L-asparaginsäure			■				■	■	■	■	■
Glycyl-L-glutaminsäure			■			■	■	■	■	■	■
L-Histidin			■						■	■	
Hydroxy-L-prolin											
L-Leucin			■						■	■	
L-Ornithin											■
L-Phenylalanin											
L-Prolin			■			■	■	■	■	■	■
L-Pyroglutaminsäure			■				■	■	■	■	
D-Serin											
L-Serin			■				■	■	■	■	■
L-Threonin			■			■	■	■	■	■	■
D,L-Carnithin											
γ-Aminobuttersäure			■						■	■	
<b>Polymer</b>											
Glycogen						■	■	■	■	■	■
α-Cyclodextrin						■	■	■	■	■	■
Dextrin			■			■	■	■	■	■	■
Tween 40								■	■	■	
Tween 80			■			■	■	■	■	■	
<b>Ester, Alkohole, Amide, Amine</b>											
Monomethylsuccinat	■		■			■	■	■	■	■	
Methylpyruvat	■		■			■	■	■	■	■	
2,3-Butandiol											
Glycerol	■		■	■	■			■	■	■	
Bernsteinsäuremonoamid			■			■	■	■	■	■	
Glucuronamid			■			■	■	■	■	■	
Alaninamid						■	■	■	■	■	
Phenylethylamin											
2-Aminoethanol											
Putrescin											
<b>Phosphorylierte, aromatische und bromierte Substrate</b>											
D,L-Glycerolphosphat											
Glucose-1-phosphat											
Glucose-6-phosphat											
Inosin						■		■	■	■	
Urocansäure			■						■	■	
Thymidin						■	■	■	■	■	
Uridin						■	■	■	■	■	■
Brombernsteinsäure			■			■	■	■	■	■	

---

Die Isolate der Station 49/088/2 (ohne Isolat 88/2-1) konnten lediglich bei der Verwertung der Lactulose von der gemeinsamen Inkubation profitieren. Hier war nach fünf Tagen eine positive Farbreaktion zu beobachten, obwohl alle einzelnen Isolate dieser Station zuvor mit diesem Substrat kein Wachstum gezeigt hatten. Auch hier schienen sich die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria*-Isolate eher zu hemmen, denn die Anzahl der im Vergleich zur Auswertung der einzeln inkubierten Isolate schwächeren Farbumschläge überwog auch hier (negativ statt schwach positiv bzw. schwach positiv statt positiv). Dazu gehörten Dextrin, Glycogen, Lactose,  $\alpha$ -Ketobuttersäure und  $\alpha$ -Ketovaleriansäure bzw. Essigsäure, Glucuronamid, Glycyl-L-Asparaginsäure und Glycerol. Es traten sogar zwei Fälle auf (Ameisensäure und  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure), in denen einzelne Isolate eine positive Farbreaktion gezeigt hatten und der Isolatmix die Substrate dann nicht mehr verwertet hatte (Daten nicht gezeigt).

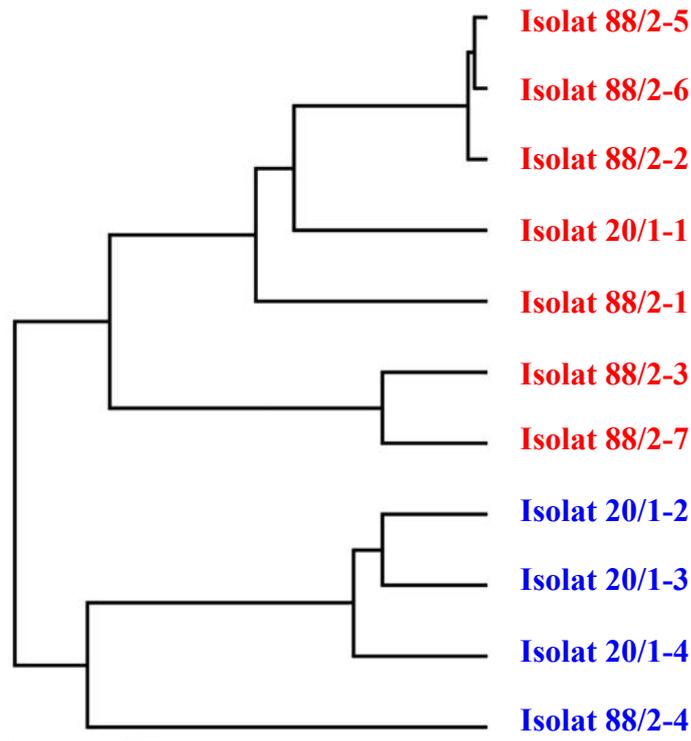
Eine phenetische Auswertung erfolgte auch hier mit Hilfe des UPGMA-Verfahrens (s. Kap. 2.6.4.4), basierend auf einer in PAUP berechneten Distanzmatrix (s. Tab. 6.3, Kap. 6.3). Die Merkmalszustände wurden, wie in Kapitel 3.5.3.1 beschrieben, in eine binäre Matrix übersetzt.

Im UPGMA-Phenogramm ergaben sich zwei Hauptcluster (s. Abb. 3.14):

Cluster 1 mit den Isolaten 20/1-1, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-3, 88/2-5, 88/2-6 und 88/2-7 und

Cluster 2 mit den Isolaten 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4 und 88/2-4.

Die Zusammensetzung der zwei Hauptcluster unterscheidet sich deutlich von der des Phenogramms der Kohlenstoffquellen im ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Abb. 3.13). Außerdem weist hier keines der Isolate ein mit einem anderen Isolat identisches Verwertungsspektrum auf. In das erste Cluster konnten nun neben den Isolaten 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 auch die Isolate 88/2-1, 88/2-2, 88/2-3 und 88/2-7 gruppiert werden, die im Phenogramm der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Abb. 3.13) noch das Cluster 2 gebildet hatten. Im zweiten Cluster wurden hier die Isolate 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4 und 88/2-4 zusammengefasst, die bei der Verwertung der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Abb. 3.13) alle im Cluster 1 gruppiert worden waren.



**Abb. 3.14:** Auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.3, Kap. 6.3) des im BIOLOG GN-Testsystem ermittelten Verwertungsspektrums (s. Tab. 3.4) basierendes UPGMA-Phenogramm der elf Antarktisisolate.

Cluster 1, Cluster 2

Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

In beiden Clustern des Phenogramms in Abbildung 3.14 sind Isolate zu erkennen, die entweder durch große oder durch identische Abstände (Änderungen/Unähnlichkeiten) zu den übrigen Isolaten des jeweiligen Clusters auffallen, also eine eigene „Untergruppe“ bilden. Im Cluster 1 sind dies die Isolate 88/2-3 und 88/2-7, die zu den anderen Isolaten identische Abstände aufweisen. Diese beiden Isolate hatten schon bei der ARDRA sehr ähnliche Bandenmuster gezeigt (s. Kap. 3.1) und gehören laut FISH beide zu den  $\gamma$ -Proteobacteria (s. Kap. 3.3), während die anderen Isolate dieses Clusters zu den  $\alpha$ -Proteobacteria bzw. *Cytophaga-Flavobacteria* gehören. Im Cluster 2 hebt sich das Isolat 88/2-4 ( $\alpha$ -Proteobacteria) durch einen relativ großen Abstand von den anderen Isolaten ( $\gamma$ -Proteobacteria) ab und kann als eigene „Untergruppe“ betrachtet werden.

### 3.5.3.3 Auswertung des API 50 CH-Systems

Die Auswertung der API 50 CH-Teststreifen erfolgte semiquantitativ wie in der Herstellervorschrift angegeben. Allerdings war eine einheitliche Auswertung (Zahlengabe 0-5) aufgrund der recht ähnlichen roten (negativ) bis gelben (positiv) Verfärbungen relativ schwierig. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse der API 50 CH-Teststreifen der Isolate aus der Gruppe der  $\alpha$ - und

---

$\gamma$ -Proteobakterien sowie des Isolates 88/2-1 (*Cytophaga-Flavobacteria*) vergleichend dargestellt. Die in diesem Test als positiv (farbige Darstellung in Tab. 3.5) beurteilten Reaktionen zeigten eine orange (Wert 3) bis gelbe (Wert 5) bzw. bei Äsculin schwarze Färbung im Teststreifen. Die Platten wurden maximal 14 Tage lang bebrütet bzw. so lange, bis die Kontrolle eine orange Verfärbung (Wert 3) annahm, wodurch die unterschiedlichen Inkubationszeiten für die einzelnen Isolate entstanden (s. Tab. 3.5).

Bei Betrachtung der Substratspektren (s. Tab. 3.5) fiel zunächst das Isolat 88/2-2 ( $\alpha$ -*Proteobacteria*) auf, das innerhalb der maximalen Inkubationsdauer von 14 Tagen keinen der angebotenen Kohlenwasserstoffe verwerten konnte. Auffällig war auch, dass keines der elf Isolate die angebotenen Carboxylsäuren verwerten konnte.

Die Vertreter der  $\alpha$ -Proteobakterien verwerteten bis auf zwei Ausnahmen (Isolat 20/1-1 Melibiose und Isolat 88/2-6 Lactose) nur Monosaccharide und deren Derivate (z. B. Alditole), aber keine Di-, Oligo- oder Polysaccharide. Bei den  $\gamma$ -Proteobakterien konnten Substanzen der drei letztgenannten Gruppen lediglich vom Isolat 88/2-3 nicht hydrolysiert werden. Neben den angebotenen Monosacchariden war dieses Isolat nur noch in der Lage, die Desoxyzucker Rhamnose und D-Fucose als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Ein ebenfalls eingeschränkteres Substratspektrum wies das Isolat 88/2-7 auf. Es verwertete die meisten Monosaccharide, einige Disaccharide und zwei Desoxyzucker. Die Vertreter der  $\gamma$ -Proteobakterien, die von der Station 49/020/1 isoliert wurden, zeigten dagegen ein recht breites Verwertungsspektrum bei den angebotenen Kohlenstoffquellen. Sie konnten Substanzen der Monosaccharide, deren Derivate, Di-, Oligo- und auch Polysaccharide nutzen. Die Isolate 20/1-3 und 20/1-4 konnten ebenso wie das Isolat 88/2-4 ( $\alpha$ -Proteobakterium) die meisten der hier getesteten Substrate hydrolysieren.

Neben dem Isolat 88/2-2 zeigte der Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria* ein recht enges Substratspektrum bei den angebotenen Kohlenstoffquellen. Als einziges Monosaccharid konnte das Isolat 88/2-1 in diesem Test nur Glucose verwerten. Es fällt auf, dass die Glucose immer ein Bestandteil der von diesem Isolat außerdem abgebauten Di- und Polysaccharide war (Maltose, Lactose, Saccharose, Glycogen und Amidon). Zusätzlich konnte dieses Isolat lediglich noch Mannitol und  $\beta$ -Methyl-D-xylosid nutzen.

**Tab. 3.5:** Verwertung der 49 Kohlenwasserstoffe des API 50 CH-Testsystems durch alle Isolate<sup>a</sup> (*α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* sowie *Cytophaga-Flavobacteria*, CF). Positive Reaktionen (Bewertungsstufe 3-5); Inkubationstemperatur 27 °C bzw. RT (Isolat 88/2-1)

Kohlenstoffquelle	Phylogenetische Gruppen und Isolate										
	<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					CF
	20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	
<b>Monosaccharide</b>											
D-Arabinose											
L-Arabinose											
Ribose											
D-Xylose											
L-Xylose											
Galactose											
D-Glucose											
D-Fructose											
D-Mannose											
L-Sorbose											
D-Lyxose											
D-Tagatose											
<b>Disaccharide</b>											
Cellobiose											
Maltose											
Lactose											
Melibiose											
Saccharose											
Trehalose											
β-Gentiobiose											
D-Turanose											
<b>Oligo- und Polysaccharide</b>											
Melezitose											
D-Raffinose											
Amidon											
Inulin											
Glycogen											
<b>Alkohole/Alditole</b>											
Glycerol											
Erythritol											
Mannitol											
Sorbitol											
Xylitol											
D-Arabitol											
L-Arabitol											
Adonitol											
Dulcitol											
<b>Desoxyzucker, Amine, u. a.</b>											
Rhamnose											
D-Fucose											
L-Fucose											
Inositol											
N-Acetylglucosamin											
β-Methyl-D-xylosid											
α-Methyl-D-mannosid											
α-Methyl-D-glucosid											
Amygdalin											
Arbutin											

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 3.5

Kohlenstoffquelle	Phylogenetische Gruppen und Isolate										
	<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					CF
	20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	88/2-1
<b>Desoxyzucker, Amine, u. a.</b>											
Äsculin	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Salicin						■	■	■	■		
<b>Carboxylsäuren</b>											
Gluconat											
2-Ketogluconat											
5-Ketogluconat											

<sup>a</sup> unterschiedliche Inkubationszeiten: 20/1-1 (7 d), 20/1-2 (3 d), 20/1-3 (6 d), 20/1-4 (3 d), 88/2-1 (8 d), 88/2-2 (14 d), 88/2-3 (3 d), 88/2-4 (5 d), 88/2-5 (7 d), 88/2-6 (8 d), 88/2-7 (2 d)

Die phenetische Auswertung erfolgte mit Hilfe des UPGMA-Verfahrens (s. Kap. 2.6.4.4), basierend auf einer in PAUP berechneten Distanzmatrix (s. Tab. 6.4, Kap. 6.3). Die Merkmalszustände wurden, wie in Kapitel 3.5.3.1 beschrieben, in eine binäre Matrix übersetzt.

Im UPGMA-Phenogramm ergaben sich zwei Hauptcluster (s. Abb. 3.15):

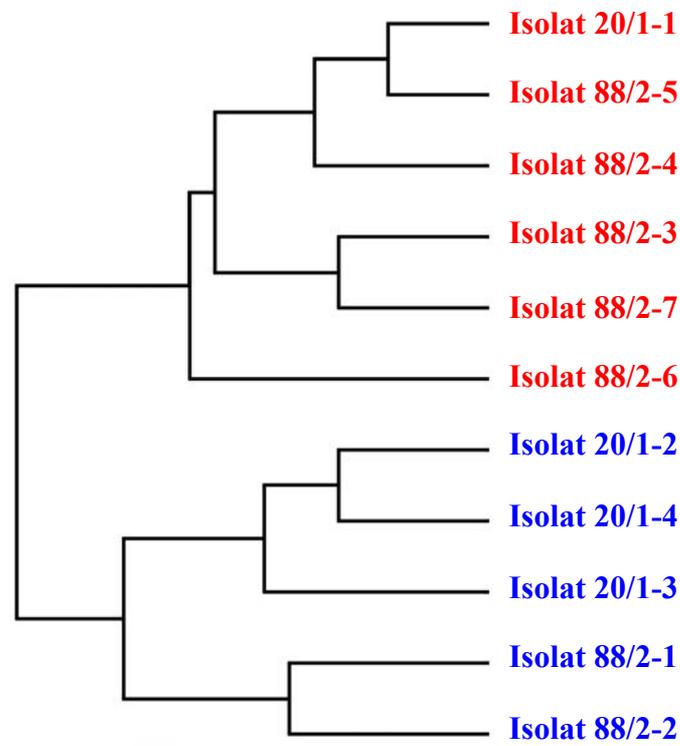
Cluster 1 mit den Isolaten 20/1-1, 88/2-3, 88/2-4, 88/2-5, 88/2-6 und 88/2-7 und

Cluster 2 mit den Isolaten 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-1 und 88/2-2.

Auch bei diesem Phenogramm wurden erneut zwei Hauptcluster gebildet, deren Isolatzusammensetzung von den vorher gezeigten UPGMA-Phenogrammen der beiden anderen Kohlenstoff-Verwertungsspektren abweicht (s. Kap. 3.5.3.1 und 3.5.3.2). Dem Cluster 1 gehörten hier nur noch sechs statt sieben Isolate an (s. o.). Daraus folgend waren jetzt im Cluster 2 fünf statt der bisher vier Isolate gruppiert. Im BIOLOG GN-Phenogramm waren anstelle des Isolates 88/2-4 die beiden Isolate 88/2-1 und 88/2-2 in das Cluster 1 gruppiert (s. Abb. 3.14) und im Phenogramm der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium die Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 statt der Isolate 88/2-3 und 88/2-7 (s. Abb. 3.13). Dadurch zeigte auch das zweite Cluster eine etwas größere Übereinstimmung mit dem des BIOLOG GN-Phenogramms als mit dem der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium.

Wie schon in den beiden vorherigen Phenogrammen der Kohlenstoff-Verwertungsspektren (s. Abb. 3.13 und 3.14) erkennbar, können auch in dem Phenogramm in Abbildung 3.15 wieder „Untergruppen“ erkannt werden. Es fällt auf, dass in diesem Phenogramm – genauso wie in dem des BIOLOG GN-Testsystems – die beiden Isolate 88/2-3 und 88/2-7 eine Untergruppe im Cluster 1 bilden. Damit sind diese beiden Mikroorganismen die einzigen Vertreter der *γ-Proteobacteria* in dem sonst nur aus *α-Proteobacteria* bestehenden Cluster. Das zweite Hauptcluster besteht dagegen zu mehr als 50% aus Vertretern der *γ-Proteobacteria*. Die anderen

Bakteriengruppen angehörenden Isolate 88/2-1 (*Cytophaga-Flavobacteria*) und 88/2-2 ( $\alpha$ -*Proteobacteria*) heben sich deutlich von den übrigen Isolaten dieses Clusters ab. Diese beiden Isolate besitzen identisch große Abstände zu den übrigen Isolaten dieser Gruppe und bilden daher ebenfalls eine eigene „Untergruppe“.



**Abb. 3.15:** Auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.4, Kap. 6.3) des im API 50 CH-Testsystem ermittelten Verwertungsspektrums (s. Tab. 3.5) basierendes UPGMA-Phenogramm der elf Antarktisisolate.

Cluster 1, Cluster 2

Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

### 3.6 Chemotaxonomie

#### 3.6.1 Zelluläre Fettsäuremuster

Zum direkten Vergleich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Fettsäuremethylester (FAME) der einzelnen Isolate wurden mit einer Ausnahme alle Isolate unter standardisierten Bedingungen angezogen (s. Kap. 2.7.2.1). Die Ausnahme bildete das Isolat 88/2-1, das bei 27 °C nur sehr schlecht wuchs. Dies muss bei einem Vergleich aller Isolate beachtet werden. Um den Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Fettsäurezusammensetzung zu untersuchen, wurde von den Isolaten 88/2-4 und 88/2-7 zusätzlich auch jeweils eine Probe nach 12 Tagen Wachstum bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) analysiert.

In Tabelle 3.6 sind die einzelnen in zehn Antarktisisolaten identifizierten FAME in Prozent der Gesamtfettsäuremethylester nach 48 h Wachstum bei 27 °C sowie in Isolat 88/2-1 nach viertägiger Kultivierung bei RT (alle in ASN<sub>III</sub>-Medium, s. o.) zusammengefasst. Es konnten gesättigte, ungesättigte, verzweigte und mit Hydroxylgruppen versehene FAME identifiziert werden (s. Tab. 3.6 und Abb. 3.16a und b). Aufgrund der angewendeten Methode (s. Kap. 2.7.2.2) konnten die beiden FAME cis-11- und trans-9-Octadecenoat-Methylester nicht aufgetrennt werden, weshalb sie als C18:1 t9 + c11 aufgeführt, aber als zwei FAME gerechnet werden.

Als einziger FAME kommt C16:0 (Bezeichnung s. Tab. 2.9, Kap. 2.7.2.3; Verteilung s. Tab. 3.6) in allen elf Isolaten beider Stationen (49/020/1 und 49/088/2) vor. Den vier Isolaten der Station 49/020/1 sind dagegen zusätzlich die FAME C19:0, C16:1 c9, C18:1 t9 + c11 und i C17:0 gemeinsam. Die Isolate der anderen Station wiesen dagegen keine weiteren einheitlichen FAME auf.

Sowohl die absolute Anzahl an identifizierten FAME pro Isolat als auch deren prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern variierten innerhalb der Isolate deutlich (s. Tab. 3.6 und Abb. 3.16a und b). So stellte das Isolat 88/2-1 mit 29,8% den geringsten Anteil an identifizierten FAME dar, der sich auf 12 verschiedene FAME verteilte, während Isolat 88/2-3 mit 78,2% bei 10 verschiedenen FAME den höchsten prozentualen Anteil aufwies. Die geringste Anzahl (vier) an verschiedenen identifizierten FAME, die aber immerhin einen prozentualen Anteil von insgesamt 58% erbrachten, wies Isolat 88/2-4 auf. Die meisten FAME (19) wiesen die Isolate 20/1-2 und 20/1-3 auf. Diese beiden Isolate besaßen als einzige den FAME C18:2 c9,12 (0,1 bzw. 0,7% der Gesamtfettsäuremethylester).

Auffällig ist auch, dass die Isolate, die mittels FISH in die Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien eingeordnet wurden (s. Kap. 3.3), alle eine sehr geringe Anzahl an identifizierten FAME pro Isolat ( $\leq 10$ ) aufwiesen, während die Vertreter der anderen Bakteriengruppen (*Cytophaga-Flavobacteria* und  $\gamma$ -Proteobacteria, s. Kap. 3.3) alle 10 oder mehr FAME besaßen. Außerdem fehlte allen Vertretern der  $\alpha$ -Proteobakterien der FAME C12:0, der in den Vertretern der anderen Gruppen mit Anteilen von 0,3 bis 6,1% vorkam (s. Tab. 3.6).

Die Hauptfettsäuren der  $\alpha$ -Proteobakterien stellten die ungesättigten FAME C18:1 t9 + c11 mit einem Anteil von 34,5 bis 63,3% an den Gesamtfettsäuremethylestern dar. Bei dem Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe (Isolat 88/2-1) stellte der iso-verzweigte FAME i C15:0 mit 16,4% den größten Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern. Ein etwas anderes Bild zeigte sich bei den Vertretern der  $\gamma$ -Proteobakterien. Von der Station 49/088/2 wiesen die beiden Ver-

---

treter dieser Bakteriengruppe lediglich C18:1 c9 als Hauptfettsäure auf (44,2 bis 53,2% aller FAME), während bei den Vertretern von der Station 49/020/1 die Fettsäure C16:1 c9 den Hauptanteil (20,1-41,1%) und die Fettsäure C16:0 mit 10,2-14,4% der Gesamtfettsäuremethylester einen zweiten FAME mit relativ hohem Anteil darstellte (s. Tab. 3.6).

Bei den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien bildeten die ungesättigten FAME mit 28-67,2% insgesamt den größten Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern (s. Abb. 3.16a). Einzige Ausnahme war das Isolat 20/1-3 ( $\gamma$ -Proteobacteria), bei dem die gesättigten FAME mit 26,1% den größten Anteil darstellten. Die ungesättigten FAME waren mit 22,9% bei diesem Isolat aber annähernd gleich stark vertreten. Bei dem einzigen Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe (Isolat 88/2-1) lag der größte Anteil an Gesamtfettsäuremethylestern mit 17,1% bei den iso-verzweigten FAME. Alle anderen FAME-Gruppen waren bei diesem Isolat nur mit relativ geringen Anteilen (1,4-7,4%) vertreten (s. Abb. 3.16a).

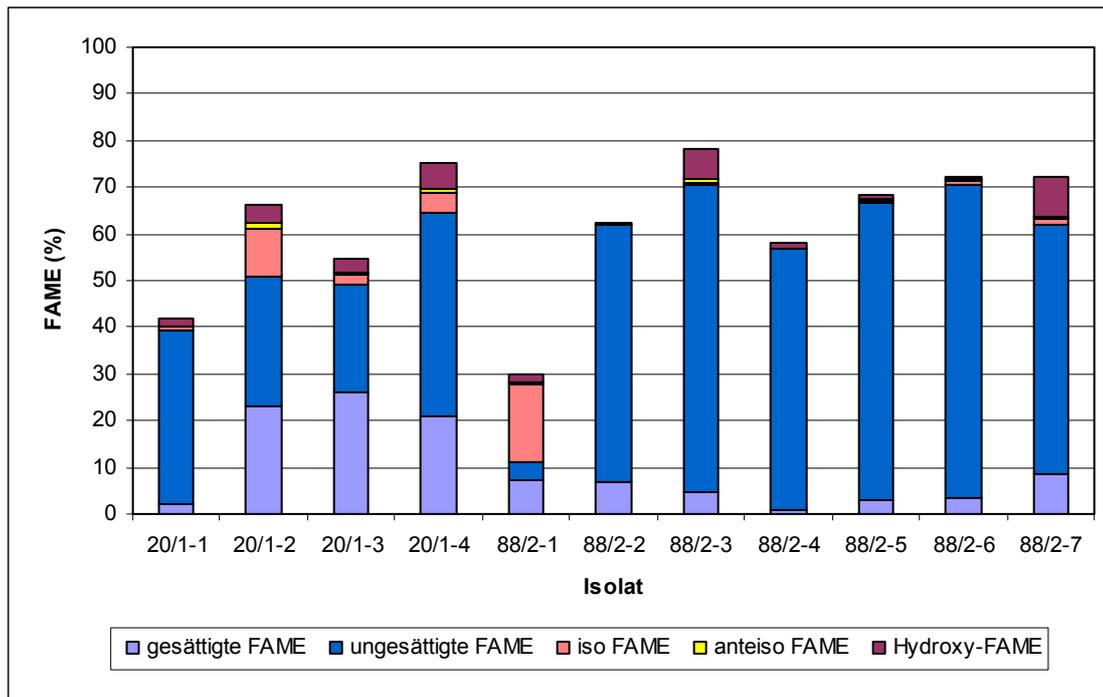
Alle Vertreter von der Station 49/088/2 wiesen jeweils eine FAME-Gruppe mit einem großen prozentualen Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern auf, in der sich auch immer die Hauptfettsäure befand, während die anderen FAME-Gruppen dieser Isolate im Verhältnis dazu nur sehr geringe Anteile besaßen (s. Abb. 3.16a). Das gleiche Bild zeigte sich auch bei dem einzigen Vertreter der  $\alpha$ -Proteobakterien von der Station 49/020/1 (Isolat 20/1-1), während bei den Vertretern der  $\gamma$ -Proteobakterien von dieser Station mindestens eine andere Gruppe ebenfalls stark vertreten war. Bei den drei Isolaten 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 waren es neben den gesättigten (22,9, 26,1 bzw. 20,9%) auch die ungesättigten FAME (28, 22,9 bzw. 43,7%). Bei dem Isolat 20/1-2 stellte außerdem die Gruppe der iso-verzweigten FAME mit 11,5% einen relativ großen Anteil (s. Abb. 3.16a). Bei allen untersuchten Isolaten besaß die Gruppe der Fettsäuren mit Hydroxylgruppe generell einen eher geringen Anteil (0-8,7%).

**Tab. 3.6:** Prozentualer Anteil des jeweiligen identifizierten Fettsäuremethylesters an den Gesamtfettsäuremethylestern der elf Antarktisololate (Inkubationsbedingungen: 48 h, 27°C, ASN<sub>III</sub>-Medium; außer 88/2-1: 4 Tage bei 21 ± 1-2 °C)

Kurzbezeichnung der Fettsäure <sup>a</sup>	Prozentualer Anteil am Gesamtfettsäuremethylestergehalt der Isolate										
	20/1-1	88/2-2	88/2-4	88/2-5	88/2-6	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-3	88/2-7	88/2-1
	<i>α-Proteobacteria</i>					<i>γ-Proteobacteria</i>					CF
C11:0						0,2	0,2				0,1
C12:0						2,4	1,8	2,3	2,9	6,1	0,3
C13:0						0,9	0,7	0,2			0,8
C14:0						2,4	1,6	1,3	0,4		1,6
C15:0						5,1	8,0	1,8			3,6
C16:0	1,7	6,7	0,9	2,6	3,0	11,1	10,2	14,4	1,1	2,3	1
C17:0						0,7	3,4	0,7			
C18:0							0,1				
C19:0	0,6	0,3		0,3	0,4	0,1	0,1	0,2	0,5		
C16:1 c 9	2,6			3,7	2,9	25,9	20,1	41,1	12,3	9,4	3,5
C18:1 c 9		0,3		0,8	1,0	1,0	1,3	1,0	53,2	44,2	0,4
C18:1 t 9 + c 11	34,5	54,6	56,1	59,3	63,3	1,0	0,8	1,6			
C18:2 c 9,12						0,1	0,7				
i C15:0				0,2		1,1	0,4	0,6		0,5	16,4
a C15:0				0,3	0,5	1,3	0,4	1,2	0,8	0,6	0,7
i C16:0						8,1	1,2	2,6			
i C17:0	0,8	0,4		0,4	0,6	1,0	0,7	0,8	0,6	0,6	
3OH-C12:0						3,9	3,2	5,3	5,6	7,7	
2OH-C14:0										0,5	0,7
3OH-C14:0	1,5		1,0	0,8	0,6	0,1			0,8	0,5	0,7
Gesamtanteil (%) identifizierter Fettsäuren/Isolat	41,7	62,3	58	68,4	72,3	66,4	54,9	75,1	78,2	72,4	29,8
Anzahl der Fettsäuren/Isolat	7	6	4	10	9	19	19	16	10	10	12

<sup>a</sup> Erklärungen s. Fußnote von Tabelle 2.9

graue Felder: Fettsäuremethylester bei diesem Isolat nicht vorhanden



**Abb. 3.16a:** Prozentualer Anteil der identifizierten Fettsäuremethyl ester-Gruppen (s. u.) an den Gesamtfettsäuremethyl estern der elf Antarktisisolate.

Einteilung der Fettsäuremethyl ester (FAME) in folgende Gruppen:

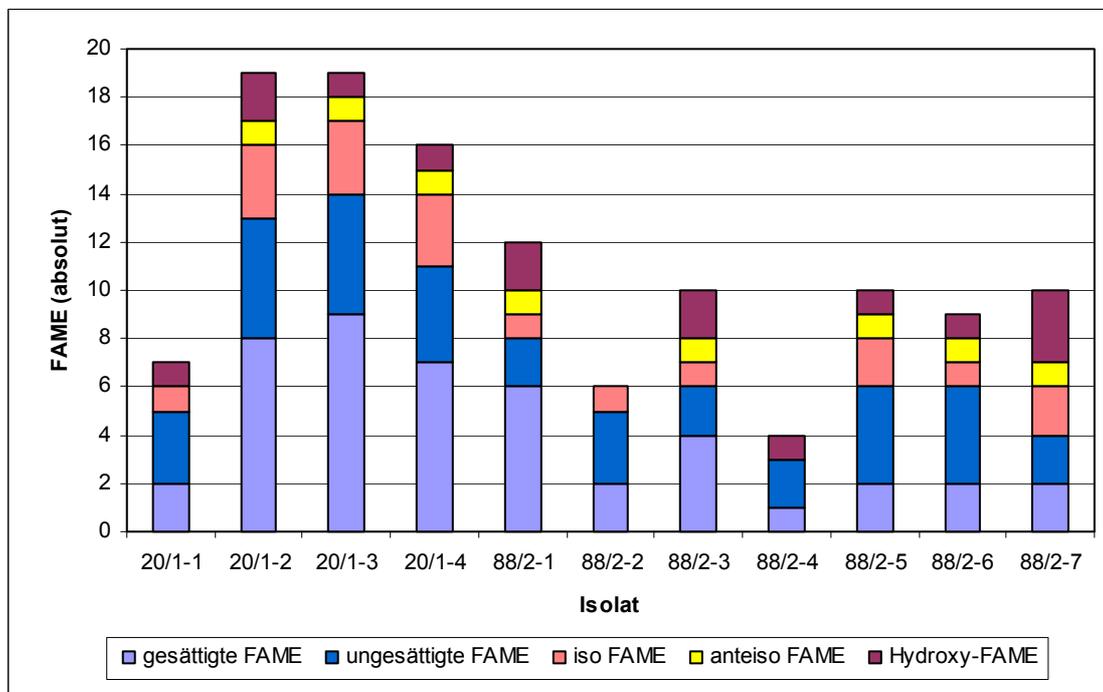
gesättigte FAME: C11:0 bis C19:0

ungesättigte FAME: C16:1 c9, C18:1 c9, C18:1 t9 + c11, C18:2 c9 + c12

verzweigte FAME: iso FAME: i C15:0, i C16:0 und i C17:0

anteiso FAME: a C15:0

Hydroxy-FAME: 3OH-C12:0, 2OH-C14:0 und 3OH-C14:0



**Abb. 3.16b:** Absolute Anzahl der bei den elf Antarktisisolaten identifizierten FAME, die hier in Gruppen zusammengefasst wurden.

Für die Einteilung in die Gruppen siehe Abbildung 3.16a.

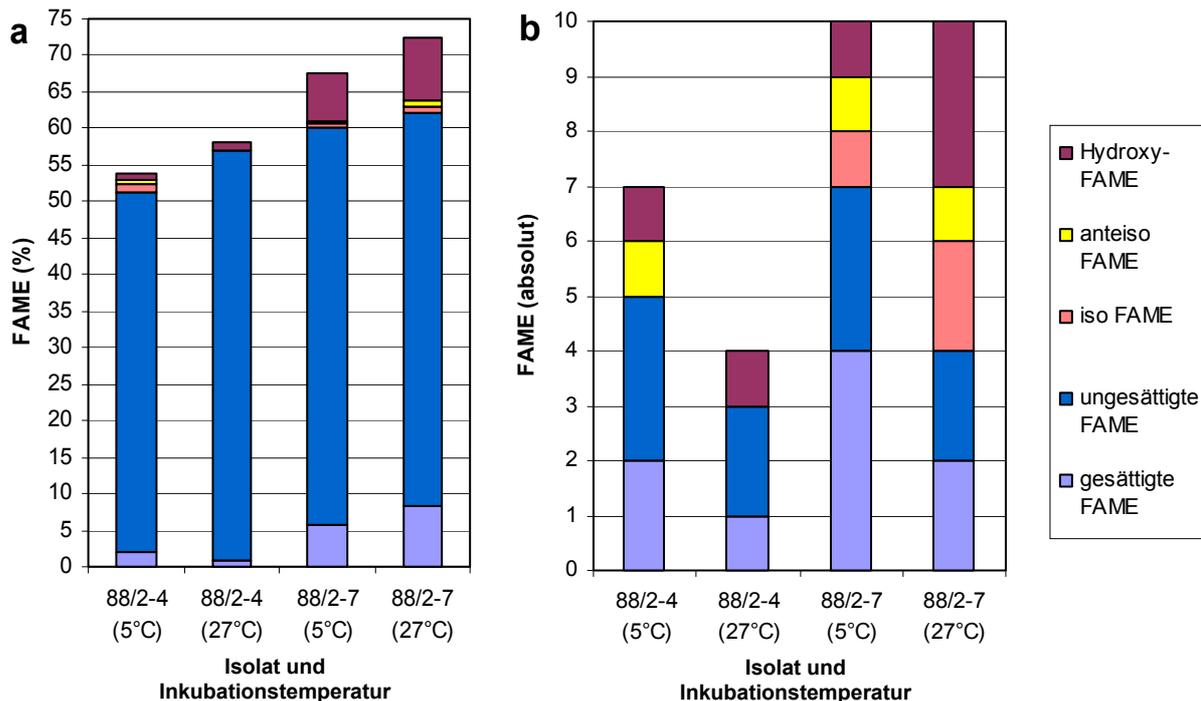
Ein Vergleich der einzelnen identifizierten FAME in Bezug auf den prozentualen Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur und Kultivierungsdauer bei den Isolaten 88/2-4 und 88/2-7 nach 12-tägiger Inkubation bei 5 °C und 48 h Wachstum bei 27 °C im ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) ist in Tabelle 3.7 dargestellt. Auch bei den bei 5 °C inkubierten Kulturen wurden gesättigte, ungesättigte, verzweigte und mit Hydroxylgruppen versehene FAME identifiziert (s. Tab. 3.7 und Abb. 3.17).

**Tab. 3.7:** Prozentualer Anteil des jeweiligen identifizierten Fettsäuremethylesters an den Gesamtfettsäuremethylestern der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 nach unterschiedlicher Inkubationsdauer und verschiedenen Temperaturen (5 °C für 12 Tage und 27 °C für 48 h). Die Anzucht beider Isolate erfolgte im ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3)

Kurzbezeichnung der Fettsäure <sup>a</sup>	Prozentualer Anteil am Gesamtfettsäuremethylestergehalt der Isolate			
	88/2-4 (5 °C)	88/2-4 (27 °C)	88/2-7 (5 °C)	88/2-7 (27 °C)
C11:0			0,3	
C12:0			4,1	6,1
C16:0	0,9	0,9	0,8	2,3
C18:0	1,0			
C19:0			0,4	
C16:1 c9			21,7	9,4
C18:1 c9			31,0	44,2
C18:1 t9 + c11	47,7	56,1		
C18:2 c9,12	1,5		1,7	
i C15:0				0,5
a C15:0	0,7		0,5	0,6
i C16:0	1,3			
i C17:0			0,6	0,6
3OH-C12:0			6,5	7,7
2OH-C14:0				0,5
3OH-C14:0	0,7	1,0		0,5
Gesamtanteil (%) identifizierter Fettsäuren/Isolat	53,8	58	67,3	72,4
Anzahl der Fettsäuren/Isolat	8	4	10	10

<sup>a</sup> Erklärungen s. Fußnote von Tabelle 2.9

graue Felder: Fettsäuremethylester bei diesem Isolat nicht vorhanden



**Abb. 3.17:** Prozentualer Anteil der identifizierten FAME-Gruppen an den Gesamtfettsäuremethylestern (a) sowie die absolute Anzahl der in Gruppen zusammengefassten identifizierten FAME (b) der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (5 °C und 27 °C) und damit –dauer (12 Tage bzw. 48 h). Die Anzucht erfolgte im ASN<sub>III</sub>-Medium (Salinität 3,4% und pH 7,8-8,2). Für die Einteilung in die Gruppen siehe Abbildung 3.16a.

Beide Isolate wiesen nach 12-tägiger Inkubation bei 5 °C im Vergleich zur Inkubation bei 27 °C ein verändertes Fettsäurespektrum auf (s. Tab. 3.7 und Abb. 3.17). Beim Isolat 88/2-4 war der prozentuale Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern bei der niedrigeren Inkubationstemperatur geringer (53,8% statt 58%), während die absolute Anzahl an FAME zunahm (acht anstelle von vier). Nach Inkubation bei 5 °C wies dieses Isolat nun auch verzweigte FAME (a C15:0 und i C 16:0), den gesättigten FAME C18:0 sowie den Hydroxy-FAME 3OH-C14:0 auf. Die Hauptfettsäuren bei dieser Inkubationstemperatur blieben C18:1 t9 + c11 mit lediglich etwas geringerem prozentualen Anteil an den Gesamtfettsäuremethylestern (47,7% statt 56,1%). Beim Isolat 88/2-7 waren ebenfalls Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung zu erkennen. Der prozentuale Anteil der identifizierten FAME an den Gesamtfettsäuremethylestern war nach einer Inkubation bei 5 °C ebenfalls geringer (67,3% statt 72,4%). Die absolute Anzahl an FAME blieb dagegen konstant (10). Bei diesem Isolat waren bei der niedrigeren Inkubationstemperatur nicht nur zusätzliche FAME nachweisbar (C11:0, C19:0 und C18:2 c9,12), sondern vorher nachgewiesene FAME waren nicht mehr vertreten (i C15:0, 2OH-C14:0 und 3OH-C14:0) und bei manchen der nachgewiesenen FAME hatte sich außerdem der prozentuale Anteil stark verändert (s. Tab. 3.7).

---

Bei beiden Inkubationstemperaturen war die Hauptfettsäure C18:1 c9, aber zusätzlich war bei dem 5 °C-Ansatz nun auch der FAME C16:1 c9 mit 21,7% (9,4% bei 27 °C) recht stark vertreten.

Eine phenetische Auswertung der nachgewiesenen FAME (s. Tab. 3.6) erfolgte mit dem UPGMA-Verfahren basierend auf einer in PAUP berechneten Distanzmatrix (s. Tab. 6.5, Kap. 6.3).

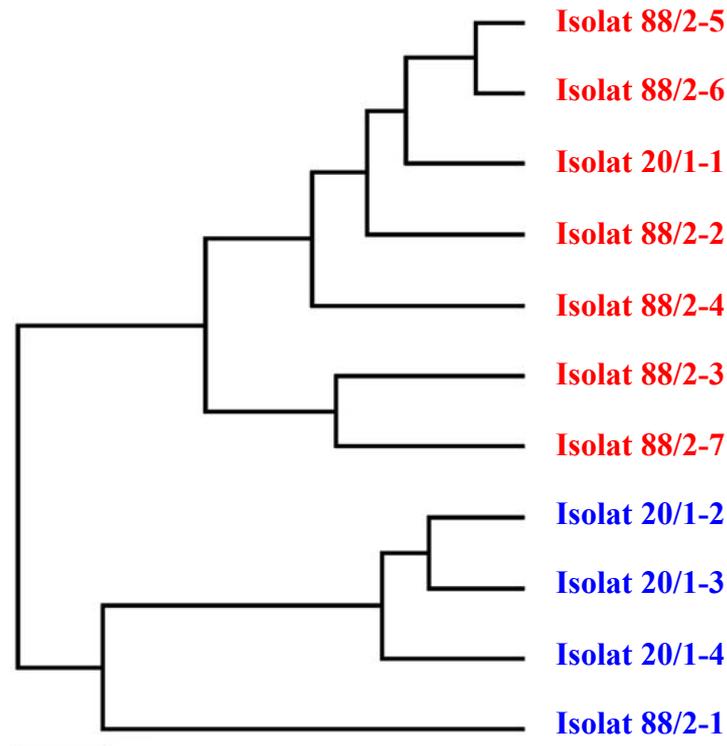
Im UPGMA-Phenogramm bildeten sich zwei Hauptcluster (s. Abb. 3.18):

Cluster 1 mit den Isolaten 20/1-1, 88/2-2, 88/2-3, 88/2-4, 88/2-5, 88/2-6 und 88/2-7 und

Cluster 2 mit den Isolaten 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4 und 88/2-1.

Wie schon bei den Phenogrammen der Kohlenstoff-Verwertungsspektren (s. Abb. 3.13ff.) gruppierten sich die Isolate wieder in zwei Hauptcluster. Die Isolatezusammensetzung der beiden Hauptcluster unterscheidet sich von den bisherigen Phenogrammen, ist aber denen aus den Datensätzen des BIOLOG GN- und des API 50 CH-Testsystems ermittelt sehr ähnlich. Im Vergleich mit dem Phenogramm des BIOLOG GN-Testsystems (s. Abb. 3.14) sind lediglich die beiden Isolate 88/2-4 und 88/2-1 in ihrer Gruppenzugehörigkeit vertauscht und bei dem Phenogramm des API 50 CH-Tests wurde lediglich das Isolat 88/2-2 in ein anderes Cluster gruppiert.

Vergleichbar mit den Phenogrammen des BIOLOG GN- und des API 50 CH-Testsystems heben sich im Cluster 1 die beiden Isolate 88/2-3 und 88/2-7 ( $\gamma$ -*Proteobacteria*) durch die identischen Abstände (Änderungen/Unähnlichkeiten) von den übrigen Isolaten dieses Hauptclusters ab, die alle den  $\alpha$ -*Proteobakterien* angehören. Auch im zweiten Hauptcluster zeigt Isolat 88/2-1 große Abstände zu den übrigen Isolaten. Der Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria* bildet hier eine eigene „Untergruppe“ gegenüber den Vertretern der  $\gamma$ -*Proteobakterien*. Damit ist in diesem Phenogramm eine „Gruppierung“ der Isolate anhand der mit Hilfe der FISH ermittelten Bakteriengruppen erkennbar (s. Kap. 3.3).



**Abb. 3.18:** UPGMA-Phenogramm der elf Antarktisisolate, basierend auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.5, Kap. 6.3) der nachgewiesenen FAME (s. Tab. 3.6).

Cluster 1, Cluster 2

Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

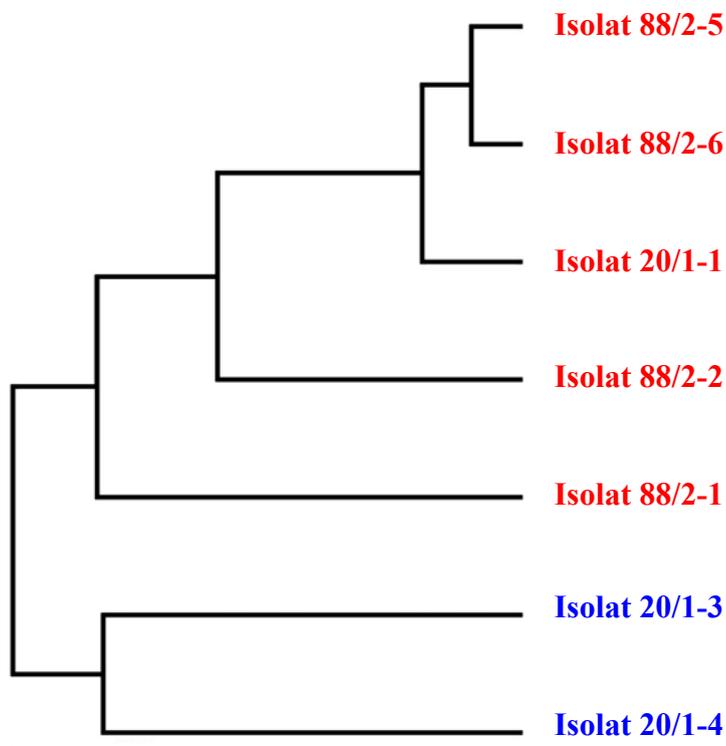
Um die Ähnlichkeiten bzw. Unähnlichkeiten der Isolate genauer bestimmen zu können, wurde eine größere Datenmatrix durch Kombination der Datensätze der FAME-Bestimmung (s. Tab. 3.6) und der RAPD-Fingerprints erstellt (s. Abb. 3.4a und b). Diese Kombination war nur mit sieben Antarktisisolaten möglich, da in der vorliegenden Arbeit nur die RAPD-Bandenmuster der Isolate 20/1-1, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6 ermittelt worden waren. Die mit Hilfe des UPGMA-Verfahrens in PAUP berechnete Distanzmatrix (s. Tab. 6.6, Kap. 6.3) wurde ebenfalls in einem Phenogramm dargestellt, in dem sich erneut zwei Hauptcluster bildeten (s. Abb. 3.19):

Cluster 1 mit den Isolaten 20/1-1, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6 und

Cluster 2 mit den Isolaten 20/1-3 und 20/1-4.

Werden im UPGMA-Phenogramm der detektierten FAME (s. Abb. 3.18) die vier Antarktisisolate 20/1-2, 88/2-3, 88/2-4 und 88/2-7 nicht dargestellt (Daten nicht gezeigt), von denen in der vorliegenden Arbeit keine RAPD durchgeführt worden war, entspricht die dortige Isolatzusammensetzung der Hauptcluster nahezu der Gruppierung der in dem „Kombinationsphenogramm“ gebildeten Cluster (s. Abb. 3.19). Lediglich das Isolat 88/2-1 wurde nach der Kombination der FAME- und RAPD-Datenmatrix nun in einem anderen Hauptcluster (Cluster 1) gruppiert. Eine

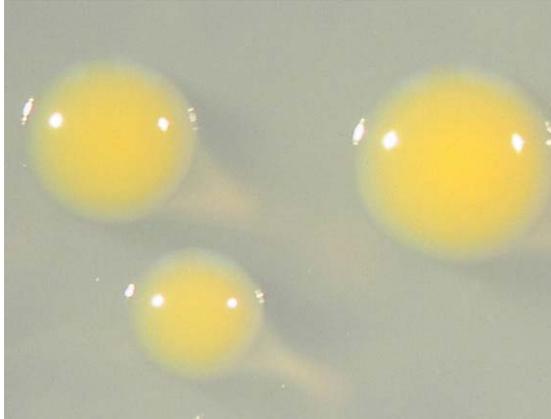
vollständige Übereinstimmung weist diese Clusterbildung dagegen mit der auf dem Verwertungsspektrum des BIOLOG GN-Testsystems basierenden auf (s. Abb. 3.14), wenn auch dort die vier oben genannten Isolate herausgenommen werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Anzahl der Änderungen (Unähnlichkeiten) und damit die Abstände der einzelnen Isolate zueinander innerhalb des Cluster 1 variieren bei den beiden Phenogrammen (s. Abb. 3.14 und 3.19). So zeigt das Isolat 20/1-1 im „Kombinationsphenogramm“ eine etwas nähere Verwandtschaft zu den Isolaten 88/2-5 und 88/2-6 als im auf dem Verwertungsspektrum des BIOLOG GN-Testsystems basierenden Phenogramm. Dies entspricht der bei der ARDRA festgestellten nahen Verwandtschaft dieser drei Isolate (s. Kap. 3.1).



**Abb. 3.19:** UPGMA-Phenogramm von sieben Antarktisisolaten, basierend auf der Distanzmatrix (s. Tab. 6.6, Kap. 6.3) aus den Datensätzen der RAPD-Bandenmuster (s. Abb. 3.4a und b) und der nachgewiesenen FAME (s. Tab. 3.6).  
**Cluster 1**, **Cluster 2**  
 Der Balken unten links entspricht einer Änderung von 0,05.

### 3.6.2 Pigmentbildung bei Isolat 88/2-1

Beim Wachstum auf ASN<sub>III</sub>-Agar (s. Kap. 2.4.4.2) zeigte das Isolat 88/2-1 die Ausbildung von gelb-orangefarbenen Kolonien (s. Abb. 3.20) und beim Wachstum im ASN<sub>III</sub>-Medium (s.

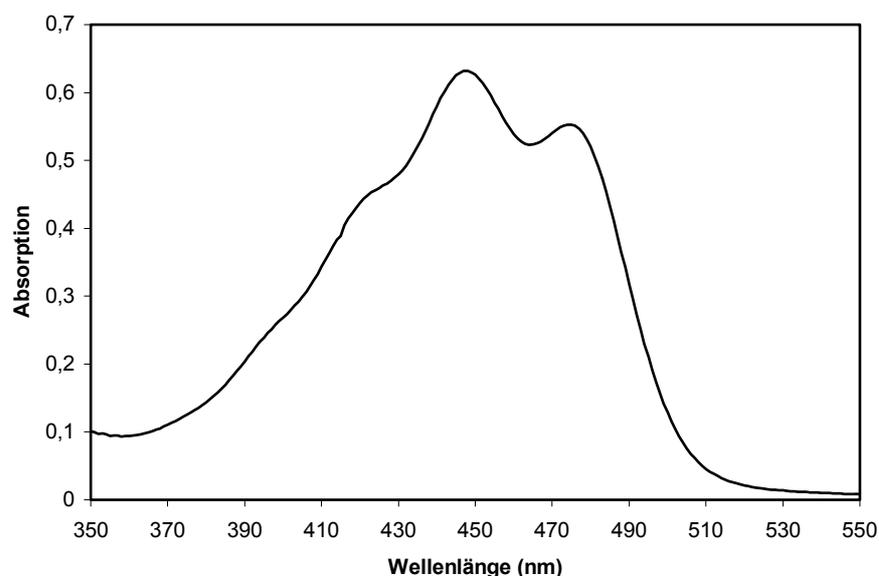


Kap. 2.4.4.1) färbte sich das Medium leicht gelblich. Mittels Absorptionsspektrum und einer Reversed Phase HPLC sollte das Pigment näher charakterisiert werden (s. Kap. 2.7.1).

**Abb. 3.20:** Kolonien von Isolat 88/2-1 (Größe: etwa 1,5-2,5 mm) auf ASN<sub>III</sub>-Agar mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) nach fünf Tagen Inkubation bei RT.

#### 3.6.2.1 Spektrophotometrische Pigmentbestimmung

Das zunächst photometrisch bestimmte Absorptionsspektrum des Methanolextraktes von Isolat 88/2-1 (s. Kap. 2.7.1.1) ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Es ist das für Carotinoide typische dreiteilige Spektrum (s. Kap. 2.7.1.2) mit dem Hauptmaximum bei 448 nm, dem zweiten Maximum bei 475 nm und einer Schulter bei 427 nm zu erkennen (s. auch Tab. 3.8).



**Abb. 3.21:** Absorptionsspektrum des Methanolextraktes von Isolat 88/2-1 nach fünf Tagen Wachstum bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2).

### 3.6.2.2 Reversed Phase HPLC

Das mit Methanol extrahierte Pigment zeigte nach HPLC-Auftrennung und mittels Dioden-Array-Detektor (DAD; s. Kap. 2.7.1.3) ebenfalls ein Absorptionsspektrum, das denen von Carotinoiden glich. Nach einer Retentionszeit von etwa 6,9 min wies es bei 454 und 474 nm Maxima und bei 433 nm eine angedeutete Schulter auf (Spektrum nicht gezeigt). Aufgrund eines großen Hintergrundrauschens bei der Messung waren die genaue Lage der Schulter und die der Maxima nicht exakt bestimmbar. Alle könnten um 1-2 nm verlagert sein, entsprechen aber in etwa dem Absorptionsspektrum eines Zeaxanthinstandards (Methanolextrakt) bzw. dem bei KARSTEN und GARCIA-PICHEL (1996) genannten Spektrum eines mit Aceton extrahierten Zeaxanthins (s. Tab. 3.8).

Eine anschließend durchgeführte Cochromatographie mit einem Zeaxanthinstandard (s. Tab. 3.8) zeigte dann, dass es sich bei dem extrahierten Pigment tatsächlich um Zeaxanthin handelt.

**Tab. 3.8:** Absorptionsmaxima (Spektrophotometer und DAD) des Pigments von Isolat 88/2-1 im Vergleich mit einem Zeaxanthin-Standard<sup>a</sup> bzw. Literaturangaben<sup>b</sup> für Zeaxanthin (Methanol- bzw. Acetonextrakte)

	Lösungsmittel	Spektrophotometer	Reversed Phase HPLC (DAD)	
		Absorptionsmaxima (nm)	Absorptionsmaxima <sup>c</sup> (nm)	Retentionszeit (min)
<b>Isolat 88/2-1</b>	Methanol	427 448 475	(433) 454 474	6,93
<b>Zeaxanthin (Standard<sup>a</sup>)</b>	Methanol	-	(435) 456 480	6,80
<b>Zeaxanthin<sup>b</sup></b>	Aceton	-	(430) 454 480	7,85

<sup>a</sup> Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; <sup>b</sup> KARSTEN und GARCIA-PICHEL (1996); <sup>c</sup> in Klammern: angedeutete Schulter

## 3.7 Molekularbiologie

### 3.7.1 G+C-Gehalt der DNA und 16S rRNA-Sequenz

Um die bearbeiteten Isolate taxonomisch einordnen zu können, wurde zunächst der G+C-Gehalt ihrer DNA bestimmt und anschließend ihre 16S rRNA sequenziert. Der erhaltene G+C-Gehalt wurde dann mit dem der laut 16S rRNA nächstverwandten Art verglichen. Gehören das Isolat und die nächstverwandte Art einer Gattung an, sollten sie in ihrem G+C-Gehalt nicht mehr als 10 mol% voneinander abweichen (ROSSELLÓ-MORA und AMANN, 2001).

Die Bestimmung des G+C-Gehaltes wurde mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden, thermischer Denaturierung ( $T_m$ -Bestimmung, s. Kap. 2.8.2.3) und HPLC (s. Kap. 2.8.2.4), vorgenommen. Die vorab untersuchte Reinheit der DNA anhand der Quotienten aus den Absorptionen bei

230, 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{230}/A_{260}$ ) ergab, dass die Isolate bei  $A_{260}/A_{280}$  zum größten Teil außerhalb des Idealwertes von 1,8 bis 2,0, bei  $A_{230}/A_{260}$  aber innerhalb des Bereiches von 0,3 bis 0,9 lagen (s. Tab. 3.9). Da die Reinheitsabschätzung anhand des Verhältnisses  $A_{260}/A_{280}$  laut JOHNSON (1994) und GLASEL (1995) unzuverlässig ist, wurden wegen der nur hier vorliegenden Überschreitung des Idealwertes die Proben nicht erneut bearbeitet.

**Tab. 3.9:** Quotientenwerte  $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{230}/A_{260}$  zur Ermittlung des DNA-Reinheitsgrades aller elf untersuchten Antarktisisolate

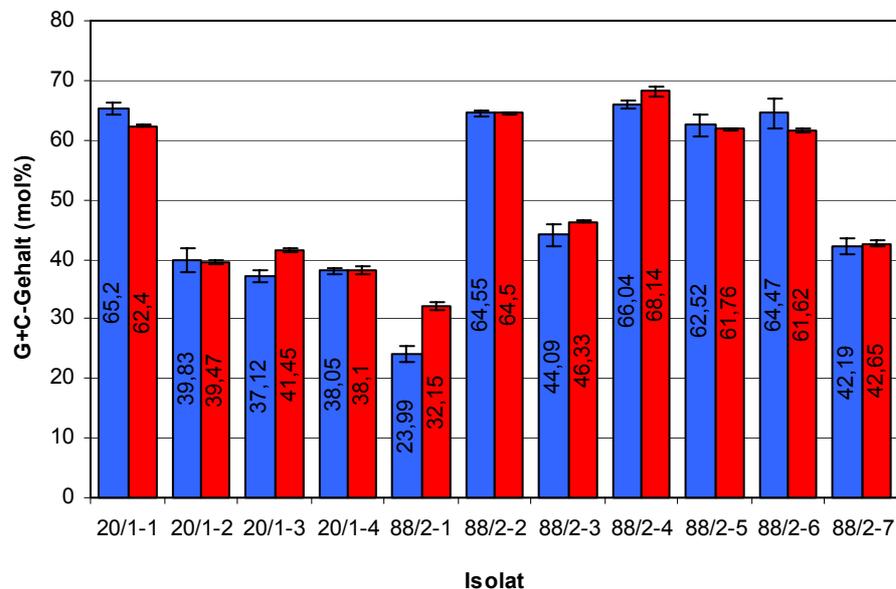
Isolat	DNA-Reinheitsgrad	
	$A_{260}/A_{280}$ <sup>a</sup>	$A_{230}/A_{260}$ <sup>b</sup>
20/1-1	2,14	0,45
20/1-2	2,06	0,42
20/1-3	1,99	0,43
20/1-4	2,08	0,42
88/2-1	2,12	0,4
88/2-2	2,03	0,49
88/2-3	1,84	0,57
88/2-4	1,91	0,61
88/2-5	2,03	0,49
88/2-6	1,95	0,51
88/2-7	1,73	0,58

<sup>a</sup> Idealwert 1,8-2,0, <sup>b</sup> Idealwert 0,3-0,9

Bei allen Isolaten wurden je nach Methode zwei bis vier Messungen durchgeführt, deren Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen in Abbildung 3.22 vergleichend dargestellt sind. Wie deutlich zu erkennen ist, weichen die Werte der beiden Methoden teilweise stark voneinander ab (z. B. bei Isolat 88/2-1). Aufgrund der zum Teil relativ hohen Standardabweichung in den mittels  $T_m$ -Bestimmung erhaltenen G+C-Gehalten, wurde im Weiteren lediglich der mittels HPLC bestimmte Wert herangezogen.

Die fünf Isolate 20/1-1, 88/2-2, 88/2-4, 88/2-5 und 88/2-6, die mittels FISH (s. Kap. 3.3) den  *$\alpha$ -Proteobacteria* zugeordnet werden konnten, wiesen den höchsten G+C-Gehalt aller Isolate auf. Diese Mikroorganismen erreichten als einzige Werte von mehr als 60 mol% (61,62 bis 68,14 mol%). Die laut ARDRA und RAPD (s. Kap. 3.1 und 3.2) eng verwandten Isolate 20/1-1 (62,4 mol%), 88/2-5 (61,76 mol%) und 88/2-6 (61,62 mol%) zeigten nahezu identische G+C-Gehalte.

Auch die den  $\gamma$ -*Proteobacteria* zugeordneten Isolate 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-3 und 88/2-7 sind hier als Gruppe mit einem G+C-Gehalt um 40 mol% wieder zu erkennen (38,1 bis 46,33 mol%). Deutlich heraus fiel lediglich das Isolat 88/2-1, der einzige Vertreter der Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria*, mit einem G+C-Gehalt von lediglich 32,15 mol%.



**Abb. 3.22:** G+C-Gehalte (mol%) der elf Antarktisisolate. Angegeben sind die Mittelwerte (T<sub>m</sub>- und HPLC-Bestimmung) aus je zwei bis vier Messungen und die daraus resultierenden Standardabweichungen.

Die ermittelten Teilsequenzen der 16S rRNA der Isolate 20/1-1, 20/1-2, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-3, 88/2-5 und 88/2-6 liegen im Anhang bei (s. Kap. 6.4). Die nahezu vollständige 16S rRNA-Sequenz der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 (s. Kap. 6.4) sind bei EMBL unter den Accession Numbers AJ313424 bzw. AJ313425 einsehbar. Der Vergleich der ermittelten Sequenzen der 16S rRNA mit Sequenzen bei BLAST (Januar 2004) ergab die in Tabelle 3.10 angegebenen Nächstverwandten für die einzelnen Isolate. Die Sequenzen der Isolate 20/1-3 und 20/1-4 (DE SILVA, 2001) wurden hier noch einmal mit der aktuellen Datenbank verglichen.

Die laut ARDRA- und RAPD-Ergebnissen sowie der Bestimmung des G+C-Gehaltes nah verwandten Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 besaßen nach dem Vergleich der 16S rRNA-Teilsequenzen mittels BLAST auch den gleichen nächsten Verwandten (*Loktanella salsilacus*, 99%). Die große Verwandtschaft dieser drei Isolate wurde hier also bestätigt und ließ darauf schließen, dass sie zumindest derselben Gattung angehören. Der Vergleich ihrer 16S rRNA-Sequenzen untereinander ergab bei den Isolaten 20/1-1 und 88/2-5 eine Übereinstimmung von 99,75% und von 99,73% bzw. 99,63% bei den Isolaten 20/1-1 und 88/2-6 bzw. 88/2-5 und

88/2-6. Ob es sich bei den Isolaten um verschiedene Arten oder lediglich verschiedene Vertreter einer Art handelt, müsste durch eine DNA-DNA-Hybridisierung ermittelt werden. Die bei allen drei Isolaten unterschiedlichen RAPD-Bandenmuster (s. Kap. 3.2) weisen aber darauf hin, dass es sich um verschiedene Stämme handeln kann.

**Tab. 3.10:** Nächstverwandte Arten<sup>a</sup> der elf Antarktisisolate (% Übereinstimmung) nach Vergleich der 16S rRNA-Sequenz mit Hilfe von BLAST (Januar 2004)

Isolat	Nächstverwandte Arten	Übereinstimmung (%)
20/1-1	<i>Loktanella salsilacus</i> LMG 22002 und LMG 22000	99
20/1-2	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> <sup>b</sup> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> <sup>c</sup>	99
20/1-3	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> <sup>b</sup>	99
20/1-4	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> CIP105339, <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> <sup>b</sup>	98
88/2-1	<i>Polaribacter irgensii</i> ANT9210	98
88/2-2	<i>Sulfitobacter dubius</i> KMM3554	99
88/2-3	<i>Psychrobacter glacincola</i> ANT9253	98
88/2-4	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> R-1506 und ATCC 21588	98
88/2-5	<i>Loktanella salsilacus</i> LMG 22002 und LMG 22000	99
88/2-6	<i>Loktanella salsilacus</i> LMG 22002 und LMG 22000	99
88/2-7	<i>Psychrobacter glacincola</i> ANT9253	99

<sup>a</sup> nur nächstverwandte Arten mit vollständigem Artnamen

<sup>b</sup> Umbenennung von *Alteromonas elyakovii* in *Pseudoalteromonas elyakovii* (SAWABE et al., 2000)

<sup>c</sup> Umbenennung von *Alteromonas distincta* in *Pseudoalteromonas distincta* (IVANOVA et al., 2000)

Auch die Isolate 88/2-3 und 88/2-7 gehörten laut BLAST derselben Gattung an und weisen mit 98% (Isolat 88/2-3) bzw. 99% (Isolat 88/2-7) den gleichen nächsten Verwandten auf (*Psychrobacter glacincola* Stamm ANT9253). Die 16S rRNA-Sequenz der beiden Antarktisisolate zeigte ebenfalls eine 98%ige Übereinstimmung. Dass beide Isolate wahrscheinlich einer Gattung angehören, zeigten auch ihre G+C-Gehalte, die weniger als 4 mol% auseinander lagen.

Werden die G+C-Gehalte der Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 betrachtet (s. Abb. 3.22), so ist erkennbar, dass auch diese eng beieinander liegen (<4 mol%). Laut BLAST gehörten ihre nächsten Verwandten zur Gattung *Pseudoalteromonas* (99% Übereinstimmung bei den Isolaten 20/1-2 und 20/1-3 bzw. 98% bei Isolat 20/1-4, s. Tab. 3.10). Bei der ARDRA (s. Kap. 3.1) zeigten diese drei Isolate nach Restriktion mit den zwei Enzymen *Hin* 6I und *Hpa* II identische und bei der Restriktion mit *Alu* I relativ ähnliche Bandenmuster. Bei der RAPD (s. Kap. 3.2) unterschieden sich die „Fingerprints“ jedoch deutlich voneinander. Bei den drei Isolaten handelt es sich demnach wahrscheinlich um unterschiedliche Arten, was mit Hilfe einer DNA-DNA-Hybridisierung untersucht werden müsste.

Wie ein Vergleich der G+C-Gehalte der einzelnen Isolate mit den Gattungen der mit BLAST ermittelten nächsten Verwandten zeigt (s. Tab. 3.11), stimmen diese relativ gut überein. Eine etwas größere Abweichung zeigte lediglich Isolat 88/2-2, dessen G+C-Gehalt 5 mol% über dem für die Gattung *Sulfitobacter* angegebenen Wert liegt. Dies spricht dafür, dass die Isolate durchaus der jeweiligen Gattung zugeordnet werden können. Die G+C-Gehalte aller untersuchten Isolate liegen innerhalb der für Angehörige einer Gattung tolerierten Schwankungsbreite von 10 mol%.

**Tab. 3.11:** G+C-Gehalte (mol%) der elf Antarktisisolate (HPLC-Messung) im Vergleich mit den in der Literatur angegebenen G+C-Gehalten der jeweils nächstverwandten Gattung<sup>a</sup>

Isolat	G+C-Gehalt (mol%)	Nächstverwandte Gattung <sup>a</sup>	G+C-Gehalt (mol%) Literaturwerte
20/1-1	62,4 ± 0,07	<i>Loktanella</i>	59,4-66,4 (Van Trappen et al., in press)
20/1-2	39,47 ± 0,21	<i>Pseudoalteromonas</i>	37-48 (MIKHAILOV et al., 2002)
20/1-3	41,45 ± 0,35	<i>Pseudoalteromonas</i>	37-48 (MIKHAILOV et al., 2002)
20/1-4	38,1 ± 0,65	<i>Pseudoalteromonas</i>	37-48 (MIKHAILOV et al., 2002)
88/2-1	32,15 ± 0,57	<i>Polaribacter</i>	31-33 (GOSINK et al., 1998)
88/2-2	64,5 ± 0,11	<i>Sulfitobacter</i>	57,9-63,7 (SOROKIN, 1995; PUKALL et al., 1999; IVANOVA et al., 2004)
88/2-3	46,33 ± 0,25	<i>Psychrobacter</i>	41-50,7 (u. a.: JUNI, 1992, BOWMAN et al., 1996, ROMANENKO et al., 2002)
88/2-4	68,14 ± 0,82	<i>Paracoccus</i>	62,5-71 (u. a.: KOCUR, 1984, OHARA et al., 1990, DORONINA et al., 2002)
88/2-5	61,76 ± 0,02	<i>Loktanella</i>	59,4-66,4 (Van Trappen et al., in press)
88/2-6	61,62 ± 0,41	<i>Loktanella</i>	59,4-66,4 (Van Trappen et al., in press)
88/2-7	42,65 ± 0,37	<i>Psychrobacter</i>	41-50,7 (u. a.: JUNI, 1992, BOWMAN et al., 1996, ROMANENKO et al., 2002)

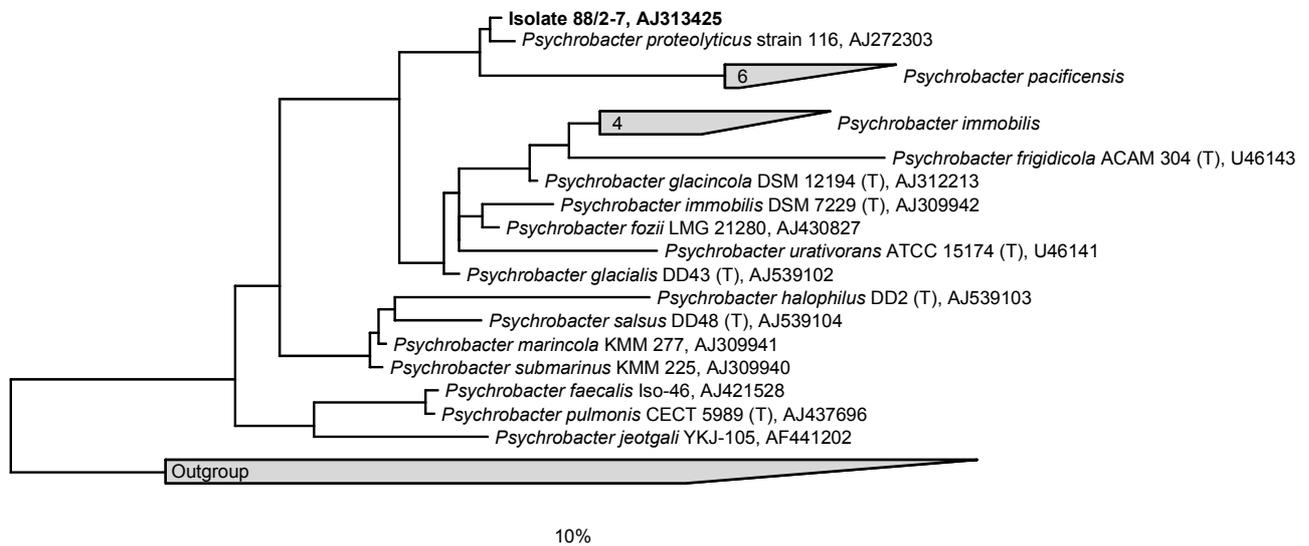
<sup>a</sup> laut BLAST (s. Tab. 3.10)

### 3.7.2 ARB

In Übereinstimmung mit BLAST ergab die phylogenetische Sequenzanalyse des Isolates 88/2-7 eine Eingliederung in die Gattung *Psychrobacter* ( $\gamma$ -*Proteobacteria*). Der mittels ARB (s. Kap. 2.8.6.2) erstellte Baum (s. Abb. 3.23) basierte auf einer nahezu vollständigen 16S rRNA-Sequenz (1498 Basen, s. Kap. 6.4) des Isolates und wurde freundlicherweise von Dr. F. O. Glöckner (Max Planck Institut für marine Mikrobiologie, Bremen) zur Verfügung gestellt.

Beim Vergleich mit Sequenzen der ARB-Datenbank zeigte sich, dass der nächste Verwandte von Isolat 88/2-7 mit 99,65% *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>) ist, gefolgt von einer aus mehreren *Psychrobacter glacincola*-Stämmen bestehenden Gruppe mit 99,44-99,59% Ähnlichkeit (in Abb. 3.23 nicht dargestellt). Während dieser Datenrecherche konnte ermittelt werden,

dass der von der DSMZ erhaltene Vertreter der Gattung *Psychrobacter*, *P. glacincola* DSM 12194<sup>T</sup>, nicht in diese Gruppe hineinpasst. Dieser Stamm zeigte zu der Sequenz von Isolat 88/2-7 lediglich eine Übereinstimmung von etwa 97,6%.



**Abb. 3.23:** Mittels ARB erstellter phylogentischer Baum von Isolat 88/2-7 und einigen *Psychrobacter*-Arten (Stand Juni 2003). Für nähere Erläuterungen siehe HEUCHERT et al. (2004).

### 3.7.3 DNA-DNA-Hybridisierung

Um zu klären, ob es sich bei dem Isolat 88/2-7 um eine bisher unbeschriebene Art handelte, wurde eine DNA-DNA-Hybridisierung mit *Psychrobacter proteolyticus* (DSM13887<sup>T</sup>) und *Psychrobacter glacincola* (DSM12194<sup>T</sup>) durchgeführt. Das Ergebnis der Hybridisierung ist Tabelle 3.12 zu entnehmen.

Unter Berücksichtigung der Grenzwertempfehlung von 70% für die Definition einer Bakterienart (WAYNE et al., 1987) konnte das Isolat 88/2-7 als neue Art *Psychrobacter nivimaris* sp. nov. innerhalb der Gattung *Psychrobacter* beschrieben werden (HEUCHERT et al., 2004, s. Kap. 8).

**Tab. 3.12:** DNA-DNA-Übereinstimmungen (%) des Isolates 88/2-7 mit *Psychrobacter glacincola* (DSM12194<sup>T</sup>) und *P. proteolyticus* (DSM13887<sup>T</sup>) sowie deren Übereinstimmung untereinander

Stamm	DNA-DNA-Übereinstimmung (%)		
	88/2-7	<i>Psychrobacter glacincola</i> (DSM12194 <sup>T</sup> )	<i>Psychrobacter proteolyticus</i> (DSM13887 <sup>T</sup> )
88/2-7	×	24,2	26,8
<i>Psychrobacter glacincola</i> (DSM12194 <sup>T</sup> )	24,2	×	20,2
<i>Psychrobacter proteolyticus</i> (DSM13887 <sup>T</sup> )	26,8	20,2	×

### 3.8 Flockenbildung von Isolat 88/2-7

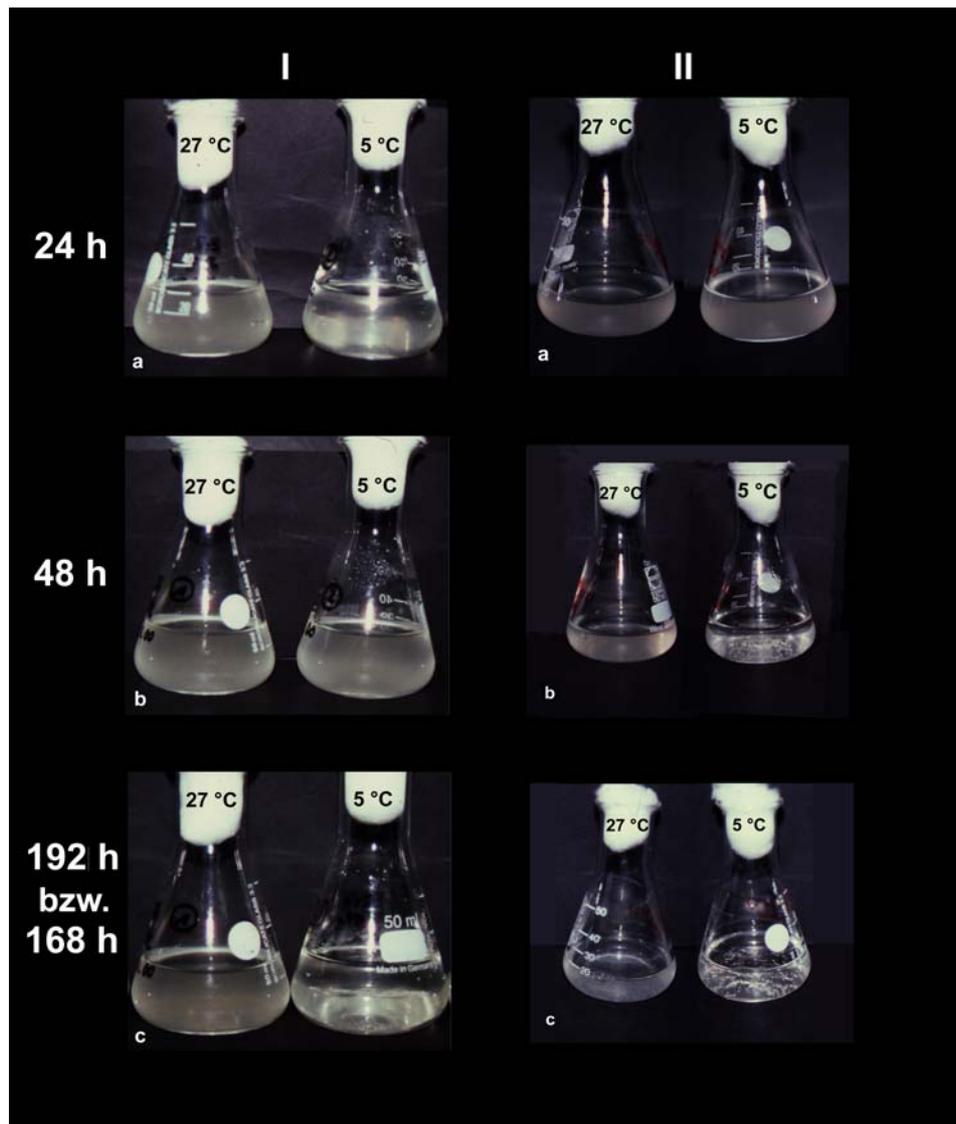
Das schon von HEUCHERT (1999) beobachtete Phänomen der Flockenbildung von Isolat 88/2-7 während der Inkubation bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Das beimpfte Medium wurde während der Inkubation bei 5 °C zunächst trüb. Nach etwa 60 h waren in der vorher trüben, homogenen Kultur große helle Flocken erkennbar. Das Medium wurde bei weiterer Inkubation völlig klar. Auch in einer bei 27 °C inkubierten Kultur wurden Flocken gebildet. Diese erreichten aber nicht die Größe der bei 5 °C gebildeten und das Medium blieb immer trüb.

#### 3.8.1 Flockenbildung in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt

Zunächst wurde ein direkter (verschiedene Stadien wurden schon bei HEUCHERT (1999) gezeigt) zeitlicher Vergleich der Kulturen nach Inkubation bei den beiden oben genannten Temperaturen dargestellt (s. Abb. 3.24). Die Entstehung der Flocken und das spätere Erscheinungsbild der Kulturen sind unabhängig von der Art der Beimpfung. In der Bilderfolge I (s. Abb. 3.24) wurden die jeweiligen Kulturen aus einer 24 h alten, unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.4.3) inkubierten Vorkultur (ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt, Salinität 3,4% und pH 7,8-8,2) etwa 2%ig beimpft. In der Bilderfolge II (s. Abb. 3.24) wurden zwei Vorkulturen des Isolates für 36 h unter Standardbedingungen angezogen (s. o.) und anschließend ein Ansatz bei 27 °C und der andere bei 5 °C weiter inkubiert.

In beiden Bilderfolgen (s. Abb. 3.24) ist zu erkennen, dass sich lediglich in den 5 °C-Ansätzen das Medium nach der anfänglichen Trübung vollständig aufgeklärt hatte und dass sich viele Flocken gebildet hatten. In der Bilderfolge II wird die unterschiedliche Entwicklung besonders deutlich. Vorkulturen (s. o.), die bei 5 bzw. 27 °C über eine Dauer von 24 h inkubiert worden waren, zeigten zunächst identische Trübungen (s. Abb. 3.24 IIa), unterschieden sich dann aber schon nach weiteren 24 h Inkubation (s. Abb. 3.24 IIb). Während der Ansatz bei 27 °C nach wie vor trüb war, hatte sich das Medium bei 5 °C bereits aufgeklärt und es hatten sich Flocken gebildet. Nach 168 h Inkubation (s. Abb. 3.24 IIc) war das Medium bei dieser Temperatur völlig klar. Bei 27 °C hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt zwar ebenfalls einige Flocken gebildet, eine Trübung blieb aber bestehen. In der Bilderfolge I ist diese Entwicklung ebenfalls zu sehen, geschieht jedoch zeitlich etwas versetzt, da die Zellen sich zunächst an die geänderte Temperatur adaptieren mussten (bei 5 °C ist das Medium nach 24 h noch klar; s. Abb. 3.24 Ia). Nach 48 h Inkubation hatte diese Kultur den „Rückstand“ zum 27 °C-Ansatz aufgeholt, beide Kulturmedien zeigten

eine nahezu identische Trübung (s. Abb. 3.24 Ib). Nach 192 h Inkubation wies die 27 °C-Kultur nach wie vor eine starke Trübung auf und es hatten sich wenige Flocken gebildet. Dagegen war das Medium der 5 °C-Kultur zwischenzeitlich klar geworden und die Zellen hatten sich zu Flocken zusammengelagert (s. Abb. 3.24 Ic). Die leichte Flockenbildung in den 27 °C-Ansätzen ist in dieser Abbildung nicht deutlich zu erkennen, da die Flocken in diesen Ansätzen in den meisten Fällen kleiner und nicht so zahlreich waren wie in den 5 °C-Ansätzen.

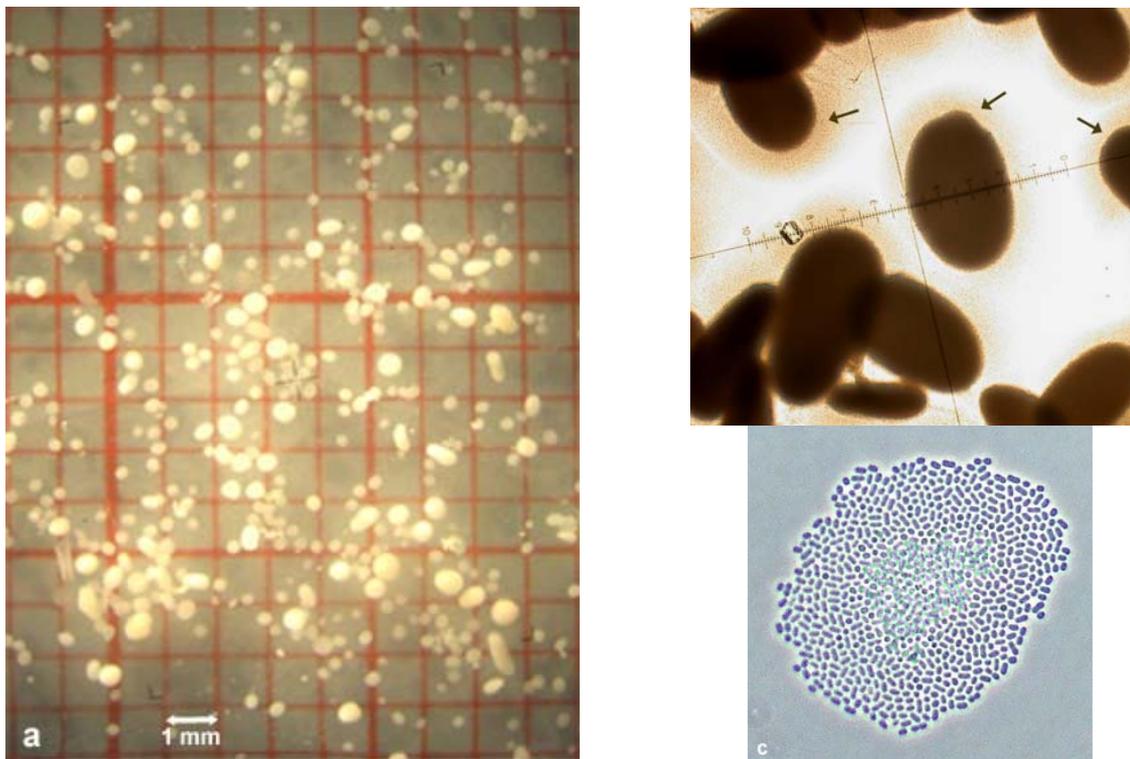


**Abb. 3.24:** Zeitlicher Verlauf der Flockenbildung nach unterschiedlicher Beimpfung (I und II, s. u.) der Hauptkultur und Inkubation bei 5 und 27 °C. Alle Ansätze im ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4% und pH 7,8-8,2).  
**I:** Beimpfung (etwa 2%ig) der Hauptkultur aus einer 24 h alten, bei 27 °C inkubierten Vorkultur.  
**II:** Zwei Kulturen für 36 h bei 27 °C vorinkubiert und dann je eine als Hauptkultur bei 5 und 27 °C weiter inkubiert.

Die unterschiedlichen Formen und die Größe der gebildeten Flocken sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Um die Flocken im Mikroskop in unzerstörtem Zustand bildlich dokumentieren zu

können (s. Abb. 3.25b), wurde ein wenig Probenmaterial in ein Loch eines Agarslides (s. Kap. 2.9.2) pipettiert. Wie in Abbildung 3.25b zu erkennen, wird ein „fester“, hier dunkel erscheinender „Kern“ von einem hellen „Kranz“ umgeben, der aus einzelnen, locker beieinander liegenden Zellen bestand. Eventuell handelte es sich dabei um erste Auflösungserscheinungen der Aggregate, die durch Lagerung des Präparates bei Raumtemperatur und anschließend durch die Temperatur der Mikroskoplampe beschleunigt wurden. Abbildung 3.25c zeigt eine durch ein Deckglas zerquetschte Flocke bei 1000facher Vergrößerung, dabei ist deutlich die dichte Lagerung der einzelnen Zellen zu erkennen.

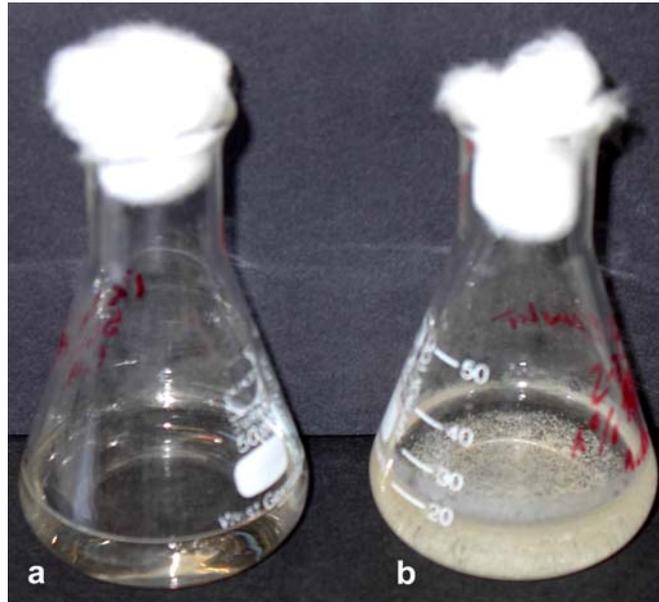
Die Größenbestimmung der Flocken wurde mit Hilfe von Millimeterpapier durchgeführt (s. Abb. 3.25a). Im Durchschnitt wiesen die Flocken (11 Tage Wachstum bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt) eine Größe von  $307 \pm 113 \mu\text{m} \times 410 \pm 187 \mu\text{m}$  auf.



**Abb. 3.25:** Photographische Aufnahmen der Zellaggregate (Flocken) von Isolat 88/2-7 (Inkubation bei 5 °C)  
**a)** 11 Tage alte, in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) gewachsene Kultur (12x, Stemi SV 6, Zeiss).  
**b)** 10 Tage alte, in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 1% Pepton (s. Kap. 2.9.1, Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) gewachsene Kultur (Agarslide mit Vertiefung, 100x, Axiolab, Zeiss). Ein Teilstrich des Okularmikrometers entspricht 10  $\mu\text{m}$ . Pfeile weisen auf hellen „Kranz“ (s. Text).  
**c)** „Quetschpräparat“ einer 9 Tage alten, in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 1% Pepton (s. Kap. 2.9.1, Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) gewachsenen Kultur (1000x, Axiolab, Zeiss).

### 3.8.2 Flockenbildung in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 1% Pepton

Das Isolat 88/2-7 zeigte auch bei Wachstum in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 1% Pepton (s. Kap. 2.9.1) Flockenbildung. Bei der 5 °C-Inkubation wurde das Medium völlig klar (s. Abb. 3.26), während es bei 27 °C eine weniger stark ausgeprägte Flockenbildung zeigte und trüb blieb. Der Verlauf der Flockenbildung entsprach weitestgehend dem der Inkubation in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (s. Abb. 3.24).



**Abb. 3.26:** Flüssigkulturen von Isolat 88/2-7 mit gebildeten Flocken (b) nach 9 d Inkubation bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 1% Pepton (s. Kap. 2.9.1); (a) unbeimpftes Medium

### 3.8.3 Ursache der Flockenbildung

Die Vermutung lag nahe, dass an dem Vorgang der Aggregatbildung EPS beteiligt sein könnten, was durch die Zugabe von Ca<sup>2+</sup>, EDTA und NaOH untersucht werden sollte.

#### 3.8.3.1 Flockenbildung bei verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen

Mit steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sollten die gebildeten Aggregate an Stabilität zunehmen. Die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration, die im normalerweise verwendeten ASN<sub>III</sub>-Medium (s. Kap. 2.3) 3,4 mM entsprach, wurde auf 10 bzw. 100 mM erhöht.

Die resultierenden drei Ansätze (3,4; 10 und 100 mM CaCl<sub>2</sub>) wurden aus einer Vorkultur beimpft, die 4 Tage bei 5 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium (3,4 mM CaCl<sub>2</sub>) angezogen worden war und noch keine Flocken aufwies. Nach dreitägiger Inkubation der Versuchsansätze bei 5 °C waren in allen An-

---

sätzen bereits Flocken erkennbar, die noch recht locker erschienen, und das Medium war bei allen Kulturen milchig trüb. Im Ansatz mit 100 mM  $\text{CaCl}_2$  waren lediglich etwas mehr Flocken zu erkennen als in den beiden anderen Ansätzen. Nach einem weiteren Tag zeigten die Ansätze deutliche Unterschiede. In dem nach wie vor milchig trüben, herkömmlichen  $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Medium (3,4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) waren die Flocken noch „fransig“, während das Medium mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  schon schwächer getrübt war und mehr Flocken aufwies, die bereits kugelig waren. In dem Ansatz mit der höchsten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration waren zu diesem Zeitpunkt bereits dicke, kugelige Flocken in einem nur noch schwach trüben Medium zu finden. Einen Tag später (5. Inkubationstag) war das Medium dieses Ansatzes vollständig klar, die Flocken – ihre Anzahl war hier am höchsten - hatten sich nicht mehr sichtlich verändert, waren aber kleiner als die bei 10 mM gebildeten. Nach sieben Tagen Inkubation war auch der Ansatz mit der geringsten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration völlig klar. Die Flocken waren etwas zahlreicher und etwas kleiner als die, die mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  entstanden waren. Im Ansatz mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  hatten sich die wenigsten Flocken gebildet und das Medium blieb leicht getrübt.

Leider wiesen die Aggregate bei Herunternahme vom Schüttler und Lagerung der Kolben bei RT nicht mehr die Auflösungserscheinung auf, wie sie von HEUCHERT (1999) beobachtet worden war, so dass über die Festigkeit der Flocken keine Aussage getroffen werden konnte. Die Flocken setzten sich lediglich am Boden des Kolbens ab und verklumpten zu einem großen Aggregat, das durch erneutes Schütteln wieder in kleinere zerfiel.

### 3.8.3.2 Wirkung von EDTA auf die Flocken

Den drei oben beschriebenen Kulturen (s. Kap. 3.8.3.1) wurde nach 10 Tagen Wachstum bei 5 °C EDTA zugegeben (Endkonzentration 1 mM). Die Kulturen wurden einen weiteren Tag inkubiert. Da keine Veränderung aufgetreten war, wurde erneut EDTA zugegeben, so dass die Endkonzentration in den einzelnen Ansätzen 10 mM betrug. Erneut trat nach 24 h keine Veränderung auf, so dass die Konzentration auf 20 mM erhöht wurde. Nach zwei weiteren Inkubationstagen hatte sich im Ansatz mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ein wenig Material am Boden des Erlenmeyerkolbens abgesetzt. In den anderen beiden Ansätzen war keine Veränderung erkennbar. Die EDTA-Konzentration wurde daher nochmals erhöht (30 mM). Nach drei weiteren Tagen (insgesamt jetzt sieben Tage Wachstum mit EDTA) war in allen Ansätzen eine Veränderung eingetreten. Im Ansatz mit 3,4 mM  $\text{CaCl}_2$  war das Medium nun trüb, aber es waren noch Flocken vorhanden. Mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  war das Medium nach wie vor klar, es waren noch viele Flocken vor-

---

handen, aber es war etwas Calcium ausgefallen, das sich am Boden des Erlenmeyerkolbens absetzte. Bei der höchsten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration (100 mM) war das Medium nun vollständig trüb (milchig weiß), es waren keine Flocken mehr vorhanden und beim Schütteln des Kolbens waren im Medium weiße Schlieren erkennbar.

### 3.8.3.3 Wirkung von NaOH auf die Flocken

Eine andere Methode, die zum Auflösen einer EPS-Matrix verwendet wird, ist z. B. die Zugabe von NaOH. Durch die Alkalisierung werden geladene Gruppen, z.B. Carboxylgruppen in Proteinen oder Polysacchariden, ionisiert, da deren isoelektrischer Punkt im Allgemeinen unter einem pH von 4 - 6 liegt.

Einer 10 Tage alten Kultur des Isolates 88/2-7 ( $\text{ASN}_{\text{III}}$ -Medium, 5 °C) wurde zunächst 5 M NaOH zugegeben, so dass die Endkonzentration 2 M betrug. Der Ansatz sowie ein Kontrollansatz mit unbeimpftem Medium wurden sofort trüb und die Flocken lösten sich nahezu vollständig auf. Die pH-Messung ergab einen Wert von 13,14.

Der Versuch wurde daraufhin mit einer 11 Tage alten Kultur wiederholt. Nun wurde die 5 M NaOH über mehrere Tage zugegeben. Eine teilweise erkennbare leichte Trübung des Kulturmediums löste sich wieder auf, wenn über Nacht keine NaOH zugegeben wurde. Nach acht Tagen (Gesamtzugabe an NaOH 72  $\mu\text{l}$ ) war auch in dem Vergleichsansatz eine Trübung erkennbar, d. h. die Trübung wurde anscheinend nicht durch den Zerfall der Flocken, sondern durch eine Fällungsreaktion ausgelöst. Nach 24 Tagen (Gesamtzugabe an NaOH 314  $\mu\text{l}$ ) waren kaum noch Flocken vorhanden und beide Ansätze zeigten zusätzlich durch Ausfällungen trübe Medien. Die Kultur wies einen pH-Wert von 9,4 auf und in der Kontrolle lag dieser bei 9,33.

---

## Teil B: Isolation von Reinkulturen aus dem äquatorialen Atlantik und deren Charakterisierung

Zum Vergleich der in der Antarktis isolierten Partikel-assoziierten Bakterien mit denen eines anderen Gebietes wurden im äquatorialen Atlantik (Station 7004-1, s. Abb. 6.1) ebenfalls an Aggregaten anheftende Bakterien isoliert. Bei diesen wurden dann vor allem morphologische Merkmale, aber auch die Enzymaktivitäten (Katalase und Oxidase) untersucht und eine Einordnung der Reinkulturen in die Bakteriengruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* sowie Gram-positive Bakterien (hoher und niedriger G+C-Gehalt, HGC bzw. LGC) mittels FISH vorgenommen. Bei ausgewählten pigmentierten Isolaten wurden anschließend die Pigmente näher untersucht, der G+C-Gehalt bestimmt und die 16S rRNA sequenziert.

### 3.9 Morphologische Eigenschaften, Untersuchungen zur Enzymaktivität sowie Eingruppierung der Isolate mittels FISH

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Morphologie, Enzymaktivität sowie der taxonomischen Einordnung mittels FISH sind in den Tabellen 6.7a-c (s. Kap. 6.5) zusammengefasst. Jede der Tabellen zeigt die Isolate aus einer bestimmten Wassertiefe (Tab. 6.7a aus 20 m, Tab. 6.7b aus 100 m und Tab. 6.7c aus 150 m Tiefe). Die Bezeichnung der Isolate resultierte aus dem Ablauf der Gewinnung der Reinkulturen. Die von der Ausgangsplatte (ASN<sub>III</sub>-Agar, s. Kap. 2.4.4.2) „gepickten“ Kolonien wurden durchnummeriert (z. B. 1, 2, etc.). Waren dann wieder mehrere Kolonietypen in einem Ausstrich zu erkennen, wurden alle auftretenden Typen erneut überimpft und zusätzlichen mit einem Buchstaben versehen (z. B. 4a, 4b, etc.). Bis zum Erhalt einer Reinkultur wurden nun weiter abwechselnd Zahlen und Buchstaben vergeben (z. B. 4a1c), wenn verschiedene Kolonietypen in einem Ausstrich wuchsen. Dabei wurden auch solche Kolonien überimpft, die in ihrer Morphologie anderen schon vorher isolierten ähnelten, d. h. es könnte sich hier teilweise um identische Arten handeln.

#### 3.9.1 Morphologie

Auf den „Stammplatten“ (s. Kap. 2.12) waren nach 6 Tagen Inkubation aus den verschiedenen Tiefen unterschiedlich viele Kolonien herangewachsen. Auf der Agarplatte der Probe aus 20 m Wassertiefe konnten zunächst zehn, aus 100 m Wassertiefe fünf und aus 150 m Wassertiefe 75 Kolonien erkannt werden. Während der weiteren Inkubation und Isolierung im Labor wurden letztlich insgesamt 405 Reinkulturen gewonnen. Aus 20 und 100 m Wassertiefe wurden jeweils

18 Reinkulturen angelegt und aus 150 m 369. Da die Kolonien zum größten Teil recht klein waren, war ihre Form, die meist erhaben oder konvex erschien, makroskopisch bzw. mit dem Stereomikroskop (Stemi SV 6, Zeiss) nur schwer erkennbar. Die Koloniemorphologie aller Isolate unterschied sich zum größten Teil weder in der Oberflächenbeschaffenheit noch in der Randausbildung. Sie besaßen meist eine glatte, glänzende Oberfläche und einen ganzen Rand. Wenige (Isolate 6d1b, 16b, 23a1, 27a, 34b1b, 34b2, 44b2b2, 44e2c, 50a2, 53a1a, 53a2b, 58b2b, 67c1b2, 69b1 und 70a1, alle 150 m) zeigten eine andere Oberflächen- und/oder Randstruktur (s. Tab. 6.7c, Kap. 6.5). Die Farben der Kolonien reichten von weiß über grau bis beige, gelb oder grünlich-gelb. Außerdem waren vier Isolate darunter, die bei bestimmtem Lichteinfall leicht bläulich schimmerten (Isolate 43a2, 43b2, 70a2 und 70c2, alle 150m). Die meisten Kolonien waren flach, erhaben oder konvex, einige waren knopfförmig oder zeigten Ansätze davon (Isolate 7b und 8b, beide 20 m Tiefe sowie Isolate 6d1b, 11c2, 15a2a, 19a1c1, 28c2, 31b1b, 48b1a, 48b2b, 49a2, 58b1b, 74a1c, 74b1, 74c1a, alle 150 m Tiefe). Eine Kolonie (Isolat 67c1b2, aus 150 m Tiefe) war kreisförmig, breitete sich aber flächig aus und eine andere (Isolat 48c2a, 150 m) zeigte bei älteren Kolonien radiäre Furchen. Bei drei Reinkulturen (Isolate 15a1a, 52c1c und 58a2, alle aus 150 m Tiefe) fiel auf, dass der vorher leicht trübe ASN<sub>III</sub>-Agar um den Impfstrich herum klar geworden war.

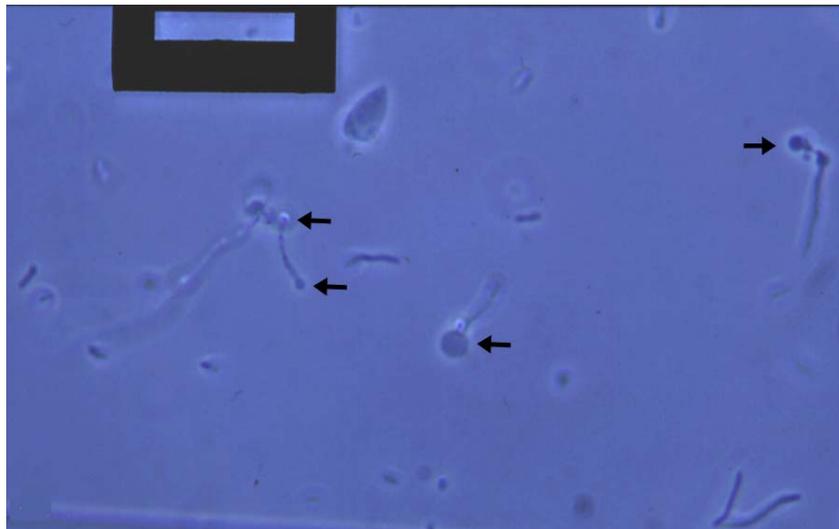
Die hauptsächlich vertretenen Zellformen waren Stäbchen (s. Abb. 3.28f und g), die u. a. leicht gekrümmt oder spirillenförmig waren (s. Abb. 3.28a). Einige lagerten sich zu Aggregaten zusammen (häufig sternförmig, s. Abb. 3.28b und c), andere traten nur einzeln oder teilweise in kurzen Ketten auf. Es konnten aber auch Diplokokken (Isolate 3b1a, 3b2b2, 5b3b, alle aus 100 m Tiefe, s. Abb. 3.32d) und gestielte Bakterien, die teilweise „budding“ zeigten (Isolate 5a, 24b1a, 28b1, 44a1a1, 44b2b2, 44c1b, 44e2c, 50b2, 52b2b und 68b1b, alle aus 150 m Tiefe, s. Abb. 3.28e), gefunden werden. Die verschiedenen Zellgrößen können den Tabellen 6.7a-c (s. Kap. 6.5) entnommen werden. Einige Reinkulturen wiesen in der mikroskopischen Betrachtung hell erscheinende Einschlüsse auf (s. Abb. 3.28h), die aber nicht näher untersucht wurden.

Als weitere Besonderheit waren bei einigen Isolaten zum Teil schon nach nur 24-stündiger Inkubation in ASN<sub>III</sub>-Medium zu Sphäroblasten aufgeblähte Zellen erkennbar. Diese waren bei Isolat 37a aus 150 m Wassertiefe besonders deutlich und sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

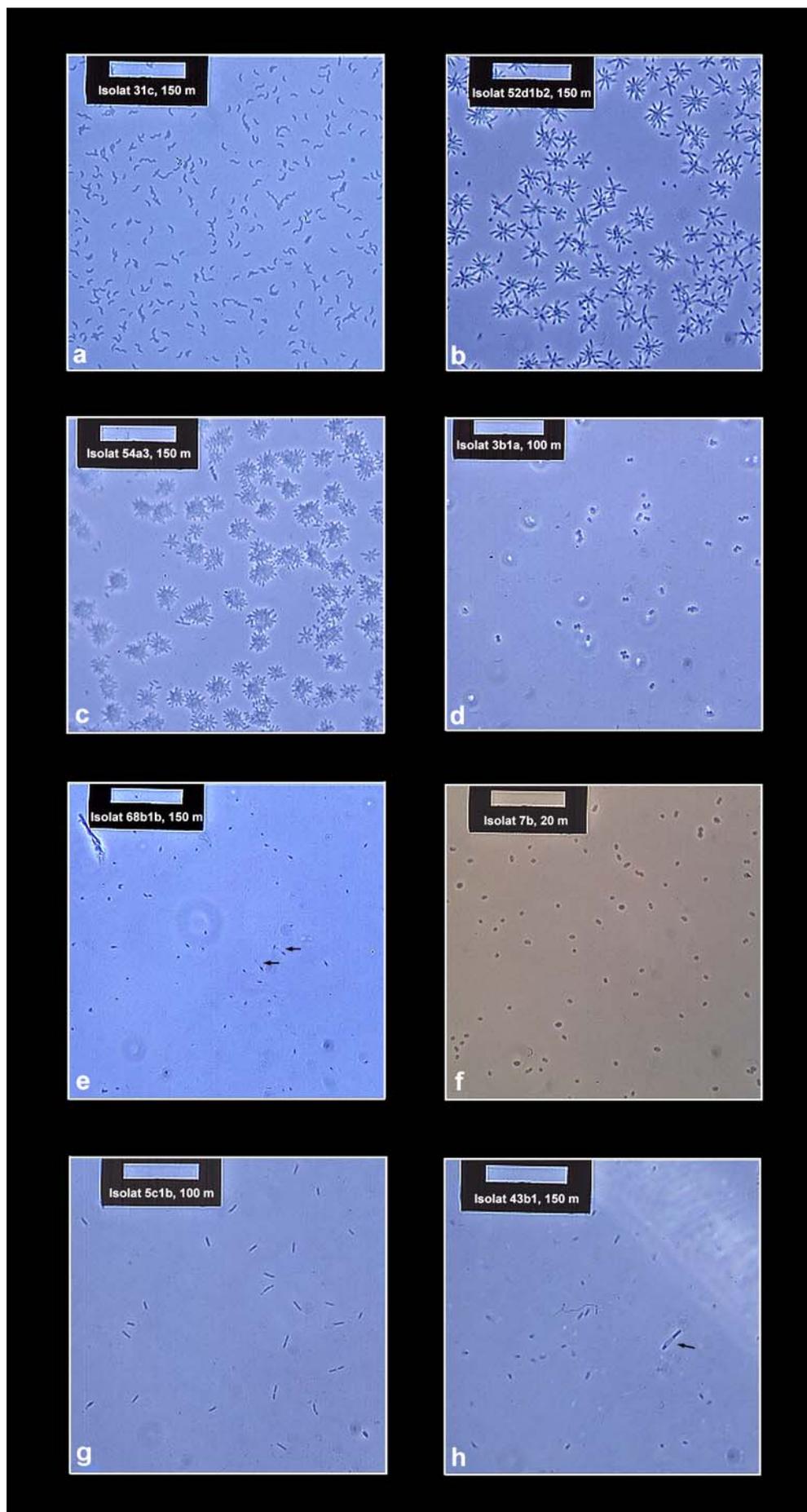
Die Beweglichkeit wurde zum einen mikroskopisch beobachtet, zum anderen mittels Schwärmaagar (s. Kap. 2.5.1.1) untersucht. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten sich die meisten Isolate beweglich und viele breiteten sich im Schwärmaagar aus (s. Tab. 6.7a-c, Kap. 6.5). Aufgrund

der Vorgehensweise, mehrere Isolate auf einer Schwärmagarplatte anzupflanzen, fielen auf einer Agarplatte drei Isolate auf (Isolate 30b1a, 34c1b1 und 44b2b2, alle 150 m Tiefe und alle zu den  $\alpha$ -*Proteobacteria* gehörend), die alle von einem anderen Isolat (Isolat 44a2, aus 150 m Tiefe,  $\gamma$ -*Proteobacteria*) umwachsen worden waren, um deren Kolonie sich aber jeweils ein schmaler Hemmhof ausgebildet hatte.

Bei den meisten Reinkulturen handelte es sich um Gram-negative Stäbchenbakterien. Nur drei Vertreter aus 100 m Tiefe (Isolate 3b1a, 3b2b2 und 5b3b) und ein Vertreter aus 150 m Wassertiefe (Isolat 16b) waren Gram-positiv. Das Gram-Verhalten konnte in den meisten Fällen im KOH-Test bestätigt werden. Einige Isolate (u. a. Isolat 5b aus 20 m Tiefe, s. Tab. 6.7a-c, Kap. 6.5) wurden aber trotz mehrfacher Durchführung des Tests durch die KOH nicht lysiert. In diesen Fällen zeigte sich aber immer ein eindeutiges Gram-negatives Färbeverhalten.



**Abb. 3.27:** Lichtmikroskopische Aufnahme von Sphäroblasten (←) in einer Flüssigkultur von Isolat 37a aus 150 m Wassertiefe (Station 7004-1, M49/4) nach 24 h Inkubation bei 27 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2). Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht 20  $\mu$ m.



**Abb. 3.28:**  
Legende siehe  
nachfolgende  
Seite

**Abb. 3.28:** Photographische Aufnahmen verschiedener Zellformen einiger Isolate von der Station 7004-1 (M49/4). Alle Isolate waren für 24-48 h bei 27 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) inkubiert worden. Das helle Fenster innerhalb der Maske entspricht 20 µm.

- a) spirillenförmige Zellen des Isolates 31c aus 150 m Wassertiefe;
- b) sternförmige Aggregate des Isolates 52d1b2 aus 150 m Wassertiefe;
- c) sternförmige Aggregate des Isolates 54a3 aus 150 m Wassertiefe;
- d) Diplokokken des Isolates 3b1a aus 100 m Wassertiefe;
- e) gestielte Bakterien, teilweise mit „budding“ (←) des Isolates 68b1b aus 150 m Wassertiefe;
- f) dicke Stäbchen des Isolates 7b aus 20 m Wassertiefe, Agarslidepräparat;
- g) dünnere Stäbchen des Isolates 5c1b aus 100 m Wassertiefe und
- h) Stäbchen mit Einschlüssen (←) des Isolates 43b1 aus 150 m Wassertiefe.

### 3.9.2 Enzymtests

Zum Nachweis der Cytochromoxidase bzw. der Katalase wurden die in den Kapiteln 2.6.5.2 bzw. 2.6.5.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse der Tests der einzelnen Isolate sind in den Tabellen 6.7a-c (s. Kap. 6.5) dargestellt.

Die meisten Isolate besitzen das Enzym Katalase (s. Tab. 6.7a-c, Kap. 6.5). Bei ihnen fand eine mehr oder weniger starke Entwicklung von Sauerstoff-Gasbläschen statt. Bei einigen Isolaten waren die Gasbläschen nur schwer zu erkennen, da entweder die Sauerstoff-Entwicklung sehr schwach war oder aber die Kulturen oftmals nur dünn angewachsen bzw. die Kolonien sehr klein waren.

Die Cytochromoxidase konnte bei nahezu allen Isolaten nachgewiesen werden. Lediglich bei den meisten gelb oder beige gefärbten Kolonien war keine oder eine nur sehr schwache Reaktion zu erkennen. Bei den vier Gram-positiven Isolaten fiel dieser Test negativ aus.

### 3.9.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Alle 405 Isolate der Station 7004-1 (M49/4) hybridisierten mit der Eubakterien-Sonde (EUB338). Bis auf einen Vertreter aus 150 m Wassertiefe, der bei der Sonde für die *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe ein Signal zeigte (0,25% der gesamten Isolate von dieser Station), hybridisierten alle Gram-negativen Isolate entweder mit der Sonde für die Gruppe der  $\alpha$ - oder der  $\gamma$ -*Proteobacteria* (s. Tab. 3.13 und Tab. 6.7a-c, Kap. 6.5). Dagegen hybridisierten die drei Gram-positiven Isolate aus 100 m Wassertiefe (Isolate 3b1a, 3b2b2, 5b3b) mit der Sonde für die LGC (0,74% aller Isolate von dieser Station) und das Gram-positive Isolat aus 150 m Tiefe (Isolat 16b) mit der HGC-Sonde (*Actinobacteria*, 0,25% der gesamten Isolate von dieser Station).

Tabelle 3.13 zeigt eindeutig, dass die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien den größten Anteil aller Isolate stellten. An der gesamten Station machten sie 58,77% (238 Isolate) bzw. 40% (161 Isolate) aus. Dabei fällt auf, dass in den Proben aus 20 m und 100 m Tiefe der Anteil der  $\gamma$ -Proteobakterien (61,11%) höher ist als der der  $\alpha$ -Proteobakterien (38,89 bzw. 22,22%), während es in 150 m Tiefe genau umgekehrt der Fall war (61,52%  $\alpha$ - und 37,94%  $\gamma$ -Proteobakterien).

**Tab. 3.13:** Prozentualer Anteil der Vertreter der verschiedenen Bakteriengruppen in den unterschiedlichen Wassertiefen der Station 7004-1 (M49/4)

Wassertiefe (m)	Prozentualer Anteil der Vertreter der Bakteriengruppe <sup>a</sup>				
	$\alpha$ -Proteobacteria	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Cytophaga-Flavobacteria</i>	LGC	HGC
20	38,89 (7)	61,11 (11)	0	0	0
100	22,22 (4)	61,11 (11)	0	16,67 (3)	0
150	61,52 (227)	37,94 (140)	0,27 (1)	0	0,27 (1)

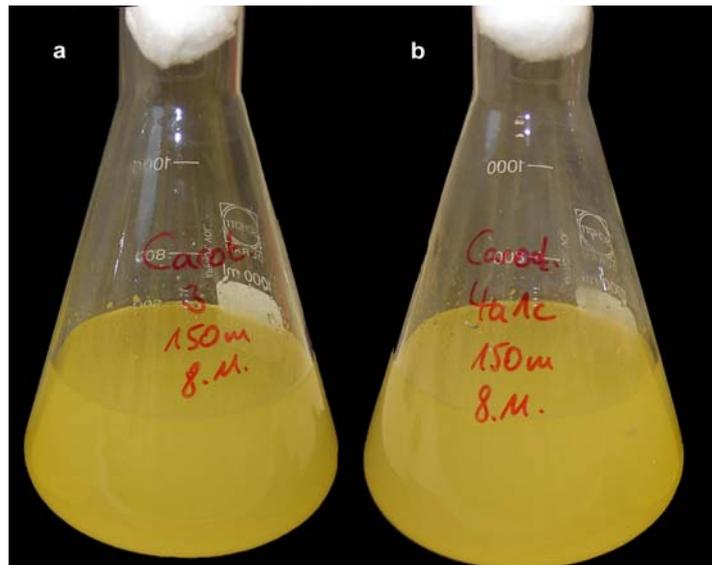
LGC, niedriger G+C-Gehalt; HGC, hoher G+C-Gehalt

<sup>a</sup> absolute Anzahl der Isolate in Klammern

Werden alle erhaltenen Merkmale (s. Kap. 3.9.1 bis 3.9.3) der einzelnen Isolate verglichen, so ist festzustellen, dass sich einige in ihren Eigenschaften sehr ähneln. Hier könnte es sich zum Teil um identische Arten handeln, was in weiteren molekularbiologischen Untersuchungen, wie ARDRA, RAPD oder 16S rRNA-Sequenzierung, untersucht werden müsste.

### 3.10 Carotinoidbestimmung

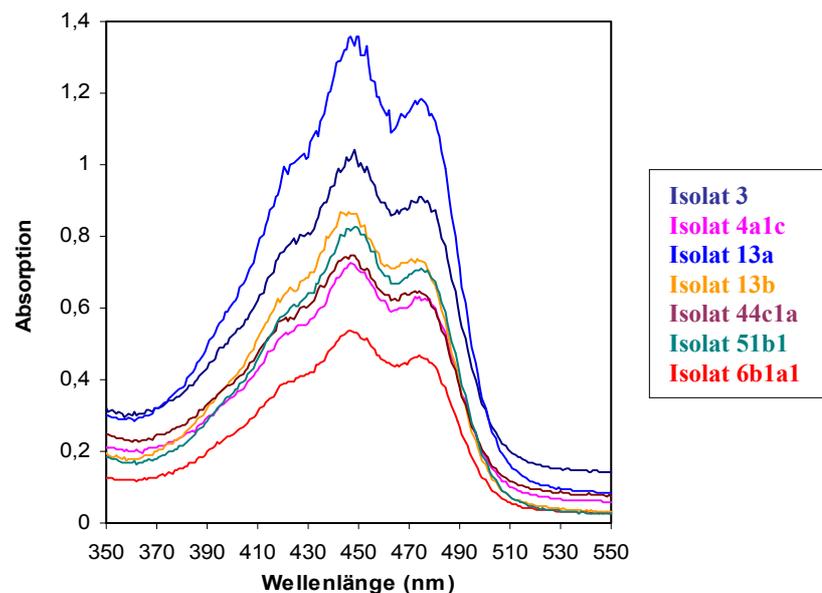
Beim Wachstum auf ASN<sub>III</sub>-Agar zeigten einige Isolate die Ausbildung von mattgrünen, gelbgrünen oder orange-gelben Kolonien (s. Tab. 6.7a-c, Kap. 6.5) und beim Wachstum in ASN<sub>III</sub>-Medium färbte sich das Medium leicht gelblich, wie für die Isolate 3 und 4a1c dokumentiert (s. Abb. 3.29). Von den Reinkulturen aus 150 m Wassertiefe wurden zunächst sieben Isolate willkürlich ausgewählt. Bei diesen Isolaten sollte das farbgebende Pigment mittels Absorptionsspektrum und einer Reversed Phase HPLC näher charakterisiert werden.



**Abb. 3.29:** Photographische Aufnahme gefärbter Flüssigkulturen der Isolate 3 (a) und Isolat 4a1c (b) aus 150 m Wassertiefe von der Station 7004-1 (M49/4) nach 3 Tagen Wachstum bei 27 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2).

### 3.10.1 Spektrophotometrische Pigmentbestimmung

Die zunächst photometrisch bestimmten Absorptionsspektren der Methanolextrakte der einzelnen Isolate (s. Kap. 2.15.1.1) sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Bei allen ist das für Carotinoide typische dreiteilige Spektrum (s. Kap. 2.7.1.2) zu erkennen. Auffallend ist, dass die Spektren der Isolate eine recht ähnlich Lage der Absorptionsmaxima und Schultern aufweisen (alle zwischen 410 und 490 nm; s. Abb. 3.30 und Tab. 3.14).



**Abb. 3.30:** Absorptionsspektren der Methanolextrakte ausgewählter Isolate aus 150 m Wassertiefe von Station 7004-1 (M49/4) nach 24-48 h Wachstum bei 27 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2).

## 3.10.2 Reversed Phase HPLC

Bei der Reversed Phase HPLC, modifiziert nach RABENSTEIN (1997), konnte nur bei den Isolaten 6b1a1 und 51b1 ein Peak nach einer Retentionszeit von 4,83 (Isolat 6b1a1) bzw. 4,87 min (Isolat 51b1) im DAD nachgewiesen werden. Die beiden mit dem DAD aufgenommenen Absorptionsspektren gleichen sich annähernd in der Lage ihrer Absorptionsmaxima (s. Tab. 3.14). Die jeweils nur angedeuteten Schultern liegen allerdings 10 nm auseinander. Das Spektrum des Isolates 6b1a1 entspricht in etwa dem Zeaxanthin-Standard (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) mit den Absorptionsmaxima (435), 456 und 480 nm (s. Tab. 3.8).

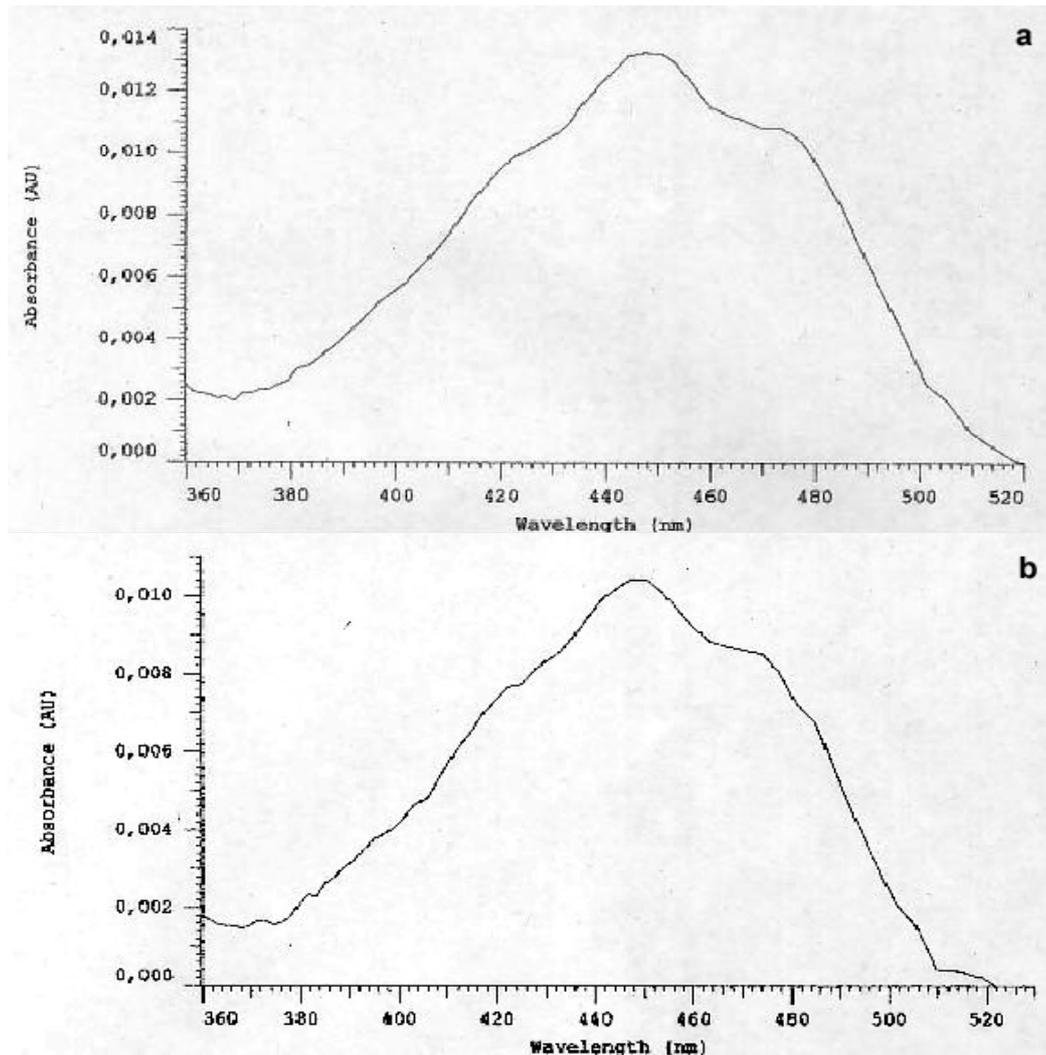
Die zwei Isolate 3 und 4a1c, bei denen mit Hilfe der nach RABENSTEIN (1997) modifizierten Methode keine Pigmentpeaks nachgewiesen werden konnten, wurden anschließend mit einer anderen Methode zur Pigmentbestimmung mittels Reversed Phase HPLC untersucht. Die nach STEPNOWSKI und BLOTEVOGEL modifizierte Methode (persönliche Mitteilung, s. Kap. 2.15.1.2.2) ergab bei beiden Isolaten keine Unterschiede zwischen verseiften und unverseiften Probe. Bei allen Ansätzen zeigte sich nach einer Retentionszeit von etwa 2,1 min im DAD ein Peak. Auch die Absorptionsspektren (s. Abb. 3.31a und b) verlaufen nahezu identisch und zeigen bei 447 und 474 jeweils ein Maximum. Bei 422 nm tritt eine Schulter auf, die bei Isolat 4a1c allerdings nur angedeutet ist.

**Tab. 3.14:** Vergleich der Absorptionsmaxima aus spektrophotometrischer Messung und Reversed Phase HPLC von Methanolextrakten ausgewählter Isolate aus 150 m Wassertiefe von der Station 7004-1 (M49/4)

Isolat	Absorptionsmaxima <sup>a</sup> (nm)	
	spektrophotometrisch	Reversed Phase HPLC (DAD) modifiziert nach RABENSTEIN (1997)
3	429 448 475	-
4a1c	428 447 472	-
6b1a1	422 446 474	(438) 457 477
13a	424 450 475	-
13b	423 443 473	-
44c1a	421 448 474	-
51b1	424 449 475	(428) 454 474

<sup>a</sup> in Klammern: angedeutete Schulter

-, kein Peak registriert



**Abb. 3.31:** Absorptionsspektren (DAD) der Methanol-Aceton-Extrakte (4:1, v/v) der Isolate 3 (a) und 4a1c (b) aus 150 m Wassertiefe von der Station 7004-1 (M49/4) nach 4 Tagen Wachstum bei 27 °C in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2). Die Diagramme besitzen unterschiedliche Skalierungen.

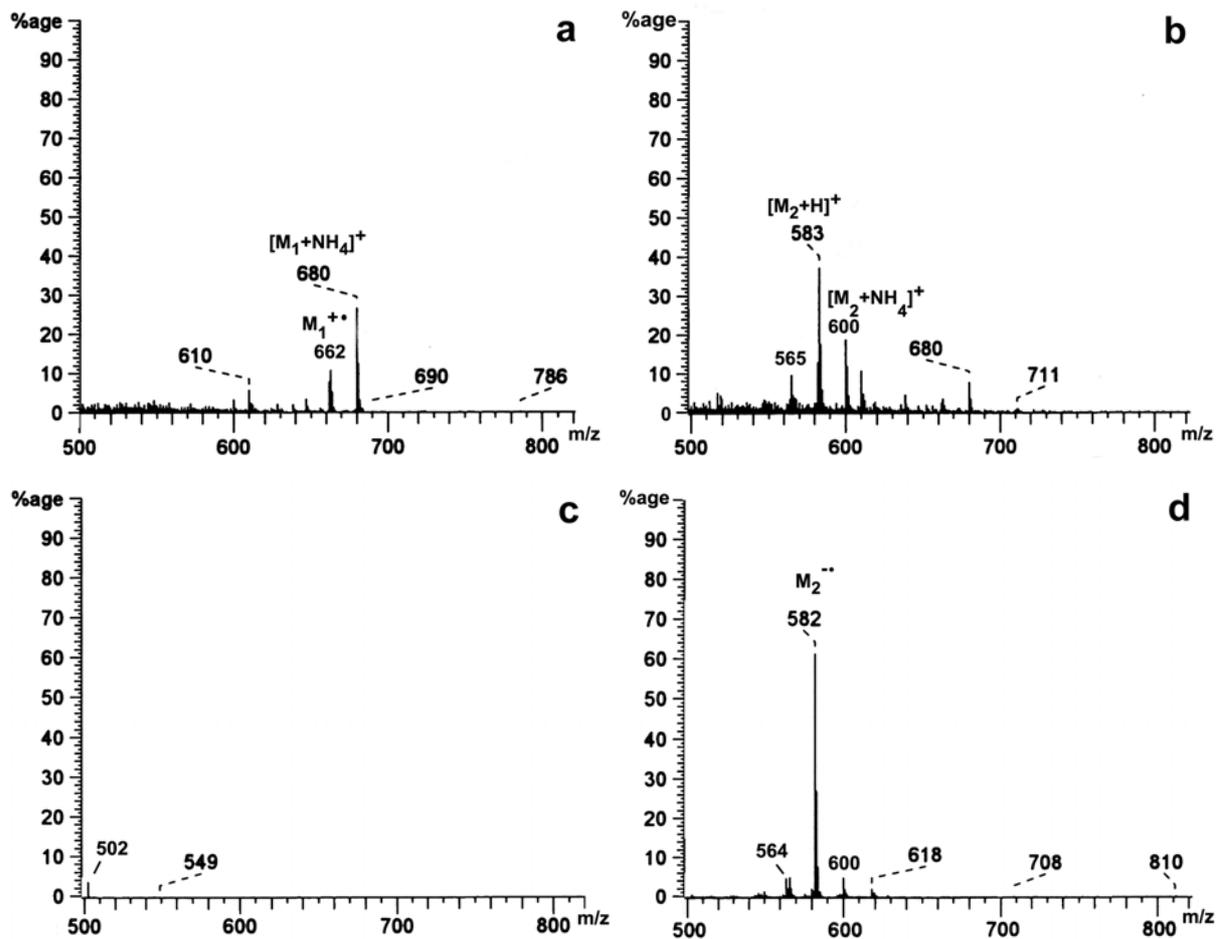
### 3.10.3 Massenspektrometrie (MS)

Für die MS standen 3,8 mg (Isolat 3) und 1,78 mg (Isolat 4a1c) getrocknetes Pigment (s. Kap 2.15.1.3.3) zur Verfügung. Alle durch die verschiedenen MS-Methoden (s. Kap. 2.15.1.3.4) erhaltenen Chromatogramme waren für beide Isolate relativ identisch, wobei die Probe von Isolat 4a1c etwas weniger verunreinigt zu sein schien. Bei beiden Proben hatten sich während der Pigmentextraktion Phthalate - wahrscheinlich aus den Eppendorfreaktionsgefäßen - gelöst, die in den MS-Spektren ebenfalls zu erkennen waren ( $m/z$  u. a. 441). Aufgrund des Auftretens von Quasi-Molekülonen in vielen MS-Techniken (s. Kap. 2.15.1.3.4), z. B.  $[\text{Masse} + \text{Na}]^+$ , muss zur jeweils gefundenen Massenzahl immer auch die Angabe des identifizierten Protons/Elektrons oder zumindest deren Masse erfolgen. So z. B. auch bei den während der Analyse von Caroti-

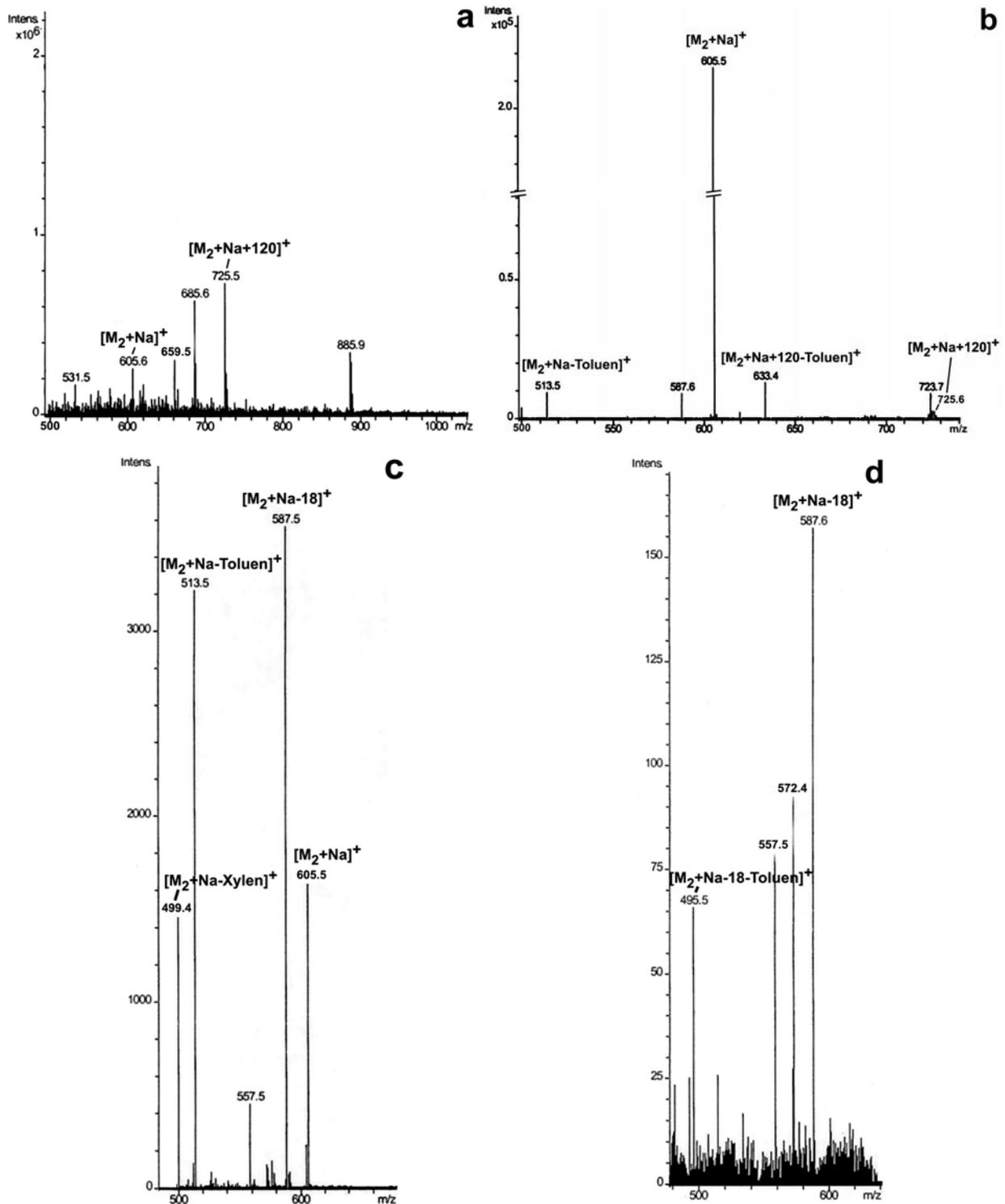
---

noiden häufig auftretenden typischen Ionen  $[M-92]^+$  (Abspaltung von Toluol) und  $[M-106]^+$  (Abspaltung von Xylen).

Bei der Interpretation der aufgenommenen MS-Spektren wurden zunächst zwei Massenzahlen ( $m/z$ , Masse/Ladungsverhältnis),  $m/z$  662 ( $M_1$ ) und  $m/z$  582 ( $M_2$ ), für ein mögliches Carotinoid näher in Betracht gezogen, z. B. im Spektrum der Positiv-Ionen DCI (s. Abb. 3.32a und b). In nahezu allen Spektren waren diese Massenzahlen zu finden, die von Quasi-Molekülonen oder die von Fragmenten des Pigmentes stammen (z. B.  $M-92$ , s. o.). Dass es sich bei der  $m/z$  662 nicht um ein Carotinoid handeln konnte, zeigte die Auswertung der Negativ-Ionen DCI-Spektren. Hier traten keine Radikal-Anionen von  $m/z$  662 auf (s. Abb. 3.32c), die vor allem dann entstehen, wenn eine Substanz viele Doppelbindungen enthält, was für Carotinoide typisch ist. Die Analyse der ESI-Spektren bestätigte dies, denn die Tandem-MS von  $m/z$  685  $[M_1 + Na]^+$  ergab keine für Carotinoide typische Fragmentierung (s. o., Daten nicht gezeigt). Somit blieb lediglich die Massenzahl 582 als mögliches Carotinoid. Von dieser trat im Negativ-Ionen DCI-Spektrum auch ein Radikal-Anion ( $M_2^{\cdot-}$ ) auf (s. Abb. 3.32d). Dass es sich bei diesem Wert um ein Carotinoid handeln musste, zeigten vor allem die mittels Positiv-Ionen ESI aufgenommenen Spektren (s. Abb. 3.33). Bei der Tandem-MS der Massenzahl 725 (s. Abb. 3.33b), die sich aus der Massenzahl 582 plus ein Natrium-Ion (Massenzahl  $\sim 23$ ) plus ein Natriumdihydrogenphosphat- oder Natriumhydrogensulfat-Ion (beide Massenzahl  $\sim 120$ ) zusammensetzte, traten auch Peaks auf, die aus einem Pigmentfragment abzüglich eines Toluol-Ions (Massenzahl  $\sim 92$ ) bestanden, einem der bei der Carotinoidanalyse auftretenden typischen Ionen (s. o.). Bei der weiteren Auftrennung der  $m/z$  605 trat neben dem Toluol-Ion auch ein Xylen-Ion (Massenzahl  $\sim 106$ ) auf (s. Abb. 3.33c). Die ebenfalls vorkommende Massenzahl 18 könnte auf die Abspaltung von Wasser zurückzuführen sein. In Abbildung 3.33d ist noch einmal das für Carotinoide typische Toluol-Ion nach Auftrennung der Massenzahl 587 wieder zu finden.



**Abb. 3.32:** DCI-Massenspektren der Pigmentprobe von Isolat 4a1c (150 m Wassertiefe, Station 7004-1, M49/4)  
a: Positiv-Ionen DCI,  $\text{NH}_3$ , 289 mA; b: Positiv-Ionen DCI,  $\text{NH}_3$ , 370 mA; c: Negativ-Ionen DCI,  $\text{NH}_3$ , 94 mA; d: Negativ-Ionen DCI,  $\text{NH}_3$ , 352 mA



**Abb. 3.33:** Positiv-Ionen ESI-Massenspektren der Pigmentprobe von Isolat 4a1c (150 m Wassertiefe, Station 7004-1, M49/4). Die Achseneinteilungen sind unterschiedlich.  
**a:** MS-Spektrum; **b:** Tandem-MS (MS/MS) von  $m/z$  725; **c:**  $MS^3$  von  $m/z$  725-605; **d:**  $MS^4$  von  $m/z$  725-605-587

Die Massenzahl von 582 wurde als die des Pigmentes erfasst, bei dem es sich demnach um ein Carotinoid handelte (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. T. Dülcks, Abt. Instrumentelle Analytik, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Bremen). Eine anschließend durchgeführte Hoch-

---

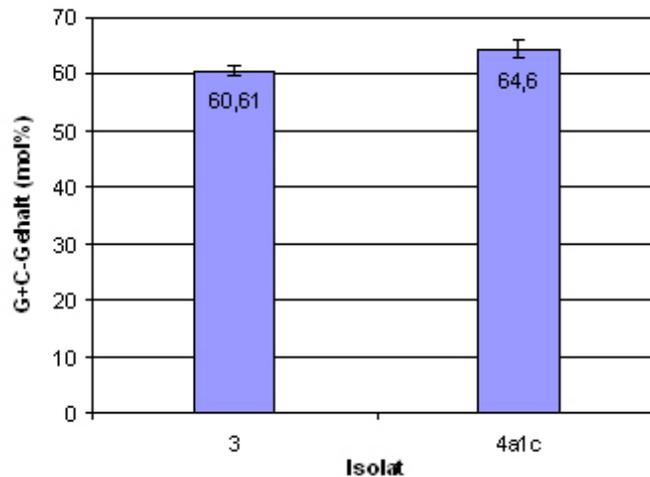
auflösungs-EI ergab nach Entfernung aller unwahrscheinlichen Summenformeln für beide Isolate die Summenformel  $C_{40}H_{54}O_3$  (zur Berechnung wurden die Elemente C, H und O vorgegeben). Die dafür berechnete  $m/z$  betrug 582,4073, die für Isolat 3 gemessene  $m/z$  dagegen 582,40875, was einer Abweichung von 2,5 ppm entsprach. Für Isolat 4a1c betrug die Abweichung lediglich 0,5 ppm ( $m/z$  582,40701).

### 3.11 G+C-Gehalt der DNA und 16S rRNA-Sequenz

Um die beiden Isolate 3 und 4a1c, deren Pigmente mittels MS näher untersucht wurden, taxonomisch einordnen zu können, wurde zunächst der G+C-Gehalt ihrer DNA bestimmt und anschließend ihre 16S rRNA ansequenziert. Der erhaltene G+C-Gehalt wurde dann mit dem der laut 16S rRNA nächstverwandten Art verglichen. Wenn die nächstverwandte Art und das jeweilige Isolat einer Gattung angehören, sollten sie in ihrem G+C-Gehalt nicht mehr als 10 mol% voneinander abweichen (ROSSELLÓ-MORA und AMANN, 2001).

Die Bestimmung des G+C-Gehaltes wurde mit Hilfe der thermischen Denaturierung vorgenommen ( $T_m$ -Bestimmung, s. Kap. 2.16.2). Die vorweg untersuchte Reinheit der DNA anhand der Quotienten aus den Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{230}/A_{260}$ ) ergab, dass die Isolate sowohl bei  $A_{260}/A_{280}$  als auch bei  $A_{230}/A_{260}$  innerhalb des Bereiches der Idealwerte von 1,8 bis 2,0 bzw. 0,3 bis 0,9 lagen (MOORE et al., 1999).

Bei beiden Isolaten wurden mehrere Messungen zur Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA durchgeführt, deren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen in Abbildung 3.34 vergleichend dargestellt sind. Die Berechnung des  $T_m$  wurde mit Hilfe der jeweiligen Schmelzkurve vorgenommen (Daten nicht dargestellt), anhand der die halbmaximale Extinktion bestimmt wurde.



**Abb. 3.34:** Mittelwert ( $T_m$ -Bestimmung) und Standardabweichung der G+C-Gehalte (mol%) der Isolate 3 und 4a1c (150 m Wassertiefe, Station 7004-1, M49/4).

Die beiden Isolate weichen um 4 mol% in ihren G+C-Gehalten voneinander ab. Sie könnten demnach derselben Gattung oder sogar derselben Art angehören, was die bei der Morphologie, der Pigmentuntersuchung und der FISH bereits festgestellten Ähnlichkeiten erklären würde.

Eine Teilsequenzierung der 16S rRNA sollte hier weitere Klarheit verschaffen. Die Sequenzierung (s. Kap. 2.16.3) ergab für Isolat 3 eine Sequenz von 571 Basen und für Isolat 4a1c von 573 Basen (s. Kap. 6.6). Beide Teilsequenzen zeigten eine Übereinstimmung von 99,6% zueinander. Lediglich an zwei Positionen unterschieden sich die beiden Sequenzen. Die mit Hilfe von BLAST (s. Kap. 2.8.6.1) ermittelte größte Übereinstimmung in der 16S rRNA-Sequenz zeigten das Isolat 3 mit 99% und das Isolat 4a1c mit 100% zur Teilsequenz des „Marine arctic deep-sea bacterium FC8b“ vom Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie (Bremen), einem  $\alpha$ -Proteobakterium. Eine Übereinstimmung von 99% zeigten beide Isolate außerdem mit der Teilsequenz von *Erythrobacter citreus* HY-6.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Physiologische Eigenschaften – Anpassung der Antarktisisolate an ihr Habitat

#### 4.1.1 Temperatur

In der Antarktis liegen nach menschlichem Empfinden extreme Umweltbedingungen vor. Neben dauerhaft niedrigen Lufttemperaturen sind auch die Wassertemperaturen relativ gering. Sie liegen im Bereich der Polarfront bei etwa 5 °C und in der Küstenregion bei etwa -2 °C. Südlich der Polarfront (55° südlicher Breite) variieren die Wassertemperaturen an der Oberfläche im Jahresverlauf um nicht mehr als 3-5 °C (VINCENT, 1988). Ebenso wie an hohe Temperaturen (thermophile oder extrem thermophile Arten) haben sich Bakterien auch an niedrige Temperaturen angepasst. Am wichtigsten ist es für die Bakterien, ihre Membranfluidität und die Aktivität der Membran-gebundenen Enzyme aufrecht zu erhalten, was sie über eine Veränderung in ihrer Fettsäurezusammensetzung regeln können (s. Kap. 4.2.1).

In diesem extremen Habitat wurden zunächst vor allem psychrophile Bakterien, mit einem Temperaturoptimum von  $\leq 15$  °C und einer maximalen Wachstumstemperatur von  $< 20$  °C, erwartet. Sie konnten in Meereisproben auch nachgewiesen werden (BOWMAN et al., 1997a). Die aus marinen Wasserproben der Antarktis isolierten Bakterien wurden aber eher den psychrotoleranten, deren optimale Wachstumstemperatur bei  $> 20$  °C liegt und die auch bei 4 °C Wachstum zeigen (BOWMAN et al., 1997a), zugeordnet (DELILLE und PERRET, 1989; DELILLE, 1992, 1993; BOWMAN et al., 1997a). SIMON und Mitarbeiter (1999) wiesen im Oberflächenwasser im Bereich der Polarfront ebenfalls psychrotolerante oder sogar mesophile Organismen nach, konnten aber weiter südlich (u. a. antarktischer Zirkumpolarstrom, Eisrandzone) aus Wasserproben auch psychrophile Bakterien isolieren. Die in der vorliegenden Arbeit beprobte Station 49/088/2 (66°27,8'S) lag in etwa im Bereich des von SIMON et al. (1999) als Eisrand bezeichneten Gebietes (68°50,57'S). In der vorliegenden Arbeit wurden aber alle untersuchten Isolate dieser Station ebenso wie die der Station 49/020/1 als psychrotolerant eingestuft. Ihre Temperaturoptima liegen bei 10-23, 15-23 bzw. 10-35 °C und alle zeigten bei Temperaturen von 5 bis  $\leq 40$  °C Wachstum. Aufgrund des relativ hohen Temperaturoptimums (10-35 °C) könnte Isolat 88/2-2 auch den mesophilen Organismen (Optimum 25-40 °C, MADIGAN et al., 2000) zugeordnet werden, aber keines der Isolate ist psychrophil. Die bereits von HEUCHERT (1999) und DE SILVA (2001) untersuchten Antarktisisolate wurden ebenfalls alle als psychrotolerant eingestuft. Durch die in dieser

---

Arbeit jahreszeitlich spätere Probennahme lagen die Wassertemperaturen (ca.  $-1,7\text{ °C}$ ) beinahe  $2\text{ °C}$  tiefer als bei SIMON et al. (1999), was zunächst auch hier psychrophile Organismen erwarten lässt. Eventuell hat die lange Lagerung der Proben bei  $-30\text{ °C}$  und später  $-18\text{ °C}$  bis zu ihrer Bearbeitung im Labor zu einer Veränderung der Bakteriengemeinschaft geführt, also dem Verlust psychrophiler Organismen. So beobachteten FERGUSON et al. (1984) bereits bei der Aufbewahrung einer Pikoplanktonfraktion in einem geschlossenen Gefäß innerhalb weniger Stunden eine stark erhöhte Koloniebildungsrate und damit veränderte Diversität. Auch die Kultivierungsbedingungen an sich ( $27\text{ °C}$  und  $5\text{ °C}$ , 0,1% Hefeextrakt) können zu einer Selektion ausschließlich psychrotoleranter oder mesophiler Organismen geführt haben. Eventuell wurden die Agarplatten nicht lange genug inkubiert und langsamer wachsende, psychrophile Arten somit übersehen. Psychrotolerante Bakterien sind in der Lage, schnell auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen zu reagieren und können einen großen Bereich an Kohlenstoffquellen nutzen (BOWMAN et al., 1997a). In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem ausschließlich Partikel-assoziierte Bakterien isoliert, d. h. an den untersuchten Stationen könnten durchaus psychrophile Bakterien in der frei lebenden Bakteriengemeinschaft vertreten gewesen sein.

Die aus antarktischen Küstenregionen isolierten psychrotoleranten Bakterien wurden von BOWMAN und Mitarbeitern (1997a) den Gattungen *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Planococcus*, *Halobacillus* und *Hyphomonas* zugeordnet. Psychrotolerante Vertreter der ersten drei genannten Gattungen konnten auch aus Oberflächen- und Tiefseewasserproben des nordwestlichen Pazifiks isoliert werden, was auf eine weite Verbreitung dieser Gattungen als marine psychrotolerante Organismen hindeutet (RADJASA et al., 2001). Psychrotolerante Bakterien sind weit verbreitet, können in Böden und Gewässern, in Fleisch, Milch, Gemüse und Obst sowie weiteren Produkten, die bei  $4\text{ °C}$  gelagert werden, gefunden werden (MADIGAN et al., 2000) und sind anpassungsfähiger an einen größeren Temperaturbereich als psychrophile Organismen (GOUNOT, 1991). In den bearbeiteten Proben der vorliegenden Arbeit wurden Partikel-assoziierte Vertreter der Gattungen *Pseudoalteromonas* und *Psychrobacter* ebenfalls als psychrotolerant beschrieben.

#### 4.1.1.1 Flockenbildung

Die bei Isolat 88/2-7 (*Psychrobacter nivimaris*) während der Inkubation bei  $5\text{ °C}$  beobachtete Flockenbildung, bei der sich nahezu alle Zellen einer Flüssigkultur zu Flocken zusammenlagerten, könnte auf die Bildung „klebriger“ Substanzen zurückzuführen sein, die eine besondere An-

---

passung an den Lebensraum „Aggregat“ darstellen könnten. Diese Substanzen könnten extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) sein, die u. a. von marinen Bakterien, z. B. *Pseudoalteromonas*-Arten, abgesondert werden (WRANGSTADH et al., 1990; HOLMSTRÖM und KJELLEBERG, 1999; DECHO, 2000).

EPS sind Bestandteil von mikrobiellen Biofilmen, TEP und Marine Snow (ALLDREDGE et al., 1993) und sind sowohl für die Mikroorganismen in den Aggregaten, die dort z. B. synergistische Gemeinschaften bilden und so komplexe Nährstoffe abbauen können (FLEMMING, 2000), als auch für deren physikalisch-chemischen Eigenschaften wichtig (NIELSEN und JAHN, 1999). Derartige polymere Substanzen stellen einen Schutz vor Antibiotika und räuberischen Protozoen dar, dienen der Steigerung der Nährstoffaufnahme und reduzieren die Diffusion einiger Substanzen zur Zelle und von ihr weg (HOLMSTRÖM und KJELLEBERG, 1999). EPS sind sehr heterogen und enthalten neben Polysacchariden und Proteinen als Hauptbestandteile unter anderem auch noch Nucleinsäuren, Lipide und andere Makromoleküle (NIELSEN und JAHN, 1999; FLEMMING, 2000; FLEMMING und WINGENDER, 2001). Die EPS bestehen also nicht nur aus Sekreten der Mikroorganismen, sondern auch aus Produkten der Zellyse und der Hydrolyse von Makromolekülen sowie aus der Wasserphase adsorbierten organischen Materialien (NIELSEN und JAHN, 1999). Aufgrund der Heterogenität der EPS-Matrix muss für jeden Einzelfall die optimale Extraktionsmethode zunächst in einer Versuchsreihe ermittelt werden. Dabei kommt es zum einen darauf an, ob eine qualitative oder quantitative Bestimmung erfolgen soll, zum anderen hängt die Extraktionsmethode von der Art der Wechselwirkungen ab (u. a. van der Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen), die die EPS-Komponenten in der Matrix zusammenhalten. Zur Extraktion stehen physikalische (z. B. Zentrifugation) und chemische Methoden oder eine Kombination aus beiden zur Verfügung. Viele chemische Extraktionsmethoden beruhen auf dem Aufbrechen der elektrostatischen Wechselwirkungen (NIELSEN und JAHN, 1999). Eine Abstoßung der EPS-Komponenten untereinander kann z. B. durch NaOH Zugabe oder Austausch der divalenten Kationen, vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ , das für die Vernetzung geladener Komponenten der EPS-Matrix und damit deren Stabilität (FLEMMING und WINGENDER, 2001) wichtig ist, gesteigert werden (NIELSEN und JAHN, 1999). Werden divalente Kationen z. B. mit Hilfe von Komplexbildnern wie EDTA entfernt, neigt die Matrix dazu zu zerfallen (NIELSEN und JAHN, 1999).

Unter den in der vorliegenden Arbeit gegebenen Bedingungen scheint  $\text{Ca}^{2+}$  eher eine untergeordnete Rolle bei der Verfestigung der EPS-Matrix zu spielen. Eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -

---

Konzentration im Kulturmedium hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Festigkeit der Flocken. Eine EDTA-Zugabe hatte den größten Einfluss auf die Flocken, die in dem Medium mit der höchsten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration gebildet wurden. Eventuell befinden sich auf der Bakterienoberfläche nur wenige geladene Moleküle, die an der Aggregatbildung beteiligt sind, so dass der Verlust an divalenten Kationen keine großen Auswirkungen hat. Allerdings zeigte die Behandlung mit 5 M NaOH bei einem pH-Wert  $>9$  eine nahezu vollständige Auflösung der Flocken und liegt damit in einem pH-Bereich (9-13), der in verschiedenen Untersuchungen zur Ionisierung geladener Gruppen, wie Carboxylgruppen in Polysacchariden, angewendet wurde (NIELSEN und JAHN, 1999). Da auch in dem unbeimpften Vergleichsansatz eine Trübung auftrat, ist es möglich, dass die Auflösung der Flocken durch eine Fällungsreaktion ausgelöst wurde und nicht durch die Ionisierung möglicher geladener Gruppen auf der Zelloberfläche.

Der Aggregationsauslöser bzw. der –verstärkende Faktor müsste in einer weitergehenden Untersuchung ermittelt werden. Die Temperatur könnte dabei einen großen Einfluss haben, denn die Flockenbildung war zwar auch bei 27 °C zu beobachten, aber in sehr viel geringerem Ausmaß. Eine von der Temperatur beeinflusste EPS-Produktion wurde kürzlich von MANCUSO NICHOLS und Mitarbeitern (2004) bei zwei Partikel-assoziierten *Pseudoalteromonas*-Arten aus marinen Proben der Antarktis beschrieben. Diese produzierten bei niedrigeren Temperaturen (-2 und 10 °C) etwa 30mal mehr EPS als bei 20 °C. Diese EPS setzten sich vor allem aus neutralen Zuckern und Uronsäuren zusammen. Von einem marinen Vertreter der Gattung *Psychrobacter*, *Psychrobacter immobilis* SW8, ist bekannt, dass er eine Glycocalyx ausbildet und in Biofilmen vorkommt (PEMBREY et al., 1999; LEIS und SCHNEIDER, 1999). Die Zellen des Isolates 88/2-7 (*Psychrobacter nivimaris*) bilden ebenfalls eine Kapsel, was mittels Nigrosinfärbung (schmaler Hof um die Zellen) von HEUCHERT (1999) nachgewiesen wurde.

#### 4.1.2 Salinität

Eine hohe und/oder wechselnde Salzkonzentration im natürlichen Habitat bedingt eine besondere Anpassung der dort vorkommenden Mikroorganismen. Eine hohe Ionenkonzentration führt zu einer Herabsetzung der Wasseraktivität, d. h. es ist weniger freies Wasser für die Zellen verfügbar, was u. a. die Denaturierung von Proteinen durch Zerstörung der Tertiärstruktur bewirken kann. Um einen Wasserverlust durch Osmose zu verhindern, nimmt die Zelle so genannte „kompatible Solute“ auf oder synthetisiert diese selbst (z. B. Ektoin von *Bacillus pasteurii*; KUHLMANN und BREMER, 2002). Durch die Anpassung der intrazellulären Konzentration osmo-

tisch wirksamer Substanzen an die Umgebung entgeht die Zelle dem osmotischen Stress. Als „kompatible Solute“ dienen Zucker oder Zuckeralkohole (z. B. Saccharose, Trehalose, Mannitol), andere Alkohole (z. B. Glycerol), Aminosäuren oder deren Derivate (z. B. Prolin, Glycinbetain, Ektoin) oder Kaliumionen (MADIGAN et al., 2000).

Eine weitere Überlebensstrategie bei hohen Salzkonzentrationen besteht in der Veränderung der Fettsäurezusammensetzung zur Aufrechterhaltung der Membranstabilität. So beobachteten BROWN et al. (2000) bei *Oceanomonas baumannii*, einem halotoleranten Bakterium, mit steigender Salinität eine Zunahme der gesättigten bei gleichzeitiger Abnahme der ungesättigten Fettsäuren sowie eine Verkürzung der Kettenlänge. NICOLAUS und Mitarbeiter (2001) dagegen beobachteten in halotoleranten Isolaten der Antarktis bei steigender Salinität einen Anstieg an langen Fettsäureketten und geradkettigen Fettsäuren sowie eine Abnahme an iso-verzweigten Fettsäuren. Weiterhin bieten auch Biofilme Schutz vor hohen Salzkonzentrationen (FLEMMING und WINGENDER, 2001). So wird z. B. angenommen, dass das Überleben einiger Pathogener in marinen Habitaten mit ihrer Assoziation an Aggregaten zusammenhängen könnte (DECHO, 2000).

Im Allgemeinen sind die Schwankungen des Salzgehaltes in den Ozeanen relativ gering, können aber an der Oberfläche durch Niederschlag und Verdunstung (OTT, 1988) oder in den Polarregionen durch Eisbildung bzw. –schmelze vorkommen. Gewöhnlich liegt in marinen Habitaten eine NaCl-Konzentration von ca. 0,5 M (ca. 3%) vor. Hinzu kommen geringere Mengen weiterer Salze wie MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> (MADIGAN et al., 2000). An diese Bedingungen sind marine Bakterien optimal angepasst. Sie benötigen z. B. Na<sup>+</sup> zum Wachstum und für Membrantransportaktivitäten, und Mg<sup>2+</sup> stabilisiert u. a. Zellmembranen und wird zur Aufrechterhaltung von Enzymaktivitäten benötigt (MEYER, 2000; MADIGAN et al., 2000). Anhand ihrer optimalen NaCl-Konzentrationen werden Bakterien nach GALINSKI (1986) in fünf Gruppen eingeteilt (s. Tab. 4.1).

**Tab. 4.1:** Einteilung der Bakterien anhand ihrer optimalen NaCl-Konzentrationen (GALINSKI, 1986)

Optimale NaCl-Konzentration		Einteilung der Bakterien
(M)	(%)	
0 - 0,25	0 - 1,5	nicht halophil
0,25 - 1	1,5 - 6	marin
0,5 - 2,5	3 - 15	gemäßigt halophil
1,5 - 4	9 - 24	halophil
3 - 5	18 - 30	extrem halophil

---

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antarktisisolaten 20/1-1, 88/2-1 und 88/2-5 lag die optimale NaCl-Konzentration im Bereich von 2-4% NaCl, womit sie im Bereich der für marine Bakterien typischen Salzkonzentration liegen (s. Tab. 4.1). Das Isolat 88/2-2 wies einen etwas breiteren Bereich mit einer optimalen NaCl-Konzentration von 2-10% auf und liegt somit in etwa im Bereich der gemäßigt halophilen Organismen. Der wesentliche Unterschied zwischen den moderat halophilen, den halophilen und den extrem halophilen liegt laut GALINSKI (1986) in einem breiten Wachstumsoptimum der erstgenannten, während die halophilen und extrem halophilen ein Salzbedürfnis von 9 bzw. 18% haben, das nicht unterschritten werden darf. Das Isolat 88/2-6 zeigt einen noch breiteren Wachstumsbereich. Während die optimale Salzkonzentration zwischen 0 und 4% NaCl lag, wies dieses Isolat Wachstum bis zu einer Konzentration von 12% NaCl auf. Dieses Isolat kann daher den halotoleranten Bakterien zugeordnet werden, die höhere Salzkonzentrationen tolerieren, aber am besten bei geringen Salzkonzentrationen wachsen (MADIGAN et al., 2000). Die zuvor von HEUCHERT (1999) und DE SILVA (2001) untersuchten Antarktisisolate gehören ebenfalls den marinen (Isolat 20/1-3 und 20/1-4, beide mit einem Optimum etwa 2-6% NaCl), den halotoleranten (Isolat 88/2-4 mit einem Optimum von 1-13% NaCl und Isolat 88/2-7 mit einem Optimum von 1-9% NaCl) sowie den gemäßigt halophilen Organismen (Isolat 20/1-2, Optimum 6-13% NaCl) an. Das Isolat 88/2-3 zeigte von 0-9% NaCl annähernd identisches Wachstum und soll daher ebenfalls den halotoleranten Organismen zugeordnet werden. Das teilweise relativ breite Wachstumsoptimum bzw. der große tolerierte Bereich an NaCl-Konzentrationen (Isolat 88/2-4 zeigte auch bei 20% NaCl noch Wachstum, HEUCHERT, 1999) der untersuchten Antarktisisolate könnte eine ideale Anpassung an die wechselnden Salinitäten durch Eisbildung und –schmelze in ihrem Habitat darstellen. Allerdings konnte BERKENHEGER (2004) die von ihr aus dem äquatorialen Atlantik isolierten Organismen ebenfalls den schwach halophilen bzw. nach GALINSKI (1986) den marinen und den halotoleranten Bakterien zuordnen, die zum Teil ebenfalls relativ hohe NaCl-Konzentrationen tolerierten (bis zu 20%). Ob die einzelnen bearbeiteten Antarktisisolate bei steigender NaCl-Konzentration ihre Fettsäurezusammensetzung ändern oder in der Lage sind, „kompatible Solute“ zu bilden, wurde bisher noch nicht weiter untersucht.

#### 4.1.3 Verwertung verschiedener C-Quellen - Kohlenstoffquellen im ASN<sub>III</sub>-Medium („konventionell“) im Vergleich mit dem BIOLOG GN- und dem API-System

Bei der Neubeschreibung von Bakterien in Handbüchern wie Bergey's Manual of Systematic Bacteriology oder in Originalveröffentlichungen basiert die Untersuchung der Verwertungs-

---

spektren meistens auf Wachstumsversuchen mit verschiedenen Substraten als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Diese in der Regel aufwendigen Methoden sollten durch zeitsparende Systeme wie API und BIOLOG, die zur Identifizierung klinisch relevanter Bakterien entwickelt wurden, ersetzt werden, denn bei langer Kultivierungsdauer können Bakterieneigenschaften gehemmt werden oder verloren gehen (WITZEL, 1990). Beide Systeme basieren nicht auf einer Biomassezunahme, sondern auf der Erfassung des Farbumschlags eines Indikators (API) bzw. eines Elektronenflusses (BIOLOG) und werden zur Erstellung der Substratverwertungsspektren einzelner Isolate oder von Bakteriengemeinschaften eingesetzt (u. a. BRESCHEL und SINGLETON, 1992; RÜGER und KRAMBECK, 1994; LABRENZ et al., 1998; CHOI und DOBBS, 1999).

Die erhaltenen Daten der Anwendung dieser beiden Testsysteme zur Identifizierung mariner Bakterien sollten jedoch mit Vorsicht ausgewertet, in jede Analyse bekannte Referenzorganismen mit aufgenommen und die Inkubationsbedingungen den speziellen Erfordernissen der Isolate angepasst werden. So empfehlen RÜGER und KRAMBECK (1994), die Zellen nach ihrer Anzucht auf Seewasseragar in einer Lösung aus NaCl und MgCl<sub>2</sub> zu suspendieren und dann sofort auf die BIOLOG-Platten zu übertragen. Bei der Untersuchung von 80 hinsichtlich ihres Verwertungsspektrums bereits charakterisierten marinen Bakterien, die in der BIOLOG-Datenbank nicht gespeichert waren, konnten die Autoren zwar viele Bakterien identifizieren, aber zum Teil traten auch größere Abweichungen zu den Literaturdaten auf, wie bei der Oxidation von Aminosäuren, was zu falschen Identifizierungen geführt hätte. Sehr gut geeignet sei dieses System dagegen für eine schnelle Gruppierung mariner Isolate nach Verwertungsmustern (Clusterbildung), die allerdings von der Clusterbildung nach der Charakterisierung mittels „konventioneller Medien“ abwichen. TRUU und Mitarbeiter (1999) fanden bei der Untersuchung verschiedener Isolate mittels BIOLOG GN- und API 20 NE eine gute Übereinstimmung der beiden Systeme auf Gattungsebene. Aufgrund der größeren Anzahl angebotener C-Quellen ergab das BIOLOG GN-System allerdings eine bessere Auflösung und ist nach Auffassung von TRUU et al. (1999) für die Erfassung mikrobieller Diversität geeigneter als das API-System. Unterschiedliche Ergebnisse bei identischen Substraten begründeten die genannten Autoren, ebenso wie RÜGER und KRAMBECK (1994), mit den verschiedenen Funktionsweisen der Systeme.

In der vorliegenden Arbeit ergab der Vergleich der „konventionellen“ Tests mit den beiden angewendeten Systemen BIOLOG GN und API 50 CH ebenso wie ein Vergleich der Tests untereinander nur selten einheitliche Ergebnisse. Dies ist auch anhand der abweichenden Clusterbildungen in den UPGMA-Phenogrammen der drei Substratverwertungstests ersichtlich (s.

---

Abb. 3.13 bis 3.15, Kap. 3.5.3). Bei einer Neubeschreibung sollten daher nach Möglichkeit jeweils nur die Verwertungsspektren verglichen werden, die mit identischen Methoden (gleichen Testsystemen und gleichen Bedingungen) erzielt wurden. Es zeigte sich ebenso wie bei RÜGER und KRAMBECK (1994), dass BIOLOG für eine schnelle Gruppierung mariner Isolate nach ihren Verwertungsmustern geeignet ist, auch wenn diese von der Clusterbildung nach „konventionellem System“ abweicht. Der Vergleich der Phenogramme der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium sowie des BIOLOG GN- und des API 50 CH-Systems mit dem Phenogramm der nachgewiesenen FAME zeigte nämlich, dass das Testsystem mit den meisten getesteten Substraten die größte Ähnlichkeit mit der Clusterbildung im FAME-Phenogramm aufwies (s. Abb. 3.18, Kap. 3.6.1).

Auch bei der Betrachtung der Verwertungsspektren differieren die drei Testsysteme teilweise. Bei allen Substratverwertungstests stellte sich das Isolat 88/2-2 als Spezialist heraus. Die bereits bei HEUCHERT (1999) bzw. DE SILVA (2001) gemachte Beobachtung, dass die Isolate 88/2-4 und 20/1-2 bzw. 20/1-3 und 20/1-4 ein großes Substratspektrum besaßen, bestätigte sich hier im BIOLOG GN- (s. Tab. 3.4, Kap. 3.5.3.2) und im API 50 CH-Testsystem ebenfalls (s. Tab. 3.5, Kap. 3.5.3.3). Das für die Isolate 88/2-3 und 88/2-7 von HEUCHERT (1999) aufgezeigte enge Substratspektrum bestätigte sich im BIOLOG- und API 50 CH-Testsystem jedoch nicht, dort konnten die Isolate relativ viele der angebotenen Kohlenstoffquellen umsetzen. Die beiden Isolate 88/2-5 und 88/2-6 wiesen im BIOLOG GN-Testsystem ein enges und im API 50 CH- und „konventionellen“ System ein relativ breites Substratspektrum auf. Ganz unterschiedlich fiel die Auswertung der Verwertungsspektren beim Isolat 88/2-1 aus. Im „konventionellen“ System verwertete das Isolat lediglich Gelatine und Stärke, im API 50 CH-System konnte es einige und im BIOLOG GN-Testsystem schon recht viele Substrate nutzen. Insgesamt handelt es sich bei den von diesem Isolat verwertbaren Substraten jedoch meistens um Monosaccharide oder Di- bzw. Polysaccharide, die mindestens ein Glucosemolekül beinhalten. Dagegen war es im „konventionellen“ System nicht in der Lage, Glucose abzubauen. Beim „konventionellen“ Wachstumstest fiel außerdem auf, dass die Isolate bei den meisten getesteten Substraten mit der höheren Konzentration besseres Wachstum aufwiesen. Nur in wenigen Fällen (Glucose bei den Isolaten 20/1-4 und 88/2-2, Fructose und Cellobiose bei den Isolaten 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 sowie Glycerol bei Isolat 88/2-6) führte eine geringere Substratkonzentration zu besserem Wachstum. Außer den Isolaten 88/2-1, 88/2-2, 88/2-3 und 88/2-7, die im „konventionellen“ System mit zu wenigen Substraten Wachstum zeigten, können die anderen Isolate am ehesten als fakultativ oligotroph bezeichnet werden, d. h. sie können bei hohen und niedrigen Substratkonzentrationen

---

wachsen (SCHUT et al., 1993). Dass die untersuchten Isolate bei ein und derselben Substanz, sobald sie diese verwerten konnten, häufig mit allen angebotenen Konzentrationen wachsen konnten, könnte dafür sprechen, dass sie Transportsysteme besitzen, die ein und dieselbe Substanz bei hoher oder niedriger Konzentration aufnehmen (AZAM et al., 1995). Die Autoren halten das Vorhandensein solcher Transportsysteme für einen Hinweis darauf, dass pelagische Bakterien großen Variationen in den Substratkonzentrationen ausgesetzt sind. Bei den Untersuchungen von SCHUT et al. (1993) waren alle Isolate, einmal kultiviert, ausnahmslos fakultativ oligotroph. Auch zunächst obligat oligotrophe Bakterien adaptierten sich an höhere Nährstoffkonzentrationen. CARLUCCI und Mitarbeiter (1986) vermuteten, dass die Mehrheit der oligotrophen Bakterien anscheinend fakultativ oligotroph ist. Dagegen sind laut EGUCHI und ISHIDA (1990) jedoch mehr als 85% der heterotrophen Bakterien im Pelagial obligat oligotroph, bevorzugen Aminosäuren und besitzen ein engeres Substratspektrum als Heterotrophe in Küstennähe. Aufgrund der geringen Konzentration und Vielfalt an organischen Substanzen in ihrem Habitat würden sie aber auch kein breiteres Spektrum benötigen. Laut SCHUT et al. (1997) hängt die Reaktion des jeweiligen Isolates immer von dem zurzeit verfügbaren Substrat ab.

Im Gegensatz zu den Isolat von BERKENHEGER (2004) aus dem äquatorialen Atlantik zeigen nur wenige Antarktisisolate eine Produktion von extrazellulären Enzymen zum Abbau hochmolekularer Substrate, wie Cellulose und Stärke, zwei häufig vorkommende Aggregat-spezifische Substanzen. Ein Vergleich assoziierter und frei lebender Bakterien eines Sees während einer Phytoplanktonblüte ließen WORM und Mitarbeiter (2001) vermuten, dass nur eine relativ kleine Gruppe von Bakterien Enzyme zum Abbau von Polymeren bildet, während der größere Teil der Bakteriengemeinschaft die einfacheren Hydrolysate verarbeitet. Die Autoren fanden wesentlich weniger Polymer-spaltende Enzyme als solche, die in der Lage sind, endständige Monomere von Oligomeren abzuspalten. So besaßen 29% der assoziierten Isolate  $\beta$ -Glucosidase (spaltet Glycosidbindung von z. B. Cellobiose), aber nur 4% Cellulase (hydrolysiert  $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -Bindungen zwischen Glucoseeinheiten). Die Autoren vermuten daher, ebenso wie COTTRELL und KIRCHMAN (2000b), die keine Dominanz einer bestimmten phylogenetischen Gruppe mariner Bakterien während der Verwertung von DOM beobachten konnten, dass ein Zusammenwirken vieler Bakterien nötig sei, um komplexes DOM abzubauen. Ob solche synergistische Zusammenhänge auch bei den untersuchten Antarktisisolaten erkennbar sind, die sehr unterschiedliche Substratverwertungsspektren besitzen, wurde mit Hilfe des BIOLOG GN-Testsystems untersucht (s. Kap. 4.1.4).

---

#### 4.1.4 Mischkulturen im BIOLOG GN-Testsystem

Nachdem die Substratverwertungsspektren der einzelnen Isolate getestet worden waren, sollten Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Bakteriengemeinschaften beider Stationen in Mischkulturen durchgeführt werden. GARLAND und MILLS (1991) setzten das BIOLOG-Testsystem erstmalig zur Unterscheidung verschiedener Bakteriengesellschaften ein. Es erwies sich als nützliches System zur Klassifizierung verschiedener mikrobieller Gemeinschaften. Allerdings zeigte sich, dass die Farbreaktion von der Zelldichte des Inokulums abhängig ist und daher vergleichbare Zelldichten in den Ansätzen verwendet werden sollten. Auch die Inkubationsdauer sowie mögliche auftretende synergistische oder antagonistische Effekte innerhalb der Bakteriengemeinschaft haben einen Einfluss auf die Farbreaktion (PRESTON-MAFHAM et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Durchführung der Testansätze daher darauf geachtet, dass die Isolate in den Mischkulturen und auch die beiden eingesetzten Mischkulturen vergleichbare Zelldichten aufwiesen. Die Ergebnisse spiegeln nicht die Verhältnisse in der natürlichen Bakteriengemeinschaft der Partikel an diesen Stationen wider, können also hinsichtlich des Verwertungsspektrums nicht miteinander verglichen werden, da es sich um künstliche Mischkulturen aus von den jeweiligen Partikeln unter den gegebenen Laborbedingungen kultivierbaren Bakterien handelt. Die Ansätze sollten zeigen, ob die Bakterien synergistisches oder/und antagonistisches Verhalten zeigen. Beides trat bei den Mischkulturen während der Verwertung der verschiedenen Kohlenstoffquellen der BIOLOG GN-Testplatten auf. Die vier Isolate der Station 49/020/1 waren in der Gemeinschaft dazu in der Lage, Hydroxyphenylelessigsäure und  $\alpha$ -Ketobuttersäure abzubauen, was die einzelnen Isolate nicht konnten. Ein solches synergistisches Verhalten zeigte die Mischkultur der Station 49/088/2 lediglich bei der Verwertung der Lactulose, die zuvor von keinem einzigen der sechs Isolate genutzt werden konnte. Die antagonistischen Effekte und damit der Anteil an Substraten, die von den einzelnen Isolaten verwertet wurden und in der Mischkultur nicht mehr, überwogen bei beiden Ansätzen. Die künstliche Bakteriengemeinschaft von der Station 49/020/1 konnte D-Arabitol, i-Erythritol, D-Sorbitol,  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure,  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure, Chinasäure und Glycyl-L-asparaginsäure und die Mischkultur von der Station 49/088/2 Ameisensäure,  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure, Dextrin, Glycogen, Lactose,  $\alpha$ -Ketobuttersäure und  $\alpha$ -Ketovaleriansäure nicht mehr metabolisieren. Die Mischkulturen von beiden Stationen setzten sich jeweils aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien zusammen. Die antagonistischen Effekte könnten z. B. auf der Produktion von antimikrobiellen Substanzen beruhen, die auch bei marinen  $\gamma$ -Proteobakterien nachgewiesen werden konnten (IVANOVA et al., 1998a). Die Organismen zeigten eine gesteigerte Synthese dieser Substanzen, wenn sie an poly-

---

meren Oberflächen assoziiert waren. Auch LONG und AZAM (2001) zeigten, dass vor allem assoziierte Bakterien antagonistische Aktivität aufweisen. Die Autoren fanden heraus, dass die meisten der Mikroorganismen, die inhibitorische Substanzen bilden, der Gruppe der  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Alteromonadales und Vibrionales) zuzuordnen sind. Bei den Vertretern der  $\alpha$ -*Proteobacteria* sind es vor allem die Partikel-assoziierten Organismen, die zur Produktion dieser Substanzen in der Lage sind, die dann vor allem gegen andere Vertreter dieser Gruppe und der *Bacteroidetes* wirken. Auch GROSSART und Mitarbeiter (2003) konnten bei Aggregat-assoziierten Bakterien die Bildung antibiotischer Substanzen nachweisen. Bei Marine snow-assoziierten Bakterien (vor allem *Roseobacter*-Stämmen) wurde außerdem die Fähigkeit zur Produktion von Kommunikationssignalen (acetyliertes Homoserinlacton, AHL) nachgewiesen, die am „Quorum sensing“ Gram-negativer Bakterien beteiligt sind und wahrscheinlich die Biofilmbildung, Exoenzym- und Antibiotikaproduktion steuern (GRAM et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden drei Partikel-assoziierte Bakterien aus der Gruppe der  $\alpha$ -*Proteobacteria* aus den Proben des äquatorialen Atlantiks isoliert (Isolat 30b1a, 34c1b1 und 44b2b2 aus 150 m Wassertiefe der Station 7004-1), die scheinbar in der Lage sind, inhibitorische Substanzen zu produzieren, die gegen ein  $\gamma$ -Proteobakterium (Isolat 44a2, 150 m) wirkten. Die abgegebene Substanz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

## 4.2 Biochemie

### 4.2.1 Fettsäuremuster

Ein spezifisches Fettsäuremuster oder eine einzelne dominante Fettsäure kann für eine phylogenetische Gruppe charakteristisch sein (BUSSE et al., 1996). Das Fettsäureprofil ist für die Klassifizierung und Identifizierung eines bestimmten Bakteriums brauchbar, da die Fettsäuren in ihrer Struktur sehr unterschiedlich sein können (s. Kap. 2.7.2.3). Ein großer Vorteil der Methode zur FAME-Bestimmung ist, dass sie schnell, günstig, einfach durchführbar und weitestgehend automatisiert ist (GIACOMINI et al., 2000). Der zelluläre Fettsäuregehalt ist außerdem ein phänotypisches Merkmal, das nicht durch Mutationen oder den Erwerb oder Verlust von Plasmiden beeinflusst wird (BERTONE et al., 1996).

Einige Fettsäuren können als Indikatoren für bakterielle Biomasse gelten, jedoch nicht als so genannte Biomarker, da sie sich wie Palmitinsäure (C16:0) bei nahezu allen Bakterien finden lassen (LAUER, 2001). FUKUNAGA und RUSSELL (1990) sowie BERTONE und Mitarbeiter (1996)

---

wiesen C16:0 in den von ihnen untersuchten Gattungen *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Deleya*, *Oceanospirillum* und *Vibrio* ebenfalls als wichtige Fettsäure nach. In der vorliegenden Untersuchung besaßen alle Isolate diese für Bakterien typische Fettsäure, einige allerdings in sehr geringen Mengen (s. Tab. 3.6, Kap. 3.6.1). Auch HEYDUCK-SÖLLER (2003) wies diese Fettsäure zum Teil nur in sehr geringen Konzentrationen (0,5-6,5%) bei mit Cyanobakterienkulturen assoziierten heterotrophen Bakterien nach. Für Bakterien typisch sind  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäuren (3-OH), die häufig bei Gram-negativen Bakterien beschrieben und auch bei einigen Actinomyceten nachgewiesen wurden, sowie Fettsäuren mit Cyclopropanringen und verzweigte Fettsäuren (LECHEVALIER, 1977). Dagegen wurde die Aussage der Autorin, dass Bakterien im Gegensatz zu Eukaryonten keine „polyunsaturated fatty acids“ (PUFAs) besitzen, mittlerweile mehrfach widerlegt. PUFAs wurden z. B. in einem *Vibrio*-Stamm (HAMAMOTO et al., 1994), in psychrophilen Bakterien (NICHOLS et al., 1997) oder auch in den Gattungen *Colwellia* und *Shewanella* gefunden (RUSSELL und NICHOLS, 1999). Fettsäuren mit Cyclopropanringen wies keines der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate auf, aber bei allen Isolaten konnten verzweigte Fettsäuren und, außer bei Isolat 88/2-2,  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäuren (3OH-C12:0 und/oder 3OH-C14:0) gefunden werden. Viele Bakterien besitzen methylierte Fettsäuren, vor allem aber Gram-positive (RUSSELL und NICHOLS, 1999), für die auch verzweigte Fettsäuren charakteristisch sind (NICOLAUS et al., 2001). Hohe Anteile verzweigter Fettsäuren besitzen auch die Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe, während die Gruppe der  $\alpha$ -*Proteobacteria* durch einen hohen Anteil (40-70%) an C18:1-Fettsäuren charakterisiert ist (BUSSE et al., 1996). Von den fünf erhaltenen Isolaten, die den  $\alpha$ -*Proteobacteria* zugeordnet werden konnten, wiesen alle einen hohen Anteil an C18:1-Fettsäuren (34,5-64,3%) auf. Allerdings besaßen auch zwei der fünf den  $\gamma$ -*Proteobacteria* zugewiesenen Isolate (Isolat 88/2-3 und 88/2-7, beides *Psychrobacter*) einen hohen Anteil der ungesättigten Fettsäure C18:1 c 9 (53,2 bzw. 44,2%). Bei den anderen drei Isolaten dieser Gruppe besaß ebenfalls eine ungesättigte Fettsäure (C16:1 c 9) den höchsten Anteil (20,1-41,1%). Der einzige Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*, das Isolat 88/2-1, wies im Vergleich zu den anderen Isolaten den höchsten Anteil an verzweigten Fettsäuren (17,1%) auf. Dieses Isolat wurde zwar am längsten und bei einer niedrigeren Temperatur inkubiert, seine Hauptfettsäure, die verzweigte Fettsäure i C15:0 mit 16,4%, kommt aber bei anderen Organismen dieser Gruppe ebenfalls als Hauptfettsäure vor (z. B. HOLMES, 1992; HEYDUCK-SÖLLER, 2003).

Um eine Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien über das Fettsäuremuster durchzuführen, müssen unbedingt standardisierte Bedingungen angewendet werden. Eine Abweichung in den Ergebnissen einer Fettsäureanalyse kann bereits auftreten, wenn ein Stamm in zwei ver-

---

schiedenen Laboren oder sogar in einem Labor unter denselben Bedingungen wuchs und analysiert wurde (LECHEVALIER, 1977). Die unterschiedlichen Gehalte einzelner Fettsäuren, die von den jeweils gegebenen physikalischen und physiologischen Faktoren abhängig sein können, lassen eine exakte Quantifizierung nicht zu (KÖNNEKE, 2001). Daher sollte lediglich beachtet werden, welche Lipide vorkommen und welche dominieren (LECHEVALIER, 1977). Zu den die Fettsäurezusammensetzung beeinflussenden Faktoren gehören Wachstumstemperatur (LECHEVALIER, 1977; BUSSE et al., 1996; HAMAMOTO et al., 1994; KÖNNEKE, 2001), Mediumzusammensetzung (LECHEVALIER, 1977; BUSSE et al., 1996; FUKUNAGA und RUSSELL, 1990), Alter der Kultur/Wachstumsphase (LECHEVALIER, 1977; BUSSE et al., 1996; HAMAMOTO et al., 1994; KÖNNEKE, 2001) und Salinität (NICOLAUS et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit waren die auftretenden längeren Inkubationszeiten von den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen abhängig. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Isolate bei der Zellernte trotz verschiedener Inkubationstemperaturen in etwa in derselben Wachstumsphase befanden, die sowohl eine qualitative als auch quantitative Veränderung der Fettsäuren zur Folge haben kann (HAMAMOTO et al., 1994). Deshalb wird hier nicht weiter auf dadurch mögliche Veränderungen im Fettsäuremuster eingegangen.

Niedrigere Temperaturen bewirken eine abnehmende Fluidität der Membranen und beeinflussen so die Membranstruktur und -funktion (KLEIN et al., 1999). Am häufigsten findet bei Bakterien zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität und der Aktivität der Membran-gebundenen Enzyme bei niedrigen Temperaturen eine Verschiebung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren und/oder die verstärkte Bildung kürzerer Fettsäuren statt. Außerdem können auch verzweigte Fettsäuren gebildet und Doppelbindungen eingefügt werden (LECHEVALIER, 1977; BHAKOO und HERBERT, 1980; KIS et al., 1998; KLEIN et al., 1999). Bei *Bacillus subtilis* JH642 findet bei niedrigen Temperaturen kein signifikanter Anstieg der ungesättigten Fettsäuren oder eine Verkürzung der Kettenlänge, sondern ein Wechsel von iso- zu anteiso-verzweigten Fettsäuren statt (KLEIN et al., 1999). Es gibt aber auch Bakterien, die keine oder nur geringe Änderungen der Fettsäurezusammensetzung bei wechselnder Temperatur zeigen (BHAKOO und HERBERT, 1980). Die Autoren vermuten, dass marine Bakterien eventuell keinen Mechanismus zur Änderung ihres Fettsäuregehalts bei wechselnden Temperaturen entwickelt haben, da ihre Habitate meist eine relativ konstante niedrige Temperatur besitzen. Psychrophile und psychrotolerante Bakterien besitzen zur Erhaltung der Membranfluidität bei geringen Temperaturen neben kurzkettigen, verzweigten und/oder Fettsäuren mit Cyclopropanringen häufig PUFAs (HAMAMOTO et al., 1994). Neben dem Erhalt der Fluidität dienen die PUFAs wahrscheinlich der

---

Membranstabilisation (RUSSELL und NICHOLS, 1999). Die Antarktisololate der vorliegenden Arbeit wiesen alle einen relativ hohen Anteil (bis 67,2%) an ungesättigten Fettsäuren auf (C16:1 c 9, C18:1 c 9, C18:1 t 9 + c 11 und C18:2 c 9,12, s. Tab. 3.6, Kap. 3.6.1), außer Isolat 88/2-1, das nur einen sehr geringen Anteil (3,9%) besaß. Bei allen untersuchten Isolaten stellte eine der ungesättigten Fettsäuren auch die Hauptfettsäure dar. Lediglich zwei der elf untersuchten Isolate (Isolate 20/1-2 und 20/1-3), beide zur Gruppe der  $\gamma$ -*Proteobacteria* gehörend, wiesen die zweifach ungesättigte Fettsäure C18:2 c 9,12 mit jeweils nur sehr geringem Anteil auf (0,1 und 0,7%). Nach Inkubation der beiden Isolate 88/2-4 ( $\alpha$ -*Proteobacteria*) und 88/2-7 ( $\gamma$ -*Proteobacteria*) bei 5°C (< optimale Temperatur) war diese Fettsäure auch bei ihnen nachweisbar (1,5 bzw. 1,7%). Bei beiden Isolaten ist demnach eine Zunahme der Doppelbindungen bei sinkender Temperatur zu beobachten. Ansonsten hat die Temperaturniedrigung bei beiden Isolaten unterschiedliche Auswirkungen auf das Fettsäurespektrum. Beim Isolat 88/2-4 verdoppelt sich die Anzahl der nachgewiesenen Fettsäuren und bei der niedrigeren Temperatur konnten jetzt auch verzweigte Fettsäuren nachgewiesen werden. Es wurden weder verstärkt kürzere Fettsäuren gebildet (stattdessen mit C18:0 eine längere) noch fand eine Verschiebung von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren statt. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren war bei diesem Isolat allerdings auch bei der höheren Temperatur schon sehr gering (s. Tab. 3.7, Kap. 3.6.1). BHAKOO und HERBERT (1980), die bei *Micrococcus cryophilus* bei sinkender Temperatur eine Verkürzung der Kettenlänge beobachteten, aber keine Änderungen im Grad der Ungesättigtheit, hielten es für möglich, dass bei ohnehin hohen Werten an ungesättigten Fettsäuren (59-72%) keine Notwendigkeit für eine Kontrolle der Lipidsättigung bei verschiedenen Wachstumstemperaturen besteht. Beim Isolat 88/2-7 ist dagegen eine Verkürzung der Kettenlänge zu beobachten. So nimmt bei niedrigerer Temperatur der Anteil der C16:1 c 9-Fettsäure in etwa dem Maße zu, wie der Anteil der C18:1 c 9-Fettsäure abnimmt (s. Tab. 3.7, Kap. 3.6.1). Außerdem nimmt der Anteil der gesättigten Fettsäuren bei geringerer Temperatur ab, stärker als der Anteil an ungesättigten (18:2 c 9,12) zunimmt. Neben einer kürzeren (C11:0) konnte aber auch eine längere Kette (C19:0) nachgewiesen werden. Bei der niedrigeren Temperatur werden von diesem Isolat außerdem weniger verzweigte Fettsäuren gebildet.

Um die Beziehungen der einzelnen Isolate grafisch darzustellen, wurde mittels Cluster-Analyse aus dem Datensatz der Fettsäuremuster ein UPGMA-Phenogramm erstellt (s. Kap. 3.6.1). Diese Art der Darstellung zeigt, dass eine Zuordnung von Bakterien in die verschiedenen Bakteriengruppen anhand ihres Fettsäuremusters möglich ist. Die gebildeten „Untergruppen“ beinhalten jeweils ausschließlich Vertreter einer Bakteriengruppe ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* bzw. *Cytopha-*

---

*ga-Flavobacteria*). Auch die Isolate, die durch den Vergleich ihrer 16S rRNA-Sequenzen derselben Gattung zugeordnet wurden (Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6; Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 sowie die beiden Isolate 88/2-3 und 88/2-7; s. Kap. 3.7.1) stehen im UPGMA-Phenogramm dicht beieinander, zeigen also nur geringe Unähnlichkeiten in ihrem Fettsäuremuster.

#### 4.2.2 Carotinoide

Carotinoide dienen in nicht photosynthetisch aktiven Organismen hauptsächlich dem Schutz vor Schäden durch zu starke Lichteinwirkungen, während sie in photosynthetisch aktiven Organismen zusätzlich als Lichtsammelpigmente in den Antennen der Photosysteme I und II fungieren. Vor allem der ultraviolette Bereich des Sonnenlichtes (200-400 nm) kann schädigende Auswirkungen auf die biologischen Prozesse im Ozean haben. Während die Strahlen des UV-C (200-280 nm) bereits in der Atmosphäre und der größte Teil der UV-B-Strahlung (280-315 nm) durch das Ozon in der Stratosphäre absorbiert werden, erreicht vor allem der langwelligere Teil dieser Strahlung (300-315 nm) zusammen mit nahezu dem gesamten UV-A (315-400 nm) die Ozeanoberfläche. Beide letztgenannten Strahlungstypen können stark schädigende Effekte auf lebende Organismen und biologische Prozesse haben. Im Ozean selbst wird die UV-Strahlung ebenfalls absorbiert (DOM, partikulärer Detritus und Phytoplankton) oder zerstreut (lebende und tote Partikel). Die Exposition der Mikroorganismen zur UV-Strahlung wird durch die vertikale Durchmischung beeinflusst (MORAN und ZEPP, 2000).

Die UV-Schädigungen an lebenden Zellen können in den meisten Fällen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Schädigung der DNA (z. B. Einzel- oder Doppelstrangbrüche) oder anderer Moleküle wie Proteine, RNA und Membran-assoziierte Moleküle (MORAN und ZEPP, 2000). Während die Schädigung der DNA direkt zum Zelltod führt, beeinflusst die Schädigung anderer Moleküle zunächst Wachstum und Reproduktion stark, was zusammen mit DNA-Schäden die Letalität erhöhen kann. Die Reparatur von Schäden durch UV-Strahlung ist für den betroffenen Organismus sehr energieaufwändig (MORAN und ZEPP, 2000). Zellen können sich aber vor zu intensiver Bestrahlung schützen, wobei Bakterien für UV-Schädigungen der DNA anfälliger sind als eukaryontische Mikroorganismen (JEFFREY et al., 1996). Dies könnte auf die geringe Größe der Bakterien und den damit verbundenen ineffektiven zellulären Schutz durch „Beschattung“ der DNA, d. h. deren „Verstecken“ hinter Organellen oder der „Lagerung“ in der Zellmitte wie es bei großen Zellen möglich ist, zurückzuführen sein (GARCIA-PICHEL, 1994). Cyanobakterien sind außerdem in der Lage, Verbindungen wie Scytonemin (BRENOWITZ und CASTENHOLZ, 1997) und

---

Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (MAA, GARCIA-PICHEL und CASTENHOLZ, 1993) zu bilden, die schädigende Photonen abfangen können. Einen Schutz vor durch UV-Strahlung entstehenden reaktiven Sauerstoffprodukten (z. B.  $H_2O_2$ ), die z. B. durch Reaktion mit Zelloberflächen-gebundenen Proteinen, Lipiden oder Polysacchariden für eine Schädigung der Zelle sorgen können, stellt die Produktion von Enzymen, wie Superoxid-Dismutase, Katalase und Peroxidasen, dar (MORAN and ZEPP, 2000). In allen Antarktisolaten, außer dem pigmentierten Isolat 88/2-1, und in den meisten Isolaten aus dem äquatorialen Atlantik konnte Katalase nachgewiesen werden.

Die UV-Strahlung hat Auswirkungen auf die Physiologie mariner Mikroorganismen wie i) Verringerung der Überlebensrate, ii) Veränderung in der Rate der Primär- und Sekundärproduktion, iii) den mikrobiellen Metabolismus, iv) der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft, v) Orientierung und Beweglichkeit und vi) extrazelluläre Enzymaktivität (MORAN und ZEPP, 2000). Gleichzeitig besitzt die UV-Strahlung neben dem hemmenden Effekt durch Schädigung einen steigernden Effekt durch Umwandlung größerer Moleküle zu labilem DOM (CHRÓST und FAUST, 1999).

Aufgrund der vielen konjugierten Doppelbindungen absorbieren Carotinoide im Wellenlängenbereich zwischen 377 und 548 nm. Carotinoide stellen keine UV-Schutzsubstanz dar, da sie konstitutiv im jeweiligen Organismus vorliegen und nicht im UV-Bereich absorbieren, tragen aber zum UV-Schutz und zum Schutz vor der Bildung von Singulett-Sauerstoff im jeweiligen Organismus bei (HEYDUCK-SÖLLER, 2003). Sie fungieren als Antioxidantien und entfernen reaktive Sauerstoffspezies (EDGE et al., 1997). Carotinoide sind hydrophobe Pigmente, die mit Membranen assoziiert oder nicht-kovalent an spezifische Proteine gebunden sind. Sie beeinflussen die Struktur, die Eigenschaft und die Stabilität von Zellmembranen (BRITTON, 1995) und spielen neben der Veränderung des Fettsäuremusters beim Erhalt der Membran-Fluidität eine Rolle (CHATTOPADHYAY und JAGANNADHAM, 2001). Bei niedrigerer Temperatur werden von den Zellen mehr polare als unpolare Carotinoide gebildet (CHATTOPADHYAY et al., 1997; JAGANNADHAM et al., 2000). *Sphingobacterium antarcticus*, ein psychrotolerantes Bakterium aus der Antarktis, bildete während der Kultivierung bei 5 °C mehr polares Zeaxanthin, das eine Abnahme der Membranfluidität bewirkt, und weniger unpolares  $\beta$ -Carotin als bei 25 °C. Trotzdem änderte sich die Membranfluidität nicht. Bei der niedrigeren Temperatur konnte gleichzeitig eine gesteigerte Synthese Membran-verflüssigender Fettsäuren (verzweigte und ungesättigte) festgestellt werden, d. h. Carotinoide und Fettsäuren scheinen Gegenspieler darzustellen, die für eine optimale Fluidität sorgen (JAGANNADHAM et al., 2000).

---

Beim Isolat 88/2-1 aus der Antarktis konnte Zeaxanthin nachgewiesen werden, das in diesem Fall ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Membranfluidität in dem Habitat mitverantwortlich sein könnte. Ob sich die Zeaxanthinkonzentration bei diesem Isolat in Abhängigkeit von der Temperatur ändert, wurde jedoch nicht untersucht. Da das Isolat 88/2-1 aus der photischen Zone des Ozeans isoliert wurde (Wassertiefe 20 m), könnte das Zeaxanthin bei diesem Organismus außerdem eine UV-Schutzfunktion besitzen. Für die *Cytophaga-Flavobacteria* (CF), denen das Isolat 88/2-1 laut FISH angehört, sind Flexirubin-artige Pigmente charakteristisch (KIRCHMAN, 2002). Es gibt aber auch Ausnahmen wie *Flavobacterium aquatile* (*Cytophaga aquatilis*), das stattdessen das Carotinoid Zeaxanthin besitzt (HOLMES, 1992). Bei der Gattung *Polaribacter*, ebenfalls zu den CF gehörend und zu dessen Vertreter *P. irgensii* das Isolat 88/2-1 eine 98%ige Ähnlichkeit in der 16S rRNA aufweist, ist das Pigment ebenfalls nicht Flexirubin (GOSINK et al., 1998).

Das Carotinoid der Isolate 3 und 4a1c aus dem äquatorialen Atlantik konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend bestimmt werden. Beide Isolate wurden anhand ihrer 16S rRNA-Sequenzen der Gattung *Erythrobacter* zugeordnet, deren Vertreter als aerobe, orange-pigmentierte, Bacteriochlorophyll *a* besitzende Bakterien beschrieben werden (SHIBA, 1992). DENNER und Mitarbeiter (2002) fanden aber mittlerweile einen Vertreter (*Erythrobacter citreus*), der kein Bacteriochlorophyll *a* besitzt. Die verschiedenen Carotinoide von *Erythrobacter longus* wurden von TAKAICHI et al. (1988, 1990) untersucht. Sie fanden u. a. ein monozyklisches Carotinoid mit der Massenzahl 582, das Bacteriorubixanthin ( $C_{41}H_{58}O_2$ ) genannt wurde. Dies entspricht der mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) ermittelten Massenzahl der Pigmente der Isolate 3 und 4a1c aus dem äquatorialen Atlantik (s. Kap. 3.10.3). Allerdings weist Bacteriorubixanthin im Methanolextrakt Absorptionsmaxima bei 293, 361, 468 und 499 nm auf (TAKAICHI et al., 1990), die von denen der Pigmente aus den Isolaten 3 und 4a1c abweichen (s. Tab. 3.14, Kap. 3.10.2). In Tabelle 4.2 ist eine Auswahl an bakteriellen Carotinoiden mit ihren durch MS nachgewiesenen Massenzahlen sowie ihren Summenformeln aufgeführt.

**Tab. 4.2:** Auswahl bakterieller Carotinoide, ihre mittels MS nachgewiesenen Massenzahlen und ihre Summenformeln

Carotinoid	Massenzahl [m/z]	Summenformel	Literatur
$\beta$ -Carotin	536	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	CARERI et al., 1999
Echinenon	550	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> O	TAKAICHI et al., 1990
Rubixanthin	552	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O	TAKAICHI et al., 1990
Canthaxanthin	564	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	CARERI et al., 1999
Zeaxanthin	568	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	TAKAICHI et al., 1990
Bacteriorubixanthin	582	C <sub>41</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	TAKAICHI et al., 1990
Caloxanthin	584	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>3</sub>	TAKAICHI et al., 1990
Capsanthin	584	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>3</sub>	ENZELL und BACK, 1995
Astaxanthin	596	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	CARERI et al., 1999

### 4.3 Molekularbiologische Charakterisierung

Der Großteil der in kultivierungsabhängigen Untersuchungen mariner Proben gefundenen Isolate gehört der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien an (BENLLOCH et al., 1995; MULLINS et al., 1995; ACINAS et al., 1999; EILERS et al., 2000a, 2000b). Die  $\alpha$ -Proteobakterien sind dagegen in kultivierungsunabhängigen Untersuchungen häufiger vertreten (GIOVANNONI und RAPPÉ, 2000). GLÖCKNER und Mitarbeiter (1999) zeigten in Untersuchungen mittels FISH ebenfalls, dass die  $\gamma$ -Proteobakterien nur einen kleinen Anteil am Bakterioplankton besitzen (meist  $\leq 4\%$ ; Oberflächenwasser Antarktis bis 9%). Dieses Paradoxon kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass viele  $\gamma$ -Proteobakterien copiotroph sind und deshalb gut auf Nährstoff-reichen Medien wachsen können (ZAVARZIN et al., 1991). HAGSTRÖM und Mitarbeiter (2000) beobachteten außerdem, dass  $\gamma$ -Proteobakterien schnell deutliche Kolonien auf Agar bilden, während  $\alpha$ -Proteobakterien langsam wachsen und kleine Kolonien bilden, die leicht übersehen werden können. In der vorliegenden Arbeit ist dagegen der Anteil an kultivierten  $\alpha$ -Proteobakterien (Station 7004-1, äquatorialer Atlantik) in der Probe aus 150 m Wassertiefe größer als der der  $\gamma$ -Proteobakterien. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass einige der Vertreter mehrfach isoliert worden sein können und somit diese Gruppe überrepräsentiert sein kann. Insgesamt stellten unter denen in der vorliegenden Arbeit mittels FISH untersuchten Isolaten beider Probennahmegebiete die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien die dominanten Bakteriengruppen. Im Südatlantik konnten jeder Gruppe jeweils fünf Isolate und im äquatorialen Atlantik, wo die Kolonien nicht nach sichtbaren Kriterien selektiert, sondern alle auftretenden Kolonien überimpft wurden, konnten insgesamt 59% bzw. 40% der insgesamt 405 Isolate diesen Gruppen zugeteilt werden. In deutlich geringerer

---

Anzahl wurden in den Proben beider Probennahmegebiete außerdem Vertreter der CF (s. Kap. 3.3 und 3.9.3) sowie nur im äquatorialen Atlantik Gram-positive Bakterien (LGC und *Actinobacteria*, s. Kap. 3.9.3) nachgewiesen. Eine ähnliche Verteilung hatte BERKENHEGER (2004) festgestellt, die vor allem  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien (je 40%) aus Proben des äquatorialen Atlantiks isolieren konnte, während nur 20% ihrer Isolate Vertreter der CF waren. Auf Marine Snow von der Polarfront dominierten dagegen  $\gamma$ -Proteobakterien und CF, während  $\alpha$ -Proteobakterien nur eine geringere Rolle spielten (SCHWEITZER et al., 2001). Auf Kultivierungen beruhenden Untersuchungen zufolge gehören 95% der aus aquatischen Habitaten gewonnenen Isolate zu den Gram-negativen Bakterien, während Gram-positive Bakterien eher in terrestrischen Habitaten dominieren (WEBSTER et al., 2001), was ihr geringes Vorkommen in den Proben aus dem äquatorialen Atlantik in der vorliegenden Arbeit erklären würde. Allerdings scheint der Anteil Gram-positiver Bakterien laut WEBSTER et al. (2001) eher unterrepräsentiert zu sein, denn ihnen gelang durch die Auswahl spezieller Medien die Anreicherung verschiedener, den marinen Schwamm *Rhopaloeides odorabile* besiedelnder Actinomyceten. REHNSTAM und Mitarbeiter (1993) zeigten ebenfalls, dass ein großer Teil der in natürlichen Gemeinschaften dominierenden Genotypen kultivierbar ist. Mit ihren anhand von Teilsequenzen kultivierter mariner Bakterien erstellten Deoxynucleotidsonden hybridisierten bis zu 100% der Bakterien einer Wasserprobe desselben Standortes. CONNON und GIOVANNONI (2002) konnten mit ihrer „high-throughput“-Methode bis zu 14% der Zellen einer marinen Probe aus Küstennähe kultivieren, unter denen auch bisher unkultivierte Mikroorganismen waren, was im Gegensatz zu FERGUSON et al. (1984) einer mehr als 140fachen Steigerung entspricht. Die „richtige“ Auswahl der Anzuchtmedien und der Laborbedingungen könnte die phylogenetischen Unterschiede der mittels kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden untersuchten Bakterien (FUHRMAN et al., 1994; PINHASSI et al., 1997, SUZUKI et al., 1997), die dadurch erklärt werden, dass in Datenbanken häufig vertretene heterotrophe marine Bakterien auf Standardmedien unkultivierbar sind (SUZUKI et al., 1997), demnach verringern. Für SUZUKI und Mitarbeiter (1997) sind die Begriffe kultivierbar und unkultivierbar nur auf die gerade eingesetzten experimentellen Bedingungen anwendbar.

Die Diversität der frei lebenden Bakterien im offenen Ozean kann mit der Tiefe variieren (FIELD et al., 1997; WRIGHT et al., 1997; ACINAS et al., 1999). Untersuchungen der Aggregat-assoziierten Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Tiefen im westlichen Mittelmeer zeigten allerdings eine in allen Tiefen relativ unveränderte Zusammensetzung mit hauptsächlich  $\gamma$ -Proteobakterien (ACINAS et al., 1999). Die Diversität frei lebender Bakterien änderte sich im gleichen Untersuchungsgebiet von hauptsächlich  $\alpha$ -Proteobakterien in Oberflächennähe zu einem dominierenden

---

Anteil an  $\gamma$ -Proteobakterien in 400 m Tiefe, wo die Zusammensetzung nahezu der Partikel-assoziierten Gemeinschaft entsprach (ACINAS et al., 1999). Die Änderung der phylogenetischen Gemeinschaft der frei lebenden Bakterien begann im Bereich des Chlorophyllmaximums, was auf einen größeren Anteil an Phytoplankton und damit mehr organischen Nährstoffen oder einem Wechsel der physikalischen Bedingungen (Temperatur, Lichtintensität) zurückgeführt wurde (ACINAS et al., 1999). Die Aggregat-assoziierten scheinen von diesen Veränderungen demnach wenig beeinflusst zu werden.

Auch an der Station 7004-1 im westlichen äquatorialen Atlantik scheint die Zusammensetzung der Partikel-assoziierten Gemeinschaft von der Temperatur, der Salinität und dem Chlorophyllgehalt, der, für oligotrophe Bedingungen charakteristisch (FISCHER, 2002), relativ gering war (Maximum von  $0,23 \text{ mg/m}^3$  in 55 m Tiefe, Daten persönliche Mitteilung von Dr. G. Fischer, Fachbereich Geologie, Universität Bremen), nahezu unbeeinflusst zu sein. So konnte an dieser Station zwar im Gegensatz zu ACINAS et al. (1999) eine Veränderung in der Partikel-assoziierten Gemeinschaftsstruktur mit zunehmender Tiefe festgestellt werden, eine Verschiebung aufgrund von Veränderungen in der Temperatur oder Salinität wird aber ausgeschlossen, da die Salinität in den beprobten Tiefen nahezu identische Werte (3,39; 3,35 und 3,33%) zeigte und nur im Bereich des Chlorophyllmaximums erhöht war (bis 3,67% anstatt ca. 3,4% in den übrigen Tiefen; Daten persönliche Mitteilung von Dr. G. Fischer, s. o.) und die Temperatur sich lediglich zwischen 20 und 100 m Tiefe stark änderte (von  $28,2$  auf  $14,3$  °C), während sie bis in 150 m Wassertiefe nur noch geringfügig absank ( $13,2$  °C; Daten persönliche Mitteilung von Dr. G. Fischer, s. o.). Aus der Oberflächenprobe (20 m) und aus 100 m Wassertiefe konnten vor allem  $\gamma$ -Proteobakterien (s. Tab. 3.13, Kap. 3.9.3) von den Partikeln isoliert werden, was der von ACINAS et al. (1999) gemachten Beobachtung entspricht, dass Vertreter dieser Gruppe an Aggregaten dominieren. Die Anzahl der  $\alpha$ -Proteobakterien nimmt zunächst mit zunehmender Tiefe ab, stellt dann aber in 150 m Tiefe einen größeren Anteil als die  $\gamma$ -Proteobakterien (s. Tab. 3.13). Da  $\alpha$ -Proteobakterien neben den CF als schnelle Besiedler mariner Partikel bekannt sind (DANG und LOVELL, 2000; RIEMANN et al., 2000), ist eine umgekehrte Tiefenverteilung mit einem Maximum an  $\alpha$ -Proteobakterien im Bereich des Chlorophyllmaximums erwartet worden. Durch die Abhängigkeit der Zusammensetzung der assoziierten Bakteriengemeinschaften verschiedener Standorte von Partikelursprung, -zusammensetzung sowie Alter und Struktur (s. Kap. 1.2), ist es schwierig, unabhängig voneinander durchgeführte Studien ohne weitere Informationen zu den beeinflussenden Faktoren zu vergleichen.

---

#### 4.3.1 Taxonomische Einordnung der Isolate

Die visuelle Auswertung der RAPD-Fingerprints von sieben der elf Antarktisisolate aus dem Südatlantik (Abb. 3.4b, Kap. 3.2) wies aufgrund der eingesetzten PCR-Primer deutliche Polymorphismen auf. Die Auswertung des Datensatzes in einem UPGMA-Phenogramm (Abb. 3.5, Kap. 3.2) ergab keine Clusterbildung, was dafür spricht, dass es sich bei allen Isolaten zumindest um verschiedene Stämme, eventuell auch verschiedene Arten, handelt. Die Einteilung der elf Isolate in ARDRA-Gruppen (Kap. 3.1.1) hatte ebenso wie der Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen (Kap. 3.7.1) dagegen eine nahe Verwandtschaft einiger Isolate ergeben, obwohl sie in zehn verschiedene ARDRA-Gruppen, die jeweils nur ein bzw. zwei Isolate enthielten, eingeteilt werden konnten. MICHAUD und Mitarbeiter (2004) teilten 146 marine Isolate aus der Antarktis in 52 ARDRA-Gruppen mit meist ebenfalls nur ein oder zwei Isolaten ein. Dieser hohe Grad an genetischer Diversität lässt ihrer Meinung nach vermuteten, dass sich mehrere Bakterienarten an die extremen Umweltbedingungen der Antarktis anpassen können.

Die Antarktisisolate und die beiden Isolate 3 und 4a1c aus dem äquatorialen Atlantik zeigen zu ihrem nächstverwandten Organismus Übereinstimmungen von  $\geq 98\%$  in ihren 16S rRNA-Sequenzen, was eine DNA-DNA-Hybridisierung zur Absicherung einer neuen Art zwingend erforderlich machen würde. Laut BUSSE und Mitarbeitern (1996) ist eine eindeutige Identifizierung von Bakterien nur durch die Analyse der DNA-Sequenzen möglich. Mittlerweile ist die durch DNA-DNA-Hybridisierung gemessene Homologie eines der wichtigsten Charakteristika zur taxonomischen Gruppierung von Bakterien, denn selbst bei einer Übereinstimmung der 16S rRNA-Sequenz von 99% kann es sich laut Hybridisierung um zwei verschiedene Arten handeln. Eine DNA-DNA-Übereinstimmung von 70% und mehr ist das anerkannte Kriterium für eine phylogenetisch einheitliche Art (WAYNE et al., 1987). Im Allgemeinen haben Arten, die mindestens 70% DNA-Übereinstimmung aufweisen, mehr als 97% Sequenzübereinstimmung, aber es wurden auch einige Organismen identifiziert, die zwar nahezu identische 16S rRNA-Sequenzen besitzen, aber deren DNA-Hybridisierung deutlich niedriger als 70% ist (STACKEBRANDT und GOEBEL, 1994). So zeigen z. B. *Bacillus globisporus* und *B. psychrophilus* nahezu eine 16S rRNA-Sequenzidentität (99,8%), weisen aber eine DNA-DNA-Übereinstimmung von weniger als 50% auf (FOX et al., 1992). Auch die von HEUCHERT et al. (2004, s. Kap. 8) beschriebene Art *Psychrobacter nivimaris* (Isolat 88/2-7) wies mit *Psychrobacter proteolyticus* eine Übereinstimmung von 99,65% bei der 16S rRNA-Sequenz, aber lediglich 26,8% bei der DNA auf. Dagegen ist es unwahrscheinlich, dass zwei Organismen mit einer Sequenzübereinstimmung von  $< 97,5\%$  mehr als 60-70% DNA-Übereinstimmung aufweisen

---

(STACKEBRANDT und GOEBEL, 1994). Daher sollte eine Übereinstimmung in der 16S rRNA-Sequenz von weniger als 95% laut AMANN und Mitarbeitern (1995) als Beweis für die Existenz einer neuen Art angesehen werden.

#### 4.3.1.1 $\alpha$ -Proteobakterien

Viele der kultivierbaren Vertreter der  $\alpha$ -Proteobakterien fallen in die *Roseobacter*- und *Sphingomonas*-Gruppen (GIOVANNONI und RAPPÉ, 2000; HAGSTRÖM et al., 2000; SUZUKI et al., 2001). Vor allem Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe zeigten sich als schnelle Besiedler künstlicher Oberflächen in Küstennähe (DANG und LOVELL, 2000) und wurden in zahlreichen Proben u. a. der Ostsee, dem Sargasso Meer, arktischem und antarktischem Meereis und dem Mittelmeer gefunden (GIOVANNONI und RAPPÉ, 2000). Die kultivierbaren Arten scheinen bevorzugt assoziiert an marinen Eukaryonten, wie Algen, vorzukommen (EILERS et al., 2001).

Die 16S rRNA-Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten  $\alpha$ -Proteobakterien (Antarktisisolate 20/1-1, 88/2-2, 88/2-4, 88/2-5 und 88/2-6 sowie aus dem äquatorialen Atlantik die Isolate 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe) zeigten eine hohe Übereinstimmung zu den Gattungen *Sulfitobacter*, *Paracoccus*, *Loktanella* und *Erythrobacter* von denen bereits einige Vertreter aus marinen Habitaten isoliert wurden. Zu erwähnen wären hier z. B. *Sulfitobacter dubius* (IVANOVA et al., 2004), der zu Isolat 88/2-2 eine 99%ige, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (BERRY et al., 2003), der zu Isolat 88/2-4 eine 98%ige und *Erythrobacter citreus* (DENNER et al., 2002), der zu den Isolaten 3 und 4a1c der Station 7004-1 jeweils eine 99%ige Übereinstimmung aufweist. Vertreter der kürzlich beschriebenen Gattung *Loktanella* wurden aus antarktischen Seen mittels mariner Medien isoliert (VAN TRAPPEN et al., in press). Die 16S rRNAs der Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 stimmen zu 99% mit der RNA von *Loktanella salsilacus* überein. In Tabelle 4.3 werden einige charakteristische Eigenschaften der untersuchten Antarktisisolate aus der Gruppe der  $\alpha$ -Proteobacteria mit denen nächstverwandter Organismen verglichen.

Zu den bisher in die *Roseobacter*-Gruppe eingeordneten 12 Gattungen, u. a. *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Antarctobacter* (ALLGAIER et al., 2003), wurde noch die Gattung *Loktanella* hinzugefügt. Bisher wurden drei Arten dieser Gattung beschrieben, *Loktanella salsilacus*, *L. fryxellensis* und *L. vestfoldensis* (VAN TRAPPEN et al., in press). Die Gattung wird als moderat halotolerant bezeichnet, mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 25 °C. Auch die dieser Gattung nah verwandten, in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate sind marin oder halotolerant. Die von ihnen maximal tolerierte NaCl-Konzentration (s. Tab. 4.3) liegt etwa im Bereich der *Lokta-*

---

*nella*-Spezies (max. 10%) und die Isolate zeigen bei 23 °C ebenfalls noch gutes Wachstum. Die größte Abweichung tritt beim Fettsäurespektrum auf. Während die Hauptfettsäure C18:1 c 11 der Gattung *Loktanella* auch bei den marinen Antarktisisolaten vertreten ist, konnten die für *Loktanella* charakteristischen Fettsäuren 3OH-C10:0 und C18:0 bei den hier untersuchten Isolaten nicht gefunden werden. Der G+C-Gehalt der bearbeiteten Isolate liegt dagegen wiederum im Bereich der *Loktanella*-Spezies.

Isolat 88/2-2 weist zu seinem nächsten Verwandten *Sulfitobacter pontiacus* viele Ähnlichkeiten auf. Lediglich im Substratverwertungsspektrum und in der Koloniefarbe zeigen sich Unterschiede (s. Tab. 4.3). Ein Vergleich der 16S rRNA-Sequenz mittels BLAST ergab außerdem eine 99%ige Ähnlichkeit des Antarktisisolates mit *Sulfitobacter* sp. 4318-8/2 (BERKENHEGER, 2004), mit dem Isolat 88/2-2 außerdem einige identische Eigenschaften besitzt. So können z. B. beide Partikel-assoziierten Organismen weder Stärke noch Gelatine hydrolysieren, *Sulfitobacter* sp. 4318-8/2 ist jedoch in der Lage, Cellulose abzubauen (schwach). Beide hier erwähnten Isolate weisen ansonsten ein relativ enges Substratspektrum auf. Acetat wird von beiden genutzt, wobei das Wachstum von *Sulfitobacter* sp. 4318-8/2 aber nur schwach ist. Isolat 4318-8/2 wächst mit Cellobiose (BERKENHEGER et al., 2004) und Isolat 88/2-2 mit Glucose (schwach; Tab. 4.3). *Sulfitobacter* sp. 4318-8/2 ist jedoch unbeweglich, während Isolat 88/2-2 eine bis zwei polare oder subpolare Geißeln aufweist.

Das Antarktisisolat 88/2-4, das ebenfalls der Gruppe der  $\alpha$ -*Proteobacteria* zugeordnet werden konnte, zeigt in der Zellgröße und bei der Verwertung der einzelnen Kohlenstoffquellen einige Abweichungen zu dem nächstverwandten Bakterium *Paracoccus (Pc.) zeaxanthinifaciens*, außerdem ist es unpigmentiert. Übereinstimmungen zeigen beide in der relativ hohen maximalen Wachstumstemperatur von 40 °C, im G+C-Gehalt und bei der Hauptfettsäure. Weitere Vertreter dieser Gattung, die ebenfalls bei 40 °C Wachstum zeigten (*Pc. versutus*, *Pc. thiocyanatus*, *Pc. kondratievae*) bzw. bei 37 °C ihre optimale Wachstumstemperatur besaßen (*Pc. solventivorans*), wurden nicht aus marinen Habitaten isoliert (KATAYAMA et al., 1995; SILLER et al., 1996; DORONINA et al., 2002).

Tab. 4.3: Vergleich morphologischer, physiologischer, chemotaxonomischer und molekularbiologischer Eigenschaften der Isolate 20/1-1, 88/2-5 und 88/2-6 mit *Loktanella salsilacus*, des Isolates 88/2-2 mit *Sulfitobacter dubius* sowie des Isolates 88/2-4 mit *Paracoccus zeaxanthifaciens*

Eigenschaften	Isolate und nächstverwandte Organismen							
	20/1-1	88/2-5	88/2-6	<i>Loktanella salsilacus</i> <sup>a</sup>	88/2-2	<i>Sulfitobacter dubius</i> <sup>b</sup>	88/2-4 <sup>c</sup>	<i>Paracoccus zeaxanthifaciens</i> <sup>d</sup>
Zellform	kurze Stäbchen	kurze Stäbchen	kurze Stäbchen	kurze Stäbchen	kokkoid Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kokken-Kurzstäbchen
Zellgröße (µm)	0,7 ± 0,07 x 1,27 ± 0,2	0,7 ± 0,11 x 1,43 ± 0,23	0,76 ± 0,05 x 1,48 ± 0,33	<1 x 3-4	0,85 ± 0,13 x 1,18 ± 0,16	0,6-0,8 x 1,2-1,5	<1 x 1,5 bis 1 x 22	0,8-0,9 x 1,1-1,5
Koloniefarbe	milchig weiß	beige	beige	beige	milchig cremefarben	schwach gelblich	grau	gelb-orange
Beweglichkeit	-	-	-	-	+	+	+	-
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	++	+	++	+	+	+	+	+
Wachstum mit								
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	-	-	+	-	-
Tween 80	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	+	- <sup>e</sup>	-	± <sup>e</sup>	-
Citrat	- <sup>o</sup> / <sub>+</sub> <sup>g</sup>	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>g</sup>	- <sup>o</sup> / <sub>g</sub>	+	- <sup>o</sup> / <sub>g</sub>	+	+ <sup>o</sup> / <sub>g</sub>	-
Glucose	± <sup>o</sup> / <sub>+</sub> <sup>f</sup> / <sub>g</sub>	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup> / <sub>g</sub>	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup> / <sub>g</sub>	nd	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>g</sup>	-	+ <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup> / <sub>g</sub>	+
Melbiose	- <sup>o</sup> / <sub>+</sub> <sup>f</sup>	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup>	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup>	nd	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup>	+	- <sup>o</sup> / <sub>±</sub> <sup>f</sup>	+
max. Wachstumstemperatur (°C)	30	30	30	37	40	30	40	40
max. NaCl-Konzentration (%)	6	8	12	10	12	12	20	8 <sup>h</sup>
G+C-Gehalt der DNA (mol%)	62,4 ± 0,07	61,76 ± 0,02	61,62 ± 0,41	59,4-60,4	64,5 ± 0,11	63,7	68,14 ± 0,82	66,9-67,7
Hauptfettsäure(n)	C18:1 t9 + c11	C18:1 t9 + c11	C18:1 t9 + c11	C18:1 c11	C18:1 t9 + c11	C18:1 c11	C18:1 t9 + c11	C18:1 c11
Habitat	marin, Partikel assoziiert	marin, Partikel assoziiert	marin, Partikel assoziiert	Ace Lake und Organic Lake, Antarktis	marin, Partikel assoziiert	marin, Seegras assoziiert	marin, Partikel assoziiert	marin, Seetang assoziiert

+, positiv; -, negativ; ±, schwach positiv; nd, keine Daten; \*, Isolat zeigte in einem früher durchgeführten Test (andere Methode) eine negative Reaktion (s. Berkenheger et al., 2004, Kap. 8)

<sup>a</sup> VAN TRAPPEN et al., in press; <sup>b</sup> IVANOVA et al. (2004); <sup>c</sup> HEUCHERT (1999) und diese Arbeit; <sup>d</sup> BERRY et al. (2003)

<sup>e</sup> Reaktion in BIOLOG GN; <sup>f</sup> Reaktion in API 50 CH; <sup>g</sup> Wachstum in ASN<sub>III</sub>-Medium mit alleiniger C-Quelle

<sup>h</sup> getestet wurde max. 8% NaCl

---

Zur genaueren taxonomischen Einordnung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersuchten marinen Antarktisisolate müsste noch eine DNA-DNA-Hybridisierung zumindest mit den jeweils nächstverwandten Organismen durchgeführt werden.

Ob die Isolate 3 und 4a1c Stämme von *Erythrobacter citreus* (DENNER et al., 2002) sind oder möglicherweise einer neuen Art angehören, konnte aufgrund der geringen Menge an untersuchten Eigenschaften noch nicht abschließend geklärt werden. Bei diesen beiden Isolaten handelt es sich ebenfalls um Stäbchen, die in etwa dieselbe Zellgröße und Koloniefarbe aufweisen wie *Erythrobacter citreus*, von dem sie sich aber dadurch unterscheiden, dass sie keine Oxidase besitzen. Die Massenzahl des untersuchten Carotinoids der beiden Isolate entspricht der, die auch schon bei anderen Vertretern der Gattung *Erythrobacter* nachgewiesen wurde (s. Kap. 4.2.2). Ergänzende Untersuchungen sind daher noch nötig (u. a. Fettsäure-Bestimmung, DNA-DNA-Hybridisierung), um eine endgültige Einordnung dieser Isolate vornehmen zu können.

#### 4.3.1.2 $\gamma$ -Proteobakterien

Vertreter der  $\gamma$ -Proteobakterien werden häufig an Aggregaten gefunden (u. a. ACINAS et al., 1999). Die in kultivierungsabhängigen Untersuchungen mariner Proben gefundenen Isolate gehören vor allem den Genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas* und *Vibrio* an (SCHMIDT et al., 1991; HAGSTRÖM et al., 2000; EILERS et al., 2000b).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten  $\gamma$ -Proteobakterien (Antarktisisolate 20/1-2, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-3 und 88/2-7) konnten anhand ihrer 16S rRNA-Sequenzen den Gattungen *Pseudoalteromonas* (*Ps.*) und *Psychrobacter* (*P.*) zugeordnet werden. Vertreter dieser nächstverwandten Gattungen konnten bereits aus marinen Habitaten isoliert werden. Dazu gehören *Ps. citrea* (IVANOVA et al., 1998b) und *Ps. elyakovii* (SAWABE et al., 2000) zu denen die Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 zwischen 98 und 99% Sequenz-Übereinstimmung aufweisen (s. Kap. 3.7.1) oder verschiedene *Psychrobacter*-Arten, wie *P. submarinus* oder *P. okhotskensis* aus Wasserproben (ROMANENKO et al., 2002; YUMOTO et al., 2003), *P. proteolyticus* aus dem antarktischen Krill *Euphausia superba* (DENNER et al., 2001) und *P. marincola* aus der Seescheide *Polysyncraton* sp. (ROMANENKO et al., 2002). Das Isolat 88/2-7 konnte innerhalb dieser Gattung als neue, Partikel-assoziierte Art *Psychrobacter nivimaris* beschrieben werden (HEUCHERT et al., 2004, s. Kap. 8). In Tabelle 4.4 werden einige charakteristische Eigenschaften der untersuchten Antarktisisolate aus der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobacteria mit denen nächstverwandter Organismen der Gattungen *Pseudoalteromonas* bzw. *Psychrobacter* verglichen.

---

Ein Vergleich der drei marinen Antarktisisolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 mit Vertretern der Gattung *Pseudoalteromonas* zeigt viele Übereinstimmungen. Nur Isolat 20/1-2 ist jedoch nicht in der Lage, Stärke zu hydrolysieren, kann aber als einziges der untersuchten Antarktisisolate schwach mit Mannose wachsen, während die ausgewählten *Pseudoalteromonas*-Spezies alle diese C-Quelle verwerten können. Bei der Betrachtung der Citratverwertung zeigt sich, dass diese Kohlenstoffquelle sowohl die beiden Isolate 20/1-2 und 20/1-3 als auch *Ps. elyakovii* und *Ps. antarctica* verwerten können, während Isolat 20/1-4 und *Ps. citrea* damit kein Wachstum zeigen. Beim Vergleich der 16S rRNA-Sequenz hatte Isolat 20/1-4 als einziges der drei den *Pseudoalteromonas* zugeordneten Antarktisisolate zu *Ps. citrea* eine nahe Verwandtschaft gezeigt. Diese beiden Isolate differieren neben der Mannoseverwertung lediglich in der Koloniefarbe. Die drei Antarktisisolate scheinen demnach dieser Gattung zugeordnet werden zu können. Ob es sich um neue Arten handelt oder lediglich um Stämme der schon beschriebenen Arten, müsste mit Hilfe einer DNA-DNA-Hybridisierung noch geklärt werden.

Das Isolat 88/2-7 wurde kürzlich als neue Art *Psychrobacter nivimaris* beschrieben (HEUCHERT et al., 2004). Wie Tabelle 4.4 zeigt, besitzen dieses Isolat und Isolat 88/2-3 nahezu identische Eigenschaften. Beide zeigten zwar ein unterschiedliches Bandenmuster in der RAPD-PCR (HEUCHERT, 1999), da diese Methode jedoch eine Unterscheidung bis auf das Stamm-Niveau erlaubt, könnte es sich bei Isolat 88/2-3 trotz einiger mittels BIOLOG GN- und API 50 CH-Testsystem festgestellten Unterschiede im Substrat-Verwertungsspektrum (Kap. 3.5.3.2 und 3.5.3.3) möglicherweise um einen weiteren Stamm von *Psychrobacter nivimaris* handeln. Dies müsste durch eine DNA-DNA-Hybridisierung belegt werden.

Tab. 4.4: Vergleich morphologischer, physiologischer, chemotaxonomischer und molekularbiologischer Eigenschaften der Isolate 20/1-2, 20/1-3 und 20/1-4 mit verschiedenen *Pseudomonas* (*Ps.*)-Arten sowie der Isolate 88/2-3 und 88/2-7 (*Psychrobacter nivimaris*) mit verschiedenen *Psychrobacter* (*P.*)-Arten

Eigenschaften	Isolate und nächstverwandte Organismen									
	20/1-2 <sup>a</sup>	20/1-3 <sup>b</sup>	20/1-4 <sup>b</sup>	<i>Ps. elyakovii</i> <sup>c</sup>	<i>Ps. citrea</i> <sup>d</sup>	<i>Ps. antarctica</i> <sup>e</sup>	88/2-3 <sup>a</sup>	88/2-7 <sup>f</sup> ( <i>P. nivimaris</i> )	<i>P. glacincola</i> <sup>g</sup>	<i>P. proteolyticus</i> <sup>h</sup>
Zellform	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	kokkoid Stäbchen	kokkoid	kokkoid Stäbchen
Zellgröße (µm)	<1 x 2	<1 x 1-2	<1 x 1-2	0,5-0,8 x 1,8-4	0,5-0,8 x 1-1,5	0,3-0,9 x 1-3	1 x 2	0,8-1 x 1,7-2,2	1-1,5	0,5-1,25 x 1-2,5
Koloniefarbe	grau	grau	durchscheinend	beige	zitronengelb	beige	milchig weiß	grau	beige	cremefarben
Beweglichkeit	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum mit Stärke	-	+	+	+	+	nd	-	-	-	-
Gelatine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Tween 80	+	+	± <sup>i</sup>	+	+	nd	+	+	+	±
Citrat	+ <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	+/-	-	+/-	± <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	+	+
Glucose	+ <sup>i,k</sup>	+ <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	+	+	+	- <sup>k</sup>	- <sup>k</sup>	-	nd
Mannose	± <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	± <sup>i,k</sup>	+	+	+/-	- <sup>k</sup>	- <sup>k</sup>	-	nd
max. Wachstumstemperatur (°C)	35	40	35	37	40	30	35	35	19-22	<35
max. NaCl-Konzentration (%)	15	12	12	nd	nd	12,5	12	13	12	nd
G+C-Gehalt der DNA (mol%)	39,47 ± 0,21	41,45 ± 0,35	38,1 ± 0,65	38,5-38,9	38,9-44,7	41-42	46,33 ± 0,25	42,65 ± 0,37	43-44	43,6
Hauptfettsäure(n)	C16:1 c9, C16:0	C16:1 c9, C16:0	C16:1 c9, C16:0	C16:1 c9, C16:0	C16:1 c9, C16:0	C16:1 c9, C16:0, C17:1 c9	C16:1 c9, C18:1 c9	C18:1 c9	C16:1 c9, C18:1 c9	ΣC16:1 <sup>l</sup> , C18:1 c9
Habitat	marin, Partikel-assoziiert	marin, Partikel-assoziiert	marin, Partikel-assoziiert	marin, Algen-assoziiert	marin, frei lebend und assoziiert	u. a. Sedimente antarktischer Küstenregionen	marin, Partikel-assoziiert	marin, Partikel-assoziiert	Meereis	Magen antarktischer Krill

+, positiv; -, negativ; ±, schwach positiv; +/-, einige Stämme positiv, einige negativ; nd, keine Daten

<sup>a</sup> HEUCHERT (1999) und diese Arbeit; <sup>b</sup> HEUCHERT (1999), DE SILVA (2001) und diese Arbeit; <sup>c</sup> SAWABE et al. (2000) und MIKHAILOV et al. (2002); <sup>d</sup> IVANOVA et al. (1998b); <sup>e</sup> BOZAL et al. (1997);

<sup>f</sup> HEUCHERT et al. (in press, s. Kap. 8); <sup>g</sup> BOWMAN et al. (1997b); <sup>h</sup> DENNER et al. (2001)

<sup>i</sup> Reaktion in BIOLOG GN; <sup>j</sup> Reaktion in API 50 CH; <sup>k</sup> Wachstum in ASN<sub>100</sub>-Medium mit alleiniger C-Quelle

<sup>l</sup> exakte Position der Doppelbindung nicht bekannt

---

#### 4.3.1.3 Cytophaga-Flavobacteria

Neben den Proteobakterien können in marinen Habitaten auch Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe (CF) häufig vertreten sein (KIRCHMAN, 2002). So erreicht die Abundanz dieser Gruppe, die in einigen 16S rDNA Genbanken scheinbar unterrepräsentiert ist, im antarktischen Ozean z. B. bis zu 72% (GLÖCKNER et al., 1999; SIMON et al., 1999). Außerdem stellen die CF einen großen Anteil der an Partikeln assoziierten heterotrophen Bakterien dar (DELONG et al., 1993; RATH et al., 1998). Die charakteristischen Eigenschaften der Vertreter der CF, wie die Gleitfähigkeit und die Fähigkeit, verschiedene hochmolekulare Substanzen (z. B. Chitin, Cellulose) abzubauen zu können (REICHENBACH, 1992), bekräftigen dieses Ergebnis.

Die 16S rRNA-Sequenz des Isolates 88/2-1 zeigte eine hohe Übereinstimmung (98%) mit *Polaribacter irgensii*, der ebenfalls aus der Antarktis isoliert wurde (GOSINK et al., 1998). BRINKMEYER und Mitarbeiter (2003) fanden als Vertreter der CF-Fraktion in Proben aus der Antarktis vor allem diese Gattung. In Tabelle 4.5 werden einige charakteristische Eigenschaften des untersuchten Isolates 88/2-1 mit denen des nächstverwandten Organismus *Polaribacter irgensii* sowie zwei weiteren Vertretern dieser Gattung, *Pb. franzmannii* und *Pb. filamentus*, aus der CF-Gruppe verglichen. Das Isolat 88/2-1 weist einige Ähnlichkeiten zu diesen drei Organismen auf. Die größten Unterschiede zeigt es bei der maximalen Wachstumstemperatur, wo es mit 30 °C deutlich über der der *Polaribacter*-Arten liegt (max. 19 °C), und den Hauptfettsäuren (Anteil >10%). Außerdem besitzt Isolat 88/2-1 weder Oxidase noch Katalase, während die drei Vergleichsorganismen wenigstens eines der beiden Enzyme aufweisen. Es könnte sich demnach um eine neue Art handeln, was aber, wie schon bei den anderen Antarktisisolaten angeführt, nur mit Hilfe einer DNA-DNA-Hybridisierung geklärt werden kann.

#### 4.3.1.4 Gram-positive Bakterien

In den verschiedenen Meeren werden nur wenig Gram-positive Bakterien gefunden (HAGSTRÖM et al., 2000), scheinen aber aufgrund der Kultivierungsbedingungen unterrepräsentiert zu sein (WEBSTER et al., 2001). Vertreter dieser Bakteriengruppe kommen auch assoziiert an Partikeln vor (RATH et al., 1998). Die meisten der kultivierten Bakterien zeigen eine enge Verwandtschaft zu gut charakterisierten Gattungen der low G+C- und high G+C (*Actinobacteria*)-Gruppen. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die marinen *Actinobacteria* im Allgemeinen in der photischen Zone vorkommen, denn in größeren Wassertiefen konnten sie bisher nicht nachge-

wiesen werden (GIOVANNONI und RAPPÉ, 2000). Die Gram-positiven Isolate von der Station 7004-1 im äquatorialen Atlantik aus 100 und 150 m Wassertiefe konnten mittels FISH den Bakterien der low G+C Gruppe bzw. den *Actinobacteria* zugeordnet werden (s. Tab. 6.7b und c, Kap. 6.5).

**Tab. 4.5:** Vergleich morphologischer, physiologischer, chemotaxonomischer und molekularbiologischer Eigenschaften des Isolates 88/2-1 mit *Polaribacter (Pb.) irgensii*, *Pb. franzmannii* und *Pb. filamentus*

Eigenschaften	Isolat 88/2-1	<i>Pb. irgensii</i> <sup>a</sup>	<i>Pb. franzmannii</i> <sup>a</sup>	<i>Pb. filamentus</i> <sup>a</sup>
<b>Zellform</b>	kurze und lange Stäbchen	lange Stäbchen oder Filamente	lange Stäbchen	lange Stäbchen oder Filamente
<b>Zellgröße (µm)</b>	0,3 ± 0,05 x 2,34 ± 1,15 bis 18,6	0,25-0,5 x 0,8-48	0,8-1,6 x 4-16	0,5-1,2 x 1,6-32
<b>Koloniefarbe</b>	gelb-orange	orange	hell- bis dunkel-orange	orange bis lachsfarben
<b>Pigment</b>	Zeaxanthin	nicht Flexirubin	nicht Flexirubin	nicht Flexirubin
<b>Beweglichkeit</b>	-	- <sup>b</sup>	-	-
<b>Katalase</b>	-	+	+	+
<b>Oxidase</b>	-	±	+	-
<b>Wachstum mit</b>				
<b>Stärke</b>	+	±	±	±
<b>Gelatine</b>	+	-	+	±
<b>Saccharose</b>	+ <sup>c, d</sup> / <sup>e</sup>	-	-	F
<b>Citrat</b>	- <sup>c, e</sup>	-	-	-
<b>L-Glutamat</b>	+ <sup>c</sup>	-	-	+
<b>Glycerol</b>	- <sup>c, d, e</sup>	-	+	+
<b>max. Wachstumstemperatur (°C)</b>	30	12	10	19
<b>max. NaCl-Konzentration (%)</b>	6	nd	nd	nd
<b>G+C-Gehalt der DNA (mol%)</b>	32,15 ± 0,57	31	32 ± 1	32 ± 1
<b>Hauptfettsäure(n)</b>	i C15:0	3OH-i C 15:0, i C15:0, 3OH-C15:0	3OH-i C 15:0, i C15:1 <sup>f</sup>	3OH-i C 15:0, i C15:0, i C15:1 <sup>f</sup>
<b>Habitat</b>	marin, Partikel-assoziiert	marin	Meereis, Antarktis	marin

+, positiv; -, negativ; ±, schwach positiv; F, Fermentation; nd, keine Daten

<sup>a</sup> GOSINK et al. (1998)

<sup>b</sup> trotz polarer Flagellen

<sup>c</sup> Reaktion in BIOLOG GN; <sup>d</sup> Reaktion in API 50 CH; <sup>e</sup> Wachstum in ASN<sub>III</sub>-Medium mit alleiniger C-Quelle

<sup>f</sup> Position der Doppelbindung unbekannt

---

#### 4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werfen eine Reihe neuer Fragen auf, deren Bearbeitung zusätzliche Erkenntnisse in die behandelte Thematik bringen könnte. Im Folgenden wird auf einige näher eingegangen.

Die begonnenen Untersuchungen in Bezug auf den Auslöser zur Zellaggregation von *Psychrobacter nivimaris* (Isolat 88/2-7) sollten fortgeführt werden. Zum einen, um mehr über diesen Organismus und seine mögliche Aufgabe im natürlichen Habitat zu erfahren, zum anderen um mehr über die Zusammensetzung der EPS zu erfahren, da diese Substanzen von biotechnologischem Interesse sind. EPS können z. B. in Biofiltern umweltrelevant eingesetzt werden und bieten auch der pharmazeutischen Industrie interessante Anwendungsmöglichkeiten (GUTNICK und BACH, 2000; COLLIEC JOUAULT et al., 2003). Zunächst könnte versucht werden, die EPS mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Lektine im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar zu machen. Welche chemischen Gruppen in den EPS vorhanden sind, könnte zunächst durch Zugabe von Enzymen (Proteasen, Nucleasen oder Polysaccharid-spaltende Enzyme) und den dadurch bedingten Zerfall der Flocken überprüft werden. Zur genaueren Untersuchung der beteiligten Substanzen müsste versucht werden, die EPS durch Zentrifugation abzutrennen und durch Sterilfiltration und Dialyse aufzureinigen, um dann Zucker, Proteine oder eventuell Nucleinsäuren nachzuweisen.

Die Strukturaufklärung und Charakterisierung des bei den Isolaten 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe der Station 7004-1 gefundenen Carotinoide könnte weiter verfolgt werden. So sollte zunächst eine Cochromatographie mit Bacteriorubixanthin (TAKAICHI et al., 1990) durchgeführt werden. Bringt dies keine Übereinstimmung, sollte das Pigment für eine Kernresonanzspektroskopie (NMR) aufgereinigt werden, um Informationen über die Struktur zu erhalten. Auch die Pigmente der anderen an dieser Station isolierten Organismen sollten noch genauer untersucht werden. Dies betrifft z. B. die der Isolate 13a, 13b und 44c1a, da für deren Pigmente genauso wie für die der beiden näher untersuchten Isolate mit Hilfe der modifizierten Methode nach RABENSTEIN (1997) keine Peaks detektiert werden konnten. Außerdem könnte versucht werden, genaueres über die Funktion der Carotinoide in diesen marinen Isolaten herauszufinden. Beeinflussen diese Pigmente eventuell im Zusammenspiel mit den Fettsäuren die Membranfluidität? Verändern sie sich bezüglich Anteil und Zusammensetzung bei veränderter Wachstumstemperatur und wie ändert sich im gleichen Zusammenhang die Fettsäurezusammensetzung?

---

Ebenfalls interessant im Hinblick auf eine Anpassung an das Habitat „Aggregat“ könnte die Bildung der inhibitorischen Substanz(en) durch die drei  $\alpha$ -Proteobakterien-Isolate 30b1a, 34c1b1 und 44b2b2 aus 150 m Wassertiefe des äquatorialen Atlantiks sein. Um was für eine Substanz handelt es sich dabei? Wirken sie auch gegen andere Organismen oder nur gegen dieses  $\gamma$ -Proteobakterium? Welche biologische Aktivität besitzt(en) sie noch? Bringt diese Substanz ihnen einen Vorteil bei der Besiedlung der Partikel und ist dadurch eventuell auch der größere Anteil der  $\alpha$ -Proteobakterien in 150 m Wassertiefe erklärbar?

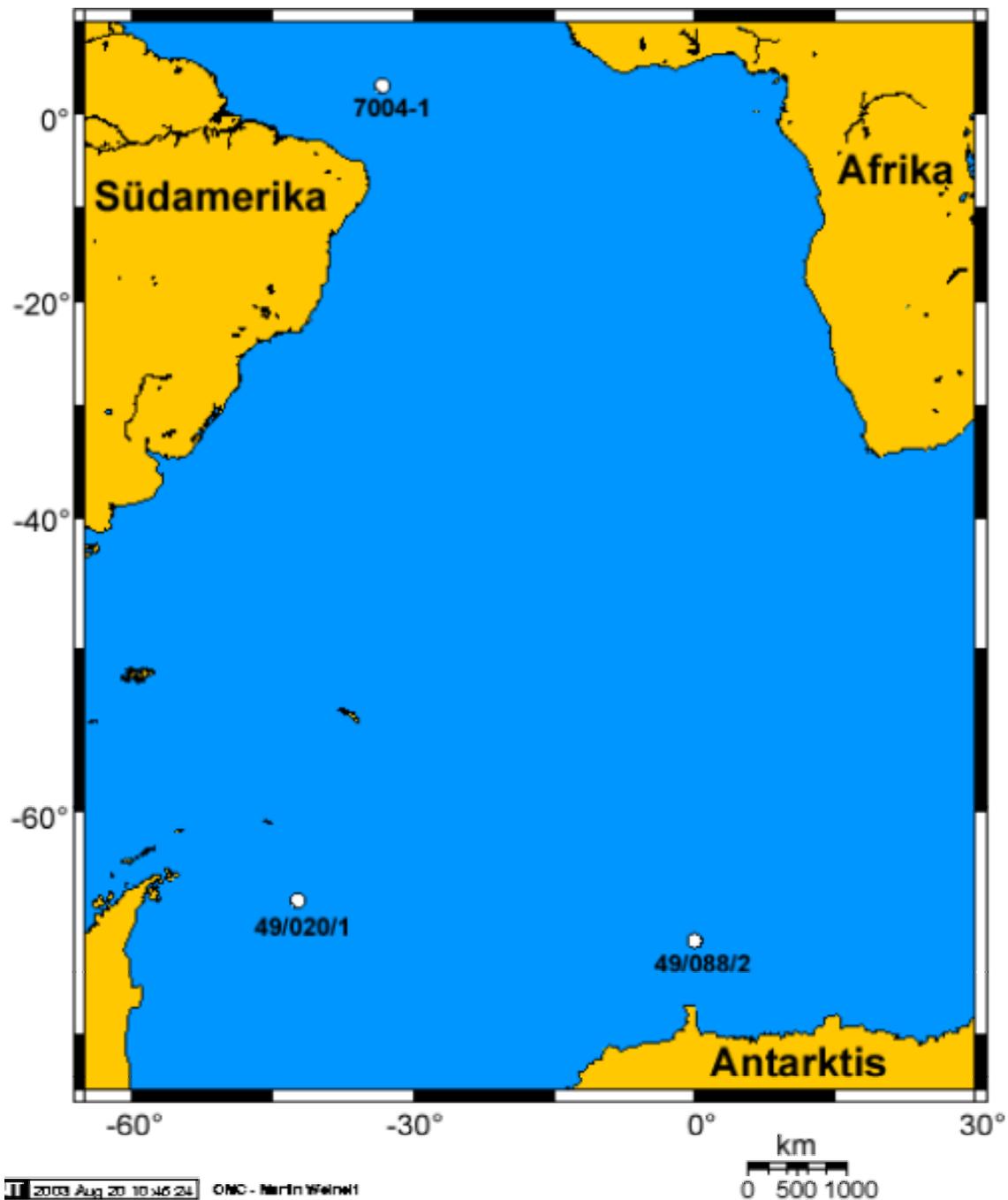
## 5 Zusammenfassung

1. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antarktisisolaten handelt es sich ausschließlich um Gram-negative Stäbchen. Dagegen konnten aus den Proben des äquatorialen Atlantiks sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien isoliert werden, die außerdem eine vielfältigere Zellmorphologie aufweisen. Unter den Isolaten beider Untersuchungsgebiete sind sowohl bewegliche als auch unbewegliche Organismen vertreten.
2. Alle Antarktisisolate sind psychrotolerant (Wachstum bei 5 °C bis ≤40 °C) und marin bzw. halotolerant.
3. Die Antarktisisolate wiesen in den verschiedenen Substratverwertungstests (C-Quelle in ASN<sub>III</sub>-Medium, BIOLOG GN, API 50 CH) teilweise ein sehr unterschiedliches Verhalten auf. So zeigte Isolat 88/2-2 lediglich mit Glucose (0,03% C) im ASN<sub>III</sub>-Medium schwaches und mit  $\beta$ -Hydroxybuttersäure im BIOLOG GN gutes Wachstum, während Isolat 88/2-4 in allen Tests die meisten der angebotenen Substrate verwerten konnte. Nur vier der Isolate besitzen dagegen Enzyme zum Abbau der Polymere Stärke und Gelatine (Isolat 20/1-3, 20/1-4 und 88/2-1) bzw. nur Gelatine (Isolat 20/1-2). Bei den Ansätzen von Mischkulturen der beiden Stationen 49/020/1 und 49/088/2 im BIOLOG GN-Testsystem zeigten sich sowohl antagonistische als auch synergistische Effekte.
4. Mittels FISH konnten die Isolate beider Probennahmegebiete vor allem den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* zugeordnet werden, außerdem jeweils ein Isolat der *Cytophaga-Flavobacteria*-Gruppe. Bei den Isolaten aus dem äquatorialen Atlantik hybridisierten außerdem drei mit der Sonde für Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt und eines mit der Sonde für *Actinobacteria* (hoher G+C-Gehalt).
5. Aus Proben beider Untersuchungsgebiete wurden pigmentierte Organismen isoliert. Das Pigment des Antarktisisolates 88/2-1 konnte mittels Cochromatographie als Zeaxanthin bestimmt werden. Von den Carotinoiden der Isolate 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe des äquatorialen Atlantiks wurde mittels Massenspektrometrie eine Massenzahl von 582 bestimmt. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei ihnen um Bacteriorubixanthin handelt, was mittels Cochromatographie jedoch noch nachgewiesen werden müsste.

6. Die Isolate wiesen in ihren Fettsäuremustern für ihre Bakteriengruppe bzw. Gattung typische Fettsäuren auf. Eine Inkubation der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 bei einer niedrigeren Temperatur führte bei beiden Isolaten zu einer Zunahme an Doppelbindungen (Bildung von C18:2 c 9,12). Bei Isolat 88/2-4 traten bei der niedrigeren Temperatur zusätzlich auch verzweigte Fettsäuren auf. Die geringere Temperatur führte bei Isolat 88/2-7 zu einer Verkürzung der Kettenlänge sowie zur Abnahme an gesättigten und verzweigten Fettsäuren.
7. Die ARDRA-PCR erlaubte eine Einteilung der elf untersuchten Antarktisisolate in zehn verschiedene ARDRA-Gruppen. Lediglich die Isolate 20/1-1 und 88/2-6 bildeten eine Gruppe. Die RAPD-PCR ergab für die sieben untersuchten Isolate 20/1-1, 20/1-3, 20/1-4, 88/2-1, 88/2-2, 88/2-5 und 88/2-6 keine übereinstimmenden Bandenmuster. Ein Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen ergab für die Antarktisisolate als nächstverwandte Organismen Vertreter der Gattungen *Loktanella*, *Sulfitobacter*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* und *Polaribacter*. Die beiden Isolate 3 und 4a1c aus dem äquatorialen Atlantik (150 m Wassertiefe) konnten anhand des Sequenzvergleiches der Gattung *Erythrobacter* zugeordnet werden.
8. Die nahezu vollständige 16S rRNA-Sequenz des Isolates 88/2-7 wies mit der RNA-Sequenz von *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>) 99,65% und mit der von *P. glacicola* (DSM 12194<sup>T</sup>) etwa 97,6% Übereinstimmung auf.
9. Eine abschließende DNA-DNA-Hybridisierung zeigte, dass das Isolat 88/2-7 eine neue Art innerhalb der Gattung *Psychrobacter* darstellt. Das Isolat zeigte eine Übereinstimmung von 24,2% zu *Psychrobacter glacicola* (DSM12194<sup>T</sup>) bzw. 26,8% zu *Psychrobacter proteolyticus* (DSM13887<sup>T</sup>) und wurde als die neue Spezies *Psychrobacter nivimaris* beschrieben (s. auch HEUCHERT et al., 2004, Kap. 8)
10. *Psychrobacter nivimaris* sp. nov. zeigte bei 5 °C eine stärkere Flockenbildung als bei 27 °C. Diese Flockenbildung kann auf EPS zurückgeführt werden. Ca<sup>2+</sup> scheint allerdings eine untergeordnete Rolle bei der Verfestigung der EPS-Matrix zu spielen. Eine Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration brachte keine sichtbare Veränderung in der Stabilität der Flocken. Aus welchen Substanzen sich die EPS-Matrix zusammensetzt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.
11. Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind bereits veröffentlicht oder wurden zur Veröffentlichung akzeptiert (s. Kap. 8).

## 6 Anhang

### 6.1 Geographische Lage der Probennahmestellen während ANT XV/4 und M49/4

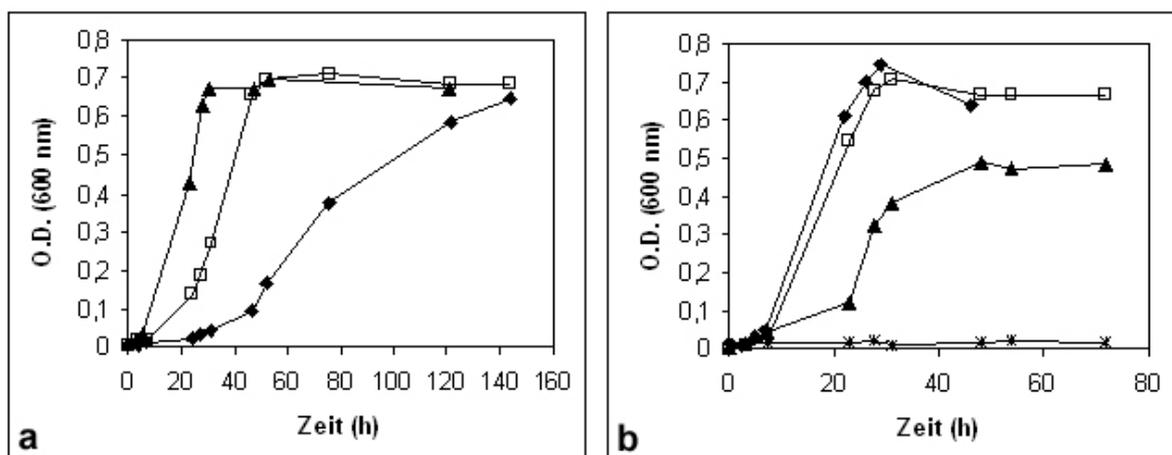


**Abb. 6.1:** Geographische Lage der bearbeiteten Probennahmestellen während ANT XV/4 (Station 49/020/1 und 49/088/2) und M49/4 (Station 7004-1)

## 6.2 Wachstumskurven der Antarktisolat zur Ermittlung der optimalen Temperatur, NaCl-Konzentration und des pH-Wertes

Beim Vergleich der Diagramme muss beachtet werden, dass die Skalierungen zum Teil unterschiedlich sind.

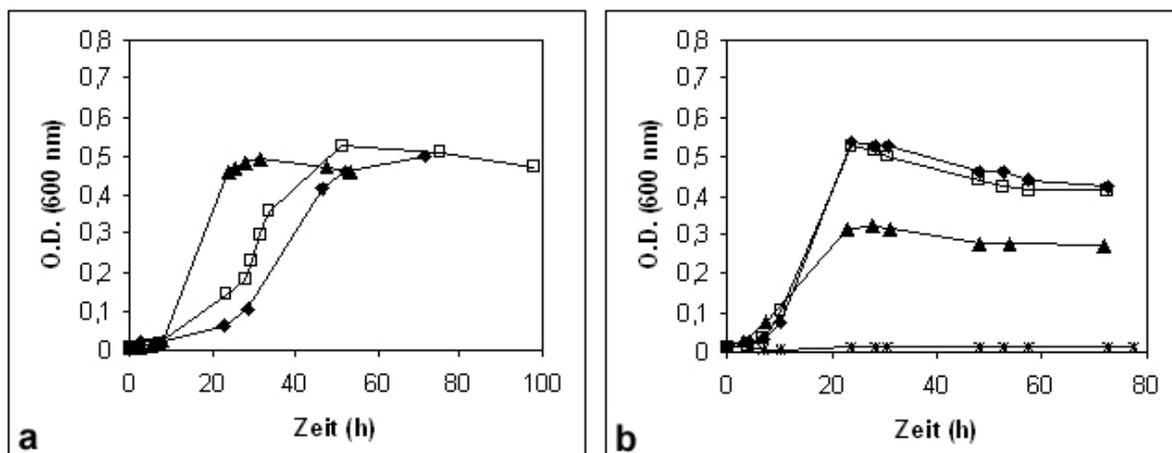
### 6.2.1 Temperatur



**Abb. 6.2:** Wachstum von Isolat 20/1-1 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) in Abhängigkeit von der Temperatur.

a) ◆ 5 °C; □ 10 °C; ▲ 15 °C

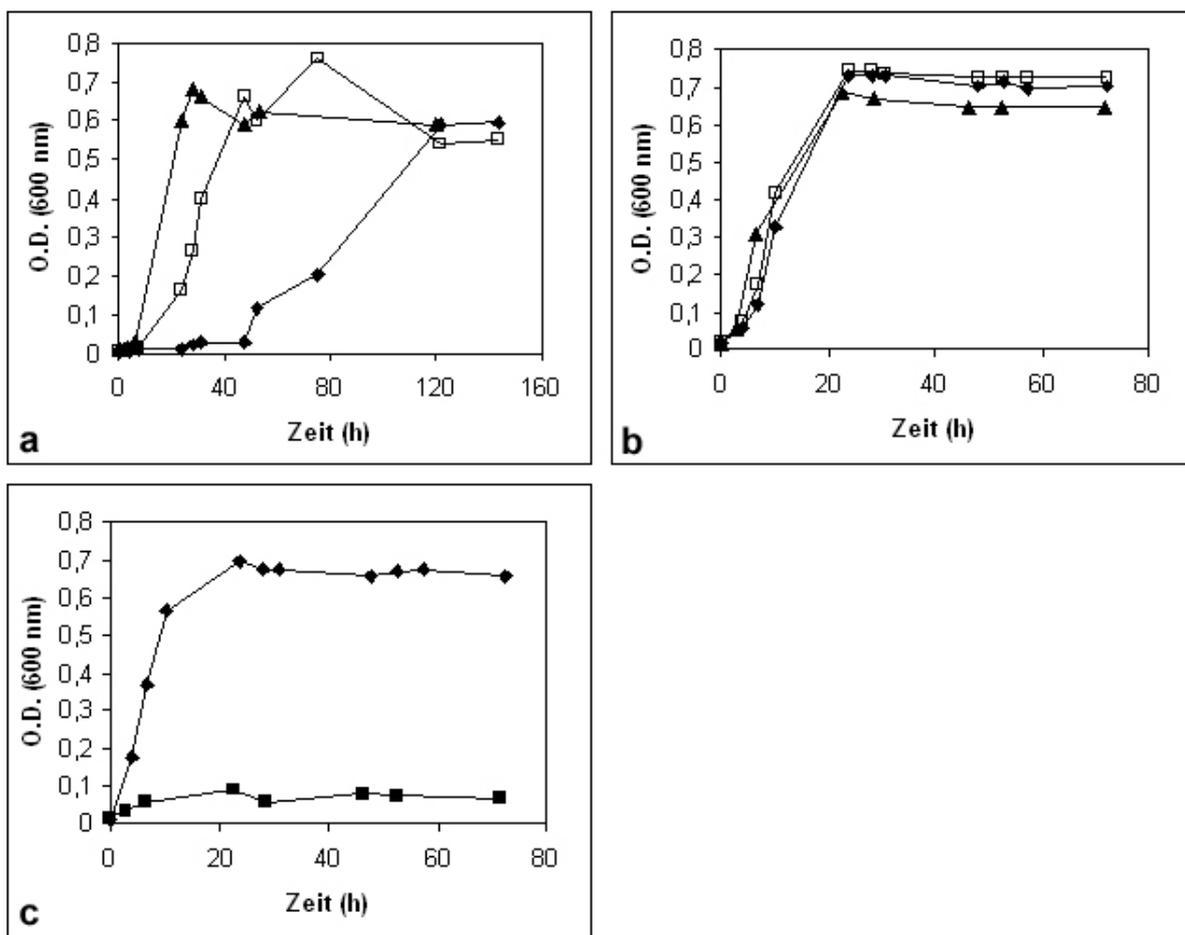
b) ◆ 20 °C; □ 23 °C; ▲ 30 °C; \* 35 °C



**Abb. 6.3:** Wachstum von Isolat 88/2-1 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) in Abhängigkeit von der Temperatur.

a) ◆ 5 °C; □ 10 °C; ▲ 15 °C

b) ◆ 20 °C; □ 23 °C; ▲ 30 °C; \* 35 °C

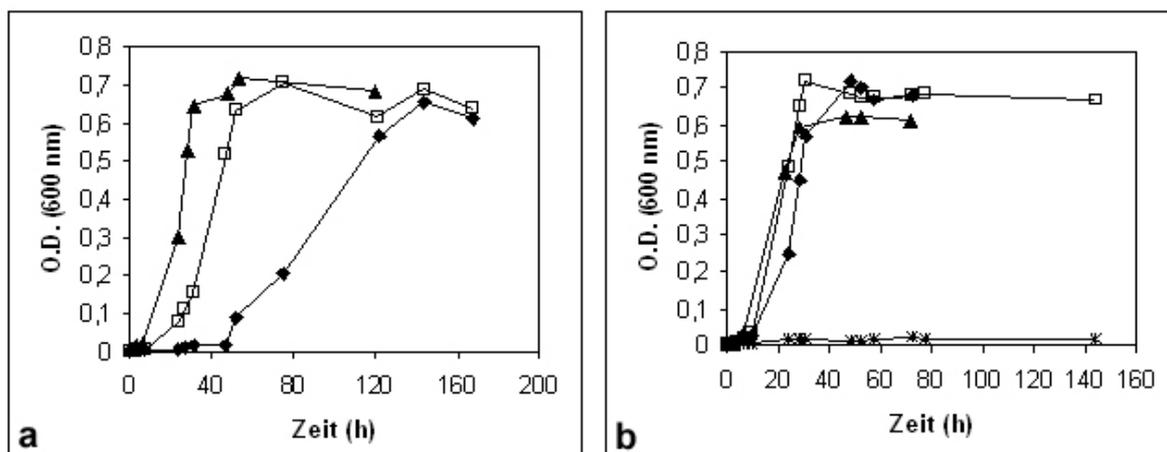


**Abb. 6.4:** Wachstum von Isolat 88/2-2 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) in Abhängigkeit von der Temperatur.

a) ◆ 5 °C; □ 10 °C; ▲ 15 °C

b) ◆ 20 °C; □ 23 °C; ▲ 30 °C

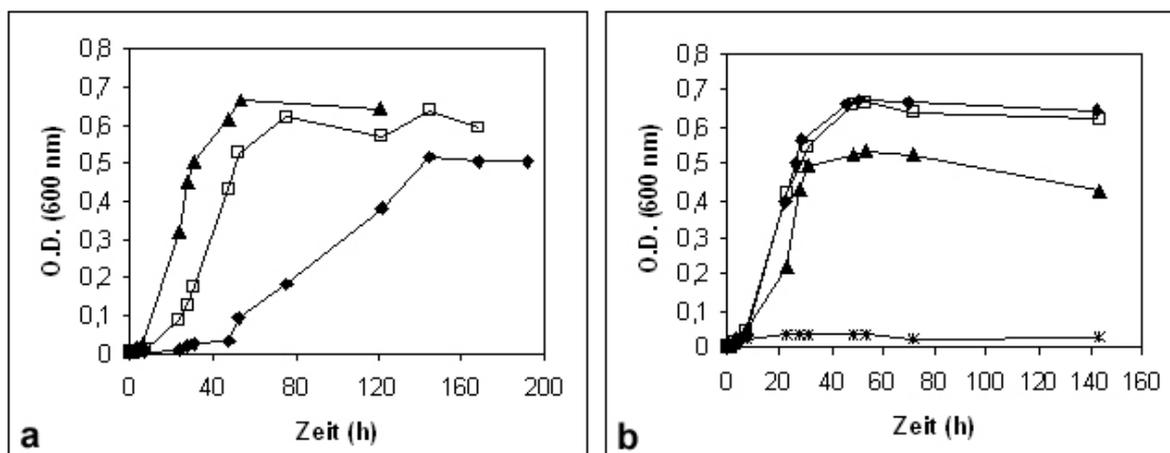
c) ◆ 35 °C; ■ 40 °C



**Abb. 6.5:** Wachstum von Isolat 88/2-5 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) in Abhängigkeit von der Temperatur.

a) ◆ 5 °C; □ 10 °C; ▲ 15 °C

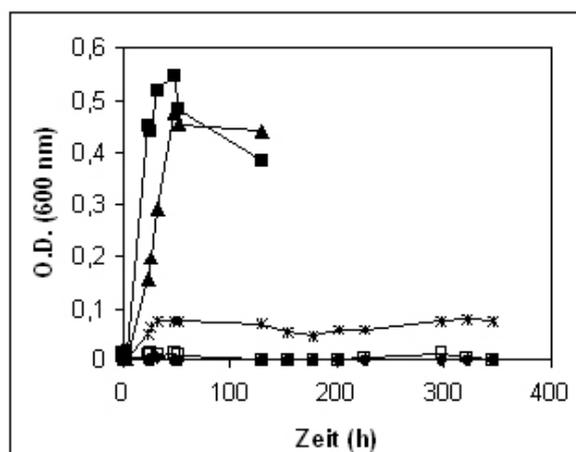
b) ◆ 20 °C; □ 23 °C; ▲ 30 °C; \* 35 °C



**Abb. 6.6:** Wachstum von Isolat 88/2-6 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%, pH 7,8-8,2) in Abhängigkeit von der Temperatur.

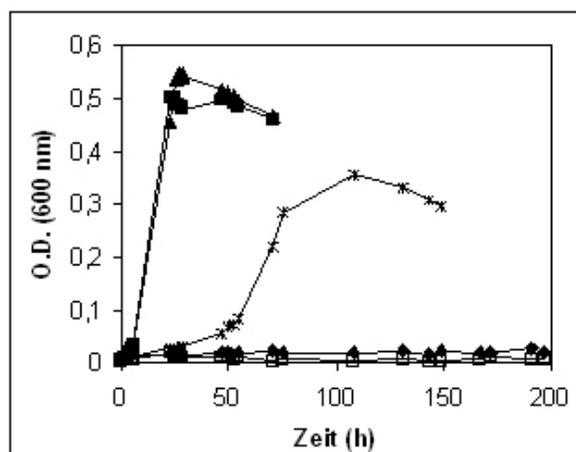
a) ◆ 5 °C; □ 10 °C; ▲ 15 °C  
b) ◆ 20 °C; □ 23 °C; ▲ 30 °C; \* 35 °C

## 6.2.2 NaCl-Konzentration



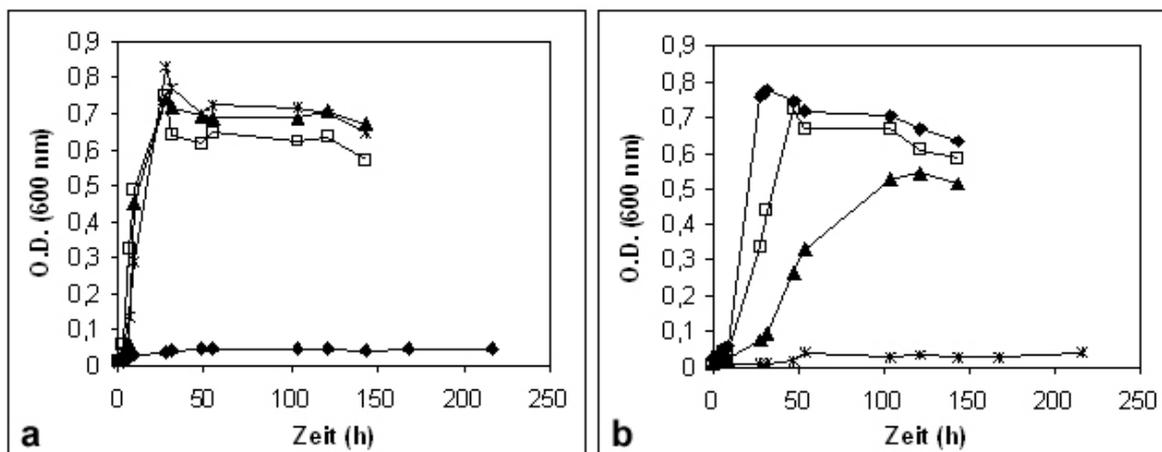
**Abb. 6.7:** Wachstum von Isolat 20/1-1 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (pH 7,8-8,2) bei 30 °C in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt.

◆ 0%; ■ 2%; ▲ 4%; \* 6%; □ 8%



**Abb. 6.8:** Wachstum von Isolat 88/2-1 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (pH 7,8-8,2) bei 30 °C in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt.

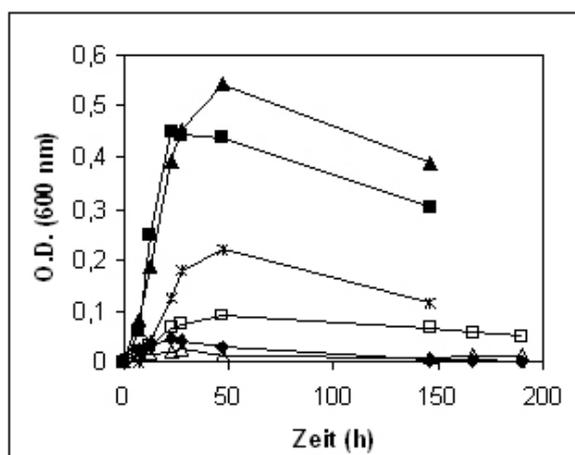
◆ 0%; ■ 2%; ▲ 4%; \* 6%; □ 8%



**Abb. 6.9:** Wachstum von Isolat 88/2-2 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (pH 7,8-8,2) bei 30 °C in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt.

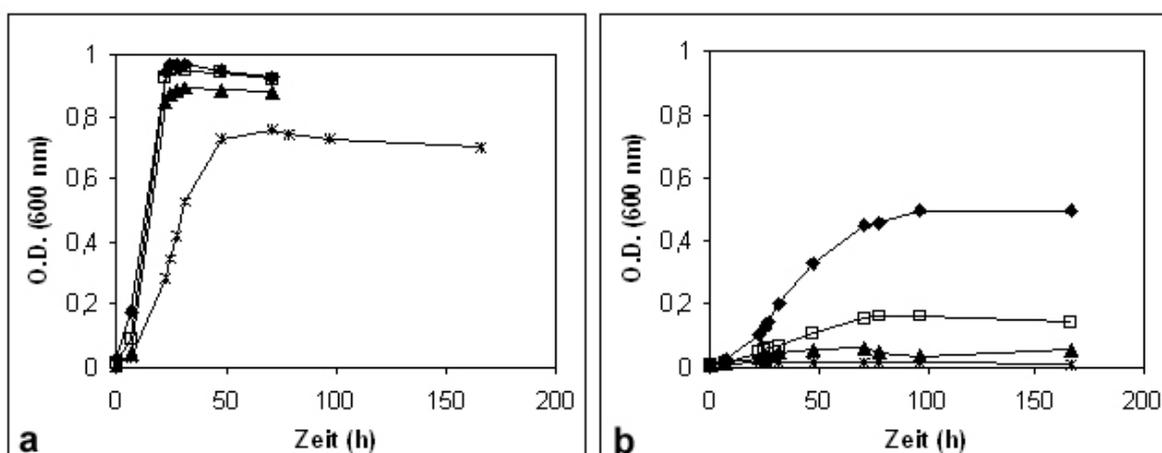
a)  $\blacklozenge$  0%;  $\square$  2%;  $\blacktriangle$  4%; \* 6%

b)  $\blacklozenge$  8%;  $\square$  10%;  $\blacktriangle$  12%; \* 14%



**Abb. 6.10:** Wachstum von Isolat 88/2-5 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (pH 7,8-8,2) bei 30 °C in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt.

$\blacklozenge$  0%;  $\blacksquare$  2%;  $\blacktriangle$  4%; \* 6%;  $\square$  8%;  $\triangle$  10%

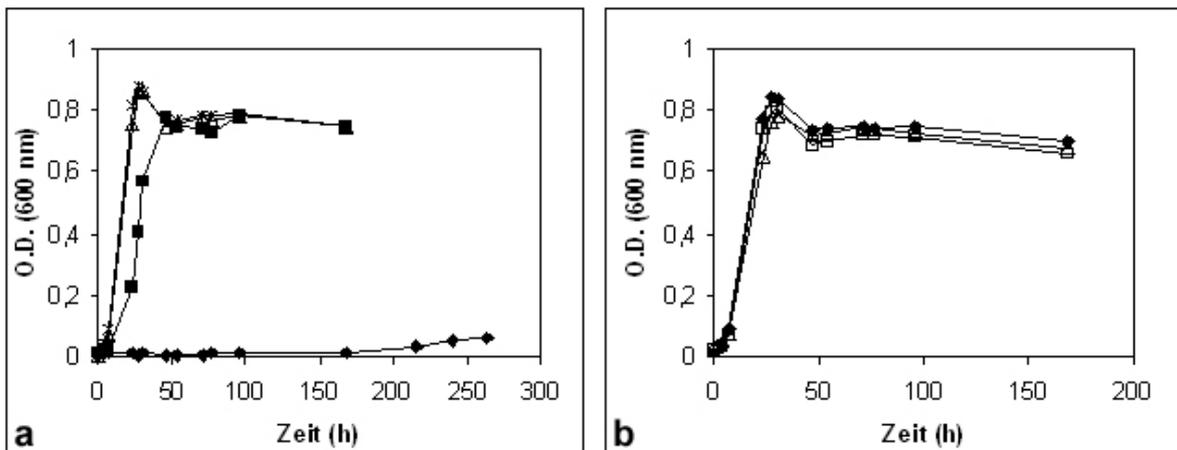


**Abb. 6.11:** Wachstum von Isolat 88/2-6 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (pH 7,8-8,2) bei 30 °C in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt.

a)  $\blacklozenge$  0%;  $\square$  2%;  $\blacktriangle$  4%; \* 6%

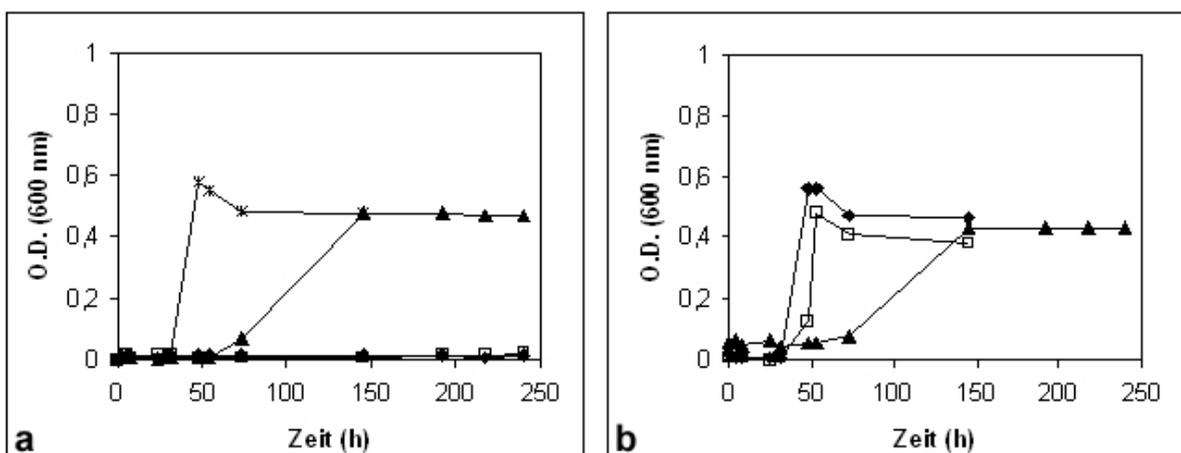
b)  $\blacklozenge$  8%;  $\square$  10%;  $\blacktriangle$  12%; \* 14%

## 6.2.3 pH-Wert



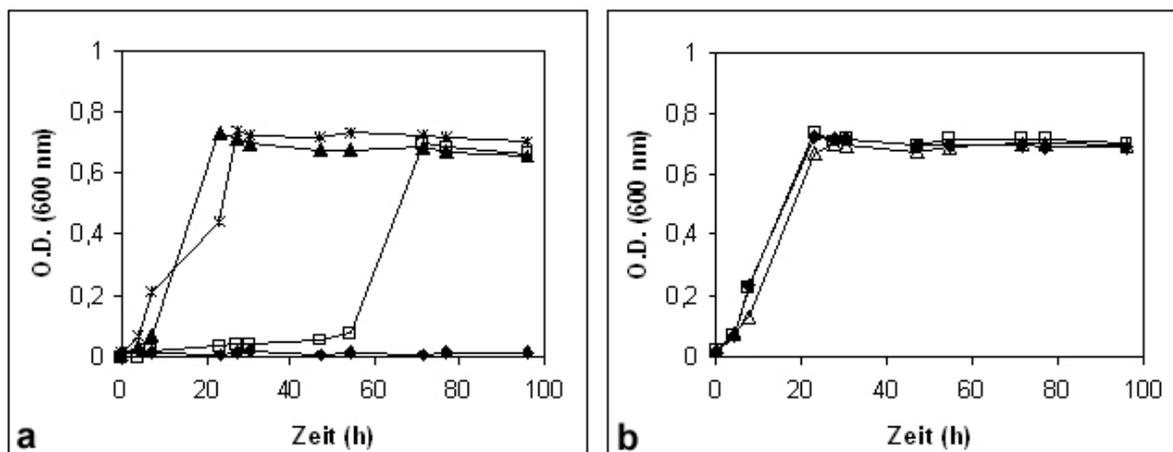
**Abb. 6.12:** Wachstum von Isolat 20/1-1 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%) bei  $24 \pm 2$  °C in Abhängigkeit vom pH-Wert.

- a) ♦ pH 4; ■ pH 5; △ pH 6; \* pH 7  
 b) ♦ pH 8; □ pH 9; △ pH 10



**Abb. 6.13:** Wachstum von Isolat 88/2-1 in  $ASN_{III}$ -Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%) bei  $24 \pm 2$  °C in Abhängigkeit vom pH-Wert.

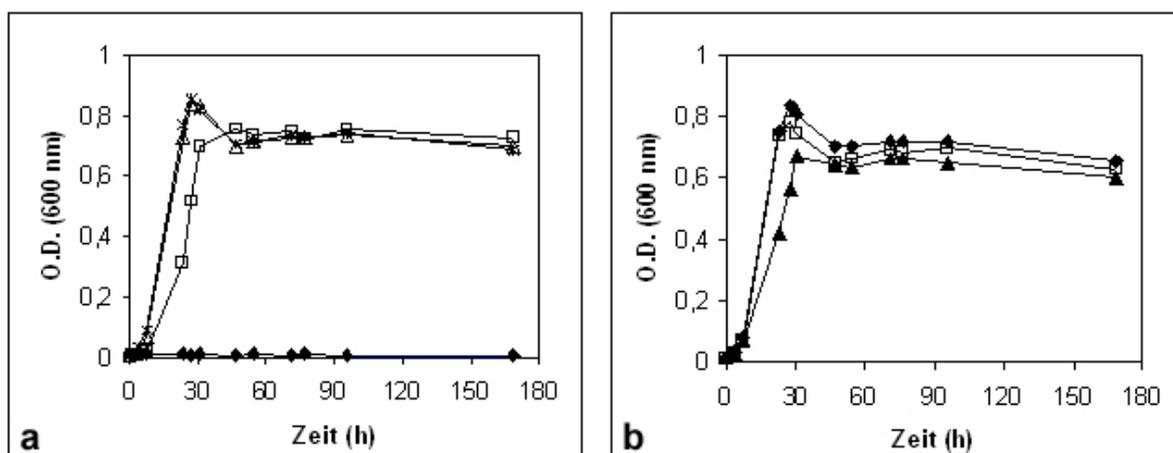
- a) ♦ pH 4; □ pH 5; ▲ pH 6; \* pH 7  
 b) ♦ pH 8; □ pH 9; ▲ pH 10



**Abb. 6.14:** Wachstum von Isolat 88/2-2 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%) bei 24 ± 2 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert.

a) ♦ pH 4; □ pH 5; ▲ pH 6; \* pH 7

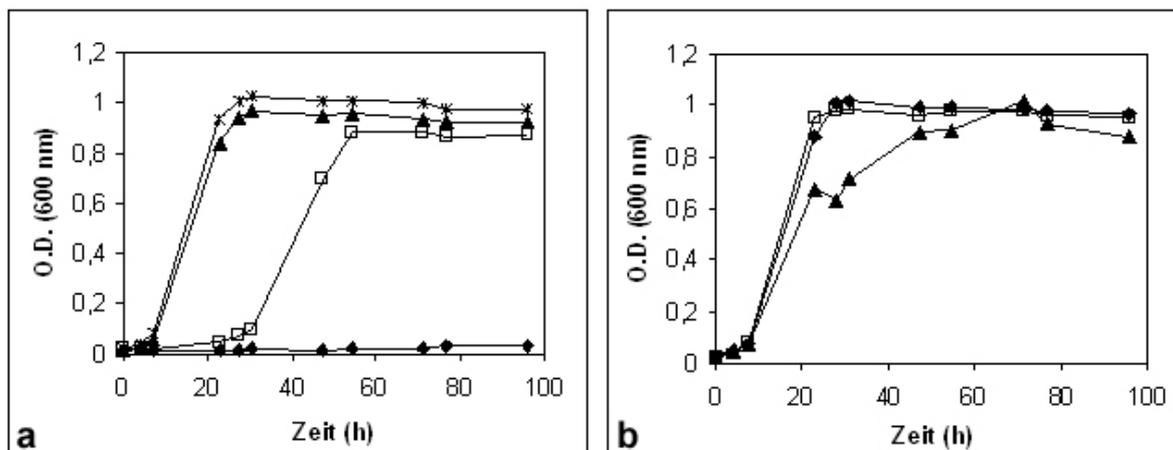
b) ♦ p 8; □ pH 9; Δ pH 10



**Abb. 6.15:** Wachstum von Isolat 88/2-5 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%) bei 24 ± 2 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert.

a) ♦ pH 4; □ pH 5; Δ pH 6; \* pH 7

b) ♦ p 8; □ pH 9; ▲ pH 10



**Abb. 6.16:** Wachstum von Isolat 88/2-6 in ASN<sub>III</sub>-Medium mit 0,1% Hefeextrakt (Salinität 3,4%) bei 24 ± 2 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert.

a) ♦ pH 4; □ pH 5; ▲ pH 6; \* pH 7

b) ♦ pH 8; □ pH 9; ▲ pH 10

### 6.3 Distanzmatrizen berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

**Tab. 6.1:** Distanzmatrix aus dem Datensatz der visuell ausgewerteten RAPD-Bandenmuster (s. Abb. 3.4a und b) von sieben Antarktisisolaten, berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-5	88/2-6
20/1-1		0,27273	0,45455	0,22727	0,36364	0,04545	0,09091
20/1-3			0,63636	0,50000	0,54545	0,31818	0,36364
20/1-4				0,59091	0,54545	0,50000	0,45455
88/2-1					0,50000	0,18182	0,22727
88/2-2						0,40909	0,45455
88/2-5							0,04545
88/2-6							

**Tab. 6.2:** Distanzmatrix aus dem Datensatz des Verwertungsspektrums der Kohlenstoffquellen in ASN<sub>III</sub>-Medium der elf Antarktisisolate (s. Tab. 3.3), berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-3	88/2-4	88/2-5	88/2-6	88/2-7
20/1-1		0,15385	0,46154	0,61538	0,84615	0,61538	0,61538	0,07692	0	0,15385	0,76923
20/1-2			0,30769	0,46154	0,84615	0,76923	0,76923	0,07692	0,15385	0,30769	0,76923
20/1-3				0,30769	0,69231	0,76923	0,76923	0,38462	0,46154	0,61538	0,76923
20/1-4					0,53846	0,61538	0,61538	0,53846	0,61538	0,61538	0,61538
88/2-1						0,23077	0,23077	0,92308	0,84615	0,69231	0,23077
88/2-2							0,15385	0,69231	0,61538	0,46154	0,15385
88/2-3								0,69231	0,61538	0,61538	0,15385
88/2-4									0,07692	0,23077	0,69231
88/2-5										0,15385	0,76923
88/2-6											0,61538
88/2-7											

**Tab. 6.3:** Distanzmatrix aus dem Datensatz des im BIOLOG GN-Testsystem ermittelten Verwertungsspektrums der elf Antarktisololate (s. Tab. 3.4), berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-3	88/2-4	88/2-5	88/2-6	88/2-7
20/1-1		0,38947	0,4	0,4	0,26316	0,17895	0,37895	0,45263	0,16842	0,17895	0,36842
20/1-2			0,09474	0,11579	0,37895	0,44211	0,34737	0,4	0,45263	0,46316	0,35789
20/1-3				0,12632	0,34737	0,45263	0,33684	0,32632	0,46316	0,47368	0,32632
20/1-4					0,36842	0,49474	0,37895	0,36842	0,48421	0,47368	0,36842
88/2-1						0,18947	0,36842	0,50526	0,2	0,18947	0,33684
88/2-2							0,34737	0,61053	0,01053	0,02105	0,29474
88/2-3								0,34737	0,35789	0,36842	0,09474
88/2-4									0,6	0,61053	0,35789
88/2-5										0,01053	0,30526
88/2-6											0,31579
88/2-7											

**Tab. 6.4:** Distanzmatrix aus dem Datensatz des im API 50 CH-Testsystem ermittelten Verwertungsspektrums der elf Antarktisololate (s. Tab. 3.5), berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-3	88/2-4	88/2-5	88/2-6	88/2-7
20/1-1		0,32653	0,38776	0,40816	0,38776	0,26531	0,14286	0,18367	0,08163	0,22449	0,18367
20/1-2			0,18367	0,12245	0,18367	0,26531	0,38776	0,42857	0,36735	0,42857	0,30612
20/1-3				0,18367	0,28571	0,40816	0,44898	0,36735	0,42857	0,44898	0,36735
20/1-4					0,26531	0,38776	0,5102	0,51020	0,44898	0,55102	0,42857
88/2-1						0,16327	0,36735	0,40816	0,38776	0,40816	0,36735
88/2-2							0,2449	0,36735	0,30612	0,28571	0,28571
88/2-3								0,24490	0,18367	0,24490	0,12245
88/2-4									0,10204	0,24490	0,32653
88/2-5										0,26531	0,26531
88/2-6											0,24490
88/2-7											

**Tab. 6.5:** Distanzmatrix aus dem Datensatz der FAME-Bestimmung der elf Antarktisisolate (s. Tab. 3.6), berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-2	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-3	88/2-4	88/2-5	88/2-6	88/2-7
20/1-1		0,60000	0,70000	0,55000	0,60000	0,15000	0,30000	0,15000	0,15000	0,10000	0,40000
20/1-2			0,10000	0,15000	0,40000	0,65000	0,40000	0,75000	0,45000	0,50000	0,50000
20/1-3				0,15000	0,50000	0,65000	0,50000	0,85000	0,55000	0,60000	0,60000
20/1-4					0,45000	0,50000	0,35000	0,70000	0,40000	0,45000	0,45000
88/2-1						0,65000	0,40000	0,55000	0,45000	0,50000	0,30000
88/2-2							0,35000	0,20000	0,20000	0,15000	0,45000
88/2-3								0,45000	0,25000	0,20000	0,20000
88/2-4									0,30000	0,25000	0,45000
88/2-5										0,05000	0,25000
88/2-6											0,30000
88/2-7											

**Tab. 6.6:** Distanzmatrix aus dem Datensatz der visuell ausgewerteten RAPD-Bandenmuster (s. Abb. 3.4a und b) und der FAME-Bestimmung (s. Tab. 3.6) von sieben Antarktisisolaten, berechnet nach dem UPGMA-Verfahren in PAUP

Isolat	20/1-1	20/1-3	20/1-4	88/2-1	88/2-2	88/2-5	88/2-6
20/1-1		0,47619	0,50000	0,40476	0,26190	0,09524	0,09524
20/1-3			0,40476	0,50000	0,59524	0,42857	0,47619
20/1-4				0,52381	0,52381	0,45238	0,45238
88/2-1					0,57143	0,30952	0,35714
88/2-2						0,30952	0,30952
88/2-5							0,04762
88/2-6							

#### 6.4 16S rRNA-Sequenzen der Antarktisisolate

Vollsequenzen der 16S rRNA der Isolate 88/2-4 und 88/2-7 sowie Teilsequenzen der 16S rRNA aller anderen Antarktisisolate (außer Isolate 20/1-3 und 20/1-4, s. DE SILVA, 2001):

**20/1-1 (1295 nt):** 5'-CGAACGCTGGCGGCACGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGG  
TCTAGCGGCGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGCTTCGGAA  
TAGCCTCGGGAAACTGGGAGTAATACCGAATGTGCCCTTTGGGGGAAAGATT  
TATCGGCAAAAGATCGGCCCCGCGTCTGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGC  
CTACCAAGTCTGCGATCAGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCAACACTGG  
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAG  
ACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCGATGCCGCGTGAGTGACGAAGGCCTTA  
GGGTCGTAAAGCTCTTTCGCCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGTAAAGAA  
ACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGT  
TGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTAGAAAGTTGGGG  
GTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTCCAAAATACTAGTCTAGA  
GTTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAT  
TCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGA  
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGATGAATGCCAGACGTCAGGGGGCTTGCCCTTTGGTGTACACCTA  
ACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA  
ACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTCTGACCGCCTAGGAGACTAG  
GTTTTATCGTAAGATACAGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCTTAG  
TTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGGGAAACTGCCCGTGATAAGCGGGAG  
GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCATGGCCCTTACGGGTGGGCTACACA  
CGTGCTACAATGGCATCTACAGTGAGTTAATCTCCAAAAGATGTTTCAGTTCGG  
ATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTA  
ACAGCAT GACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT-3'

**20/1-2 (1326 nt):** 5'-GGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTG  
CTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGG  
GGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAA  
GGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGAT  
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG  
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAG  
TTAATACCTGCTAKCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC

---

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGG  
CTCAACCTGGGAACTGCATTTCTGAACTGGCAAAGTAGAGTGTGATAGAGGGT  
GGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCG  
ATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTA  
CTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGAC  
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGA  
ACTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAAT  
GCTGAGAAGCTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC  
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCGCATAACAGAGTGCTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGC  
GGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGC  
TAGTAAATCGC GTATCAGAAATGGACCGGTG-3'

**88/2-1 (1315 nt):** 5'-CTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGTGCTTGCA  
CAGATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAAACGCGTATAGAACCTACCTTTTAC  
AGAGGGATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAGTATTGAGACTTG  
GCATCAAGTTTTAATTAAGATTTATCGGTAAAAGATGGCTATGCGTCCTATT  
AGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACATCGATAGGTAGGGGTCTG  
AGAGGGAGATCCCCCACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGAGGAGACTCTGATCCAGCCATGCC  
GCGTGTAGGAAGAATGCCCTATGGGTTGTAAACTACTTTTATACAGGAAGAA  
ACACTGGTATGTATAACCAGCTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTCCAAGCGTTATCCGGAATC  
ATTGGGTTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGAGGTGAAATCCCA  
TAGCTTAACTATGGAAGTGCCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTCATATGGAAG  
TAGATAGAATGTGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACACAGAATAC  
CGATTGCGAAGGCAGTCTACTRCGTATGTACTGACGCTCATGGACCGAAAGC  
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGA  
TACTAGTTGTTGGGATTTATCTCAGTACTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCA  
CCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTAC  
CAGGGCTTAAATGTAGTCTGACAGCTTTAGAGATAGAGTTTTCTTCGGACAG  
ATTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTT  
AAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTGTGTTAGTTGCCAGCATGTAAAGATG  
GGGACTCTAACGAGACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGGATGACG

---

TCAAATCATCACGGCCCTTACGTCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGTAT  
GGACAATGAGCAGCCATCTGGCAACAGAGAGCGAATCTATAAACCATATCAC  
AGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
TCGGATATCAGCCATG-3'

**88/2-2 (1247 nt):** 5'-TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCG  
GCGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTGCGGAATAGCCAC  
TGAAACGGTGAGTAATACCGCATAACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGA  
GAAGGATCGGCCC GCGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA  
GTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGG  
GCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGTCTTAGGATCGT  
AAAGCACTTTCGCCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGTAAAGAAACCCCGG  
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTCCG  
AATTACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCGGATCAGAAAGTTGGGGGTGAAAT  
CCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTCCAAAACCTCTGGTCTTGAGTTCGAG  
AGAGGTGAGTGGAAATCCAAGTGTAAGGTTGAAATTCGTAGATATTTGGAGG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGA  
AAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACG  
ATGAATGCCAGTCGTCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGACACACCTAACGGATT  
AAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGC  
AGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGTGCTAACCCGAGAGATCGGGCGTTC  
ACTTCGGTGACGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTCCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCA  
GCAGTTCGGCTGGGCACTCTAAGGAACTGCCCGTGATAAGCGGGAGGAAG  
GTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTGGGCTACACACGTG  
CTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAGCTTGTCTCAATTCGGA  
ATGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAA  
CAGC-3'

**88/2-3 (1295 nt):** 5'-CTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTSTAGCTTGC  
TAGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACTTAGGAATCTACCTAGT  
AGTGGGGGATAGCACGGGGAAACTCGTATTAATACCGCATAACGACCTACGGG  
AGAAAGGGGGCAGTTTACTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTA  
GCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGA  
GAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCC  
GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAG  
ACCTAATGGTTAATACCCATTARCGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCG  
GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG

GAATTACTGGGCGTAAAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAA  
 TCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATCTGAAACTGTTAGGCTAGAGTAGGT  
 GAGAGGGAAGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAG  
 GAATACCGATGGCGAAGGCAGCTTCCTGGCATCATACTGACACTGAGGCTCG  
 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  
 GATGTCTACTAGTCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCTAACGCA  
 ATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATT  
 GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC  
 GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAG  
 TGCCTTCGGGAATTAGAATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTAC  
 CAGCGGGTTAAGCCGGGAACTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGA  
 AGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTTACCAC  
 GTGCTACAATGGTAGGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATC  
 TCAAAAAGCCTATCGTAGTCCAGAATGGAGTCTTGCAACTCGACTCCATG-3'

**88/2-4 (1420 nt):** 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATG  
 (Vollsequenz) CAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG  
 GGAACGTGCCCTTTGCTACGGAATAGTCCCGGGAAACTGGGTTTAATACCGT  
 ATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGCGTTGGAT  
 TAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTT  
 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG  
 GAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCCTGATCTAGCCATG  
 CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGA  
 TAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC  
 GTAGGCGGACTGGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAC  
 TGCCTTCAAACTATCAGTCTGGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATACCGAG  
 TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGTGGAACACCAGTGGGCGAAGGCGG  
 CTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGG  
 TTGCATGCAATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCGCGCTGGGGAG  
 TACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG  
 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGA  
 CATCCCTGGACCGATCCGGAGACGGATCTTTCACTTCGGTGACCAGGTGACA  
 GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCG  
 GCAACGAGCGCAACCCACGTCCCTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTA  
 TGAAAACCTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTC  
 ATGGCCCTTACGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGG  
 TTAATCCCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGTCTCTGCAACTCGAGGGCAT

---

GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGACGGCCGTGCGCTAACCTTTTCGGAGGCAGCGGACCACGGTAGGATCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA-3'

**88/2-5 (1174 nt):** 5'-TGGCGGCACGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGCGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGCTTCGGAATAGCCTCGGAAACTGGGAGTAATACCGAATGTGCCCTTTGGGGGAAAGATTTATCGGC AAAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCTGCGATCAGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGCGCAAGCCTGATCTAGCGATGCCGCGTGAGTGACGAAGGCCTTAGGGTTCGTAAGCTCTTTTCGCCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTGAGGGGTTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGGATTAGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTCCAAACTACTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGACGTCAGGGGGCTTGCCCTTTGGTGTACACCTAACGGATT AAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTCTGACCGCCTAGGAGACTAGGTTTTATCGTAAGATACAGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGGGAAACTGCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATCTACAGTGAGTTAATCTCCAAAAGA-3'

**88/2-6 (1095 nt):** 5'-TGGCGGCACGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGCGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGCTTCGGAATAGCCTCGGAAACTGGGAGTAATACCGAATGTGCCCTTTGGGGGAAAGATTTATCGGC AAAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCTGCGATCAGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGCGCAAGCCTGATCTAGCGATGCCGCGTGAGTGACGAAGGCCTTAGGGTTCGTAAGCTCTTTTCGCCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGCTAGTCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGGATTAGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTCCAAACTACTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGG

---

AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGA  
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
ATGAATGCCAGACGTCAGGGGGCTTGCCCTTTGGTGTACACCTAACGGATT  
AAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAACTCAAAGGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGC  
AGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTCTGACCGCTAGGAGACTAGGTTTTAT  
CGTAAGATACAGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG  
AGATGTTCCGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCAT  
CATTTAGTTGGGCACTCTAGGGAAACTGCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTG  
TGGAT G-3'

**88/2-7 (1498 nt):** 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATG  
(Vollsequenz) CAAGTCGAGCGGAAACGATGGTAGCTTGCTACCAGGCGTCGAGCGGGCGGAC  
GGGTGAGTAATACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGGGGGATAGCACGGGGAAA  
CTCGTATTAATACCGCATAACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAGTTTACTGCT  
CTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCC  
TACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGG  
ACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
CAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTT  
GGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCTTCGGTTAATACCCGGAG  
ACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAG  
CGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAC  
TGCATCTGAAACTGTTAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGGAAGTAGAATTTAGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC  
TTCCTGGCATACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA  
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGGTC  
CCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGAGT  
ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGTCTTGAC  
ATATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTAGAATACAG  
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTCT  
AAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCA  
TCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGGTACAGAG  
GGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCAAAAAGCCTATCGTAGTCCAG  
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCGGA  
TCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCCGCCGTCAC  
ACCATGGGAGTTGATTGCACCAGAAGTGGATAGCTTAACCTTTGGGGAGGCG  
TTCACCACGGTGTGGTTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA-3'

## 6.5 Charakterisierung der Isolate aus dem äquatorialen Atlantik

**Tab. 6.7a:** Kolonie- und Zellmorphologie, Beweglichkeit, Gramfärbeverhalten, Enzymaktivität und taxonomische Einordnung (FISH) der Isolate aus 20 m Wassertiefe von der Station 7004-1 (M49/4). Wachstum auf/in ASN<sub>III</sub>-Agar/-Medium bei 27 °C für ein bis zwei Tage (wenn nicht anders angegeben).

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/ Schwärmagar)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Taxonomische Einordnung (FISH) <sup>a</sup>
	Form	Farbe	Rand/ Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)						
1a	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er.	1,17 ± 0,16 x 2,25 ± 1,08	taumeln, 1,6 cm (3 d)	-	+	-(6 d)	+(6 d)	γ
1b	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,23 ± 0,18 x 2,0 ± 0,48	taumeln, 1,3 cm (3 d)	-	+	-	+	γ
5a	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, Ketten	1,15 ± 0,15 x 1,92 ± 0,32 (max. 33)	+, 1,2 cm (3 d)	-	+	+	+	γ
5b	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er, runde Enden	1 x 1,45 ± 0,29 (4 d)	-	-	-	++ (4 d)	+(4 d)	α
6a1	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, auch lange, einzeln, 2er, runde Enden	1,08 ± 0,1 x 2,19 ± 0,38	+, 1,7 cm (3 d)	-	+	+	+	γ
6a2	kreisförmig, flach	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,74 ± 0,05 x 1,82 ± 0,46 (4 d)	+, 3-4 mm (6 d)	-	+	++	-	α
6b	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, meist einzeln, auch 2er	1,15 ± 0,15 x 2,04 ± 0,33 (max. 55)	taumeln, 2,4 cm (3 d)	-	+	-	+	γ
7a1	kreisförmig, flach	transparent, Zentrum milchig	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, Ketten (6er), runde Enden, Aggregate	0,85 ± 0,08 x 2,25 ± 0,62	+, 1,9 cm (3 d)	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
7a2	kreisförmig, flach	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,78 ± 0,29 x 1,64 ± 0,42 (3 d)	+, 3-4 mm (6 d)	-	+	++ (6 d)	-(6 d)	α
7b	kreisförmig, erhaben, evtl. knopfförmig	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er	1,08 ± 0,15 x 2,27 ± 0,98	taumeln, 2,3 cm (2 d)	-	+	+	+	γ
7c1	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, scheinen leicht gekrümmt, einzeln, 2er, 3er	1,06 ± 0,07 x 2,13 ± 0,67	+, 2,8 cm (2 d)	-	+	+	+	γ
7c2	kreisförmig, flach	Zentrum leicht milchig, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	0,95 ± 0,05 x 2,66 ± 1,36 (4 d)	+, 3 mm (2 d)	-	+	+	+	γ
8a	kreisförmig, konvex	gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, viele Aggregate	0,7 ± 0,09 x 1,52 ± 0,53 (4 d)	+, 1,5 mm (3 d)	-	+	++	-	α
8b	kreisförmig, erhaben, evtl. knopfförmig	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,18 ± 0,14 x 2,06 ± 0,28	+, 2,5 cm (3 d)	-	+	+	+	γ
8c	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er, einen 3er, runde Enden	1 x 1,5 ± 0,39 (4 d)	-	-	-	++	+	α
9	kreisförmig, erhaben	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Längen, runde Enden, sternförmige Aggregate	0,8 ± 0,07 x 1,97 ± 0,47 (3 d)	+, 2 mm (4 d)	-	+	++ (6 d)	+(6 d)	α
10a	kreisförmig, erhaben	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, sternförmige Aggregate	0,74 ± 0,28 x 1,71 ± 0,45 (4 d)	+, 6 mm (4 d)	-	+	+	+	α
10b	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	0,94 ± 0,08 x 1,81 ± 0,39 (4 d)	+, 1,8 cm (3 d)	-	+	++	+	γ

-, negativ oder unbeweglich; +, positiv oder beweglich; ++ (nur Katalase-Test), starke Sauerstoffbildung; tw., teilweise; versch., verschiedene; evtl., eventuell

<sup>a</sup> α, α-Proteobacteria; γ, γ-Proteobacteria

**Tab. 6.7b:** Kolonie- und Zellmorphologie, Beweglichkeit, Gramfärbverhalten, Enzymaktivität und taxonomische Einordnung (FISH) der Isolate aus 100 m Wassertiefe der Station 7004-1 (M49/4). Wachstum auf/in ASN<sub>III</sub>-Agar/-Medium bei 27 °C für ein bis zwei Tage (wenn nicht anders angegeben).

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit				Einordnung (FISH) <sup>a</sup>	
	Form	Farbe	Rand/ Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	(mikroskopisch/ Schwärmagar)	Gram	KOH	Katalase		Oxidase
1	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,29 ± 0,15 x 1,95 ± 0,28	taumeln, 8 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
2	kreisförmig, konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, meist einzeln, 2er	1,3 ± 0,26 x 1,87 ± 0,38	taumeln, 5 mm (15 d)	-	+	-	+	γ
3a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, meist einzeln, 2er	1,3 ± 0,17 x 1,98 ± 0,35	+, 11 mm (15 d)	-	+	-	+	γ
3b1a	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Diplokokken, auch einzeln, 3er, Tetraden, Ketten	1 ± 0,09 x 1,33 ± 0,21	-	+	-	++	-	LGC
3b1b	kreisförmig, erhaben	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen versch. Länge, einzeln, 2er, 3er, runde Enden, Aggregate	0,7 ± 0,12 x 1,94 ± 0,57	+, 3,5 mm (5 d)	-	-	++ (6 d)	+(6 d)	α
3b1c	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1,32 ± 0,16 x 2,11 ± 0,37	taumeln, 5 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
3b2a	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, auch längere, tw. „Einschlüsse“	0,89 ± 0,03 x 1,9 ± 0,26	+, 3,5 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
3b2b1	kreisförmig, erhaben	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln bis 4er Kette	0,59 ± 0,06 x 1,91 ± 0,32	+, 1,5 – 4 mm (5 d)	-	+	++	+	α
3b2b2	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Diplokokken, einzeln, 3er, Tetraden, Ketten	0,97 ± 0,12 x 1,12 ± 0,09	-	+	-	++	-	LGC
5a	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	kokkoide Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,38 ± 0,24 x 1,81 ± 0,28	taumeln, 4,5 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
5b1a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,27 ± 0,22 x 2,03 ± 0,17 (max. 1 x 15 u. 1,2 x 8)	taumeln, 2 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
5b2	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	1,22 ± 0,13 x 2 ± 0,4 (max. 1,1 x 10 u. 1,2 x 5)	+, 3,5 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
5b3a	kreisförmig, konvex	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,74 ± 0,07 x 1,84 ± 0,17	+, 1 – 3 mm (5 d)	-	+	++	+	α
5b3b	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Diplokokken, 3er, Tetraden, Ketten, Aggregate	1,03 ± 0,05 x 1,15 ± 0,07	-	+	-	++	-	LGC
5c1a	kreisförmig, erhaben	milchig-grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, leicht eiförmig	1,22 ± 0,12 x 2,07 ± 0,19	+, 3,5 mm (15 d)	-	+	-(6 d)	+(6 d)	γ
5c1b	kreisförmig, flach	transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, tw. „Einschlüsse“, meist einzeln, wenig 2er, 11er Kette, runde Enden, tw. leicht gebogen	1,01 ± 0,03 x 2,61 ± 0,83	+, 3,5 mm (15 d)	-	+	+	+	γ
5c2b	kreisförmig, erhaben	milchig grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er, tw. Sphäroblasten	1,21 ± 0,14 x 2,11 ± 0,19 (max. 1,1 x 22 u. 1,1 x 16)	+, 4,5 mm (15 d)	-	+	-(6 d)	+(6 d)	γ
5c2c	kreisförmig, konvex	gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, Aggregate, runde Enden, einzeln, 2er	0,75 ± 0,1 x 2,11 ± 0,54	+, 0,5 – 3 mm (5 d)	-	+	++	+	α

-, negativ oder unbeweglich; +, positiv oder beweglich; ++ (nur Katalase-Test), starke Sauerstoffbildung; tw., teilweise; versch., verschiedene; evtl., eventuell

<sup>a</sup> α, α-Proteobacteria; γ, γ-Proteobacteria; LGC, niedriger G+C-Gehalt

**Tab. 6.7c:** Kolonie- und Zellmorphologie, Beweglichkeit, Gramfärbverhalten, Enzymaktivität und taxonomische Einordnung (FISH) der Isolate aus 150 m Wassertiefe der Station 7004-1 (M49/4). Wachstum auf/in ASN<sub>III</sub>-Agar/-Medium bei 27 °C für ein bis zwei Tage (wenn nicht anders angegeben).

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärzagar)				Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH) <sup>a</sup>
1a1	kreisförmig, flach erhaben	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,29 ± 0,06 x 1,97 ± 0,35	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
1a2	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,74 ± 0,07 x 1,7 ± 0,29	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
1b	kreisförmig	milchig-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er	1,1 ± 0,07 x 1,95 ± 0,11	-	+	+	+	γ
2a	kreisförmig	milchig-grau	ganz / glatt, glänzend	kokkoide Stäbchen, einzeln, 2er	1,24 ± 0,12 x 1,91 ± 0,11	-	+	+	+	γ
2b2	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, 10er, Aggregate	0,24 ± 0,05 x 1,62 ± 0,55	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
2c1	kreisförmig, flach	milchig-grau bis beige	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	0,99 ± 0,03 x 1,64 ± 0,31	-	+	+	+	γ
2c2	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Ansammlungen dicke, tw. kokkoide Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, eine 16er-Kette, tw. eiförmig bis etwas spitzer zulaufend	0,4 ± 0,07 x 1,55 ± 0,37	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
2c3	kreisförmig, flach erhaben	milchig grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 1 lange Kette, sternförmige Aggregate	1,09 ± 0,06 x 1,64 ± 0,32	-	+	+	+	γ
3	kreisförmig, flach	gelblich-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 1 lange Kette, sternförmige Aggregate	0,42 ± 0,08 x 2,18 ± 0,58	-	- (4 d)	+ (4 d)	- (4 d)	α
4a1b	kreisförmig, erhaben	grau, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. helle Einschlüsse	0,97 ± 0,05 x 1,9 ± 0,17 (max. 1 x 4,5)	-	+	+ (3 d)	+ (3 d)	γ
4a1c	kreisförmig, flach	grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er-4er-Kette, sternförmige Aggregate, runde Enden	0,36 ± 0,07 x 2,21 ± 0,55	-	- (3 d)	++ (3 d)	- (3 d)	α
4a2a1	kreisförmig, flach	Zentrum weiß, Rand grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1 ± 0,07 x 1,92 ± 0,25	-	+	++	+	γ
4a2a2	kreisförmig, konvex	milchig-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,9 ± 0,11 x 1,73 ± 0,3 (max. 1 x 4)	-	-	+	+	α
4a2b	kreisförmig, erhaben	gelbgrün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, u. a. sternförmige Aggregate	0,42 ± 0,04 x 2,09 ± 0,49	-	-	+	+	α
4a2c	kreisförmig, flach, erhaben	Zentrum grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er; auch längere und „angeschwollene“	0,98 ± 0,04 x 1,86 ± 0,35	-	+	+ (3 d)	+ (3 d)	γ
4b	kreisförmig, flach	gelblich-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln; sternförmige Aggregate	0,46 ± 0,05 x 2,06 ± 0,43	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
4c1	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand (schmal) heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, u. a. sternförmige Aggregate	0,44 ± 0,05 x 1,73 ± 0,46	-	-	+	+	α
4c2	kreisförmig, konvex	milchig weiß/ grau, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht abgeflachte Enden, einzeln, 2er; helle Einschlüsse	0,93 ± 0,07 x 1,99 ± 0,21	-	- (12 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
4d1a	kreisförmig, erhaben	orange-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,57 ± 0,08 x 2,05 ± 0,49	-	- (3 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
4d1b	kreisförmig, flach	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,77 ± 0,05 x 1,89 ± 0,35	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
4d2a	kreisförmig, erhaben	Zentrum weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Sphäroblasten	0,93 ± 0,05 x 1,94 ± 0,24	-	+	+	+	γ
4d2b	kreisförmig, leicht erhaben	gelblich grün, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,38 ± 0,06 x 0,73 ± 0,2	-	- (4 d)	+ (4 d)	+ (4 d)	α
4d2d	kreisförmig, erhaben	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, sehr agil, einzeln, 2er, 3er, Aggregate dünnere Stäbchen, versch. Länge, tw. gestielt, tw. budding, einzeln, Aggregate, runde Enden, tw. zum Stiel hin spitzer zulaufend	0,42 ± 0,04 x 1,79 ± 0,22	-	- (3 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
5a	kreisförmig, konvex	weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln bis 4erKette	0,58 ± 0,1 x 1,47 ± 0,37	-	+	+ (3 d)	+ (3 d)	α
5b1	kreisförmig, flach	weiß, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er-4er-Kette, sternförmige Aggregate, runde Enden	0,91 ± 0,07 x 1,9 ± 0,4	-	+	++ (3 d)	+ (3 d)	γ
5b2	kreisförmig, konvex	grünlich, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er-4er-Kette, sternförmige Aggregate, runde Enden	0,31 ± 0,03 x 2,18 ± 0,52	-	- (3 d)	++ (3 d)	+ (3 d)	α
5c	kreisförmig, konvex	grünlich, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er-4erKette, sternförmige Aggregate, runde Enden	0,53 ± 0,07 x 2,21 ± 0,42	-	- (3 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
6a1	kreisförmig, konvex	Zentrum milchig grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-4er Kette	1,04 ± 0,05 x 2,16 ± 0,44	-	+	++	+	γ
6a2	kreisförmig, erhaben	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,56 ± 0,08 x 2,36 ± 0,38	-	-	++	+	α
6b1a1	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, größere Aggregate	0,54 ± 0,05 x 1,6 ± 0,42	-	- (3 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
6b1a2	kreisförmig, konvex	weiß-grau; Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, tw. Einschlüsse	0,84 ± 0,05 x 2,21 ± 0,27	-	- (3 d)	+ (3 d)	+ (3 d)	α
6b1b	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er-4erKette, sternförmige Aggregate, runde Enden	0,26 ± 0,05 x 2,32 ± 0,39	-	- (3 d)	++ (3 d)	+ (3 d)	α
6b2b1	kreisförmig	gelblich grün, Rand transparent	glatt/ glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, einzeln, runde Enden, u.a. sternförmige Aggregate	0,38 ± 0,04 x 1,84 ± 0,35	-	-	+	+	α
6b2b2	kreisförmig, erhaben	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, etwas dicker, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,5 ± 0,08 x 1,68 ± 0,35	-	+	+	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
6b2b3	kreisförmig, konvex	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,73 ± 0,06 x 1,94 ± 0,47	-	-	+	+	α
6c1	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, breiter transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, selten 2er o. 3er, kleine Aggregate	0,31 ± 0,07 x 1,94 ± 0,2	-	-	+	+	α
6c2	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,88 ± 0,04 x 1,89 ± 0,2	-	-	+	+	α
6d1a	kreisförmig, konvex	gelblich grün, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,37 ± 0,05 x 1,64 ± 0,3 (max. 0,6 x 6)	-	-	++	+	α
6d1b	kreisförmig, konvex (leicht knopfförmig)	milchig grau	ganz / glatt, glänzend; konzentrisch	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, 2er über „Steg“ verbunden	0,75 ± 0,07 x 1,87 ± 0,51	-	-	+	+	α
6d2a	kreisförmig, erhaben	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,36 ± 0,05 x 1,83 ± 0,39	-	-	+	+	α
6d2b	kreisförmig, konvex	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, runde Enden, 2er, u. a. sternförmige Aggregate	0,77 ± 0,07 x 1,78 ± 0,24	-	-	+	+	α
7a1	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,85 ± 0,05 x 2,04 ± 0,31	-	-	+	+	γ
7a2	kreisförmig, flach	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, helle „Einschlüsse“, Aggregate	0,7 ± 0,11 x 1,9 ± 0,38	-	+	+	+	γ
7b1	kreisförmig, erhaben	milchig grau; Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln bis 4erKette, häufig Ketten, runde Enden	0,93 ± 0,05 x 2,07 ± 0,39	-	+	++	+	γ
7b2	kreisförmig, erhaben	Zentrum gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Ketten, Aggregate	0,7 ± 0,12 x 1,67 ± 0,59	-	-	+	+	α
7c	kreisförmig, konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er.	1,05 ± 0,07 x 1,84 ± 0,34 (max. 1 x 4,8)	-	+	+	+	γ
7d1	kreisförmig, erhaben	beige, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,89 ± 0,03 x 2,01 ± 0,26	-	+	+	+	γ
7d2	kreisförmig, flach erhaben	grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,9 x 2,07 ± 0,32	-	+	+	+	γ
8	kreisförmig, konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen	1,06 ± 0,05 x 1,89 ± 0,13	-	+	+	+	γ
9a	kreisförmig, flach	Zentrum milchig-grau, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, Sphäroblasten	1,05 ± 0,05 x 1,93 ± 0,18 (max. 1 x 5,2-8)	-	+	+	+	γ
9b1a	kreisförmig, erhaben	milchig-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,78 ± 0,06 x 2,08 ± 0,28	-	-	+	+	α
9b1b	kreisförmig, flach, leicht erhaben	mattegrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, daran tw. auch sehr lange	0,28 ± 0,06 x 2,18 ± 0,51	-	-	+	+	α
9b2b	kreisförmig, konvex (sehr klein)	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, daran auch sehr lange	0,75 ± 0,05 x 1,84 ± 0,18	-	-	+	+	α
9c	kreisförmig, konvex	milchig-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er, Sphäroblasten	1,04 ± 0,07 x 2,01 ± 0,19 (max. 0,9-1,1 x 6-19)	-	+	-	+	γ
9c2	kreisförmig, erhaben	schwach grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,47 ± 0,07 x 2,23 ± 0,42 (max. 0,6 x 15)	-	-	++	+	α
10a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	0,93 ± 0,07 x 1,83 ± 0,25	-	+	+	+	γ
10b1	kreisförmig, flach erhaben	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. hellere Bereiche	0,68 ± 0,09 x 1,47 ± 0,25	-	+	+	+	α
10b2	kreisförmig, flach	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,38 ± 0,08 x 1,72 ± 0,29	-	-	+	+	α
11a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, Sphäroblasten	1,08 ± 0,06 x 1,99 ± 0,13	-	+	-	+	γ
11b1	kreisförmig, konvex	Zentrum milchig-grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, eiförmig, einzeln, 2er	1,05 ± 0,07 x 2,07 ± 0,39	-	-	+	+	γ
11b2	kreisförmig, konvex	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, Aggregate	0,41 ± 0,07 x 1,75 ± 0,29	-	+	+	-	α
11c1	kreisförmig, flach	milchig, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, helle „Einschlüsse“ terminal oder zentral	0,77 ± 0,05 x 1,6 ± 0,3	-	+	+	+	γ
11c2	kreisförmig, erhaben bis knopfförmig	milchig-grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,76 ± 0,05 x 1,93 ± 0,38	-	-	+	+	α
13a1	kreisförmig, konvex	(grün)gelb orange-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, „Einschlüsse“, einzeln, 2er, Aggregate	0,42 ± 0,08 x 1,44 ± 0,3 (max. 0,5 x 6,5)	-	-	+	+	α
13a2	kreisförmig, konvex	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, tw. sternförmig	0,41 ± 0,06 x 1,66 ± 0,42	-	-	+	+	α
13b	kreisförmig, konvex	mattegrün (blaugrün)	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, u. a. sternförmige Aggregate	0,22 ± 0,04 x 1,97 ± 0,34	-	-	++	+	α
14a1	kreisförmig, konvex	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, daran tw. sehr lange	0,72 ± 0,09 x 1,82 ± 0,12	-	-	+	+	α
14a2	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate	0,31 ± 0,07 x 1,96 ± 0,29	-	-	+	+	α
14b1a	kreisförmig, erhaben (sehr klein)	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln	0,24 ± 0,07 x 2,09 ± 0,51 0,68 ± 0,12 x 2,27 ± 1,5	-	-	+	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
14b2	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, u. a. sternförmige Aggregate	0,37 ± 0,05 x 1,6 ± 0,31	-	+	+	+	α
14c1	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,36 ± 0,05 x 1,88 ± 0,4	-	-	+	+	α
14c2a	kreisförmig, erhaben	gelbgrün, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, u. a. sternförmige Aggregate	0,44 ± 0,05 x 1,85 ± 0,4	-	-	++ (3 d)	+	α
14c2b	kreisförmig, erhaben	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,81 ± 0,06 x 1,78 ± 0,18	-	-	+	+	α
14c3	kreisförmig, flach	Zentrum weiß, Rand eher grau	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,94 ± 0,05 x 1,91 ± 0,38	-	+	+	+	γ
14d1a	kreisförmig, flach, leicht erhaben	weiß-grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,87 ± 0,05 x 1,79 ± 0,14	-	-	+	+	α
14d1b	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,33 ± 0,05 x 2,16 ± 0,38	-	-	+	+	α
15a1a	kreisförmig, erhaben; vorher trüber Agar ist um Impfstriche klar	Zentrum milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln bis 4er, tw. helle „Einschlüsse“ kleinere Aggregate	0,82 ± 0,06 x 1,78 ± 0,31	-	+	+	+	γ
15a2a	kreisförmig, flach, leicht knopfförmig	transparent, Zentrum gelblich	ganz / glatt, glänzend	dünne tw. sehr lange Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	0,23 ± 0,05 x 5,38 ± 4,14	-	+	+	+	CF
15a2b	kreisförmig, erhaben	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eine Seite oder beide spitz zulaufend, einzeln, 2er, 3er, kleine Aggregate	0,94 ± 0,07 x 1,74 ± 0,18	-	-	+	+	α
15b1	kreisförmig, flach	transparent grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, versch. Länge, mit „Einschlüssen“, einzeln, 2er, Aggregate, auch: „Negativbakterien = nahezu durchsichtig und „Einschlüsse“ dunkel dickere Stäbchen, versch. Länge/Dicke	0,83 ± 0,08 x 1,8 ± 0,36	-	+	+	+	γ
15b2a1	kreisförmig, erhaben	Rand transparent, Zentrum weiß	ganz / glatt, glänzend	runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er, 6er-Kette	0,96 ± 0,05 x 1,9 ± 0,23	-	+	+	+	γ
15b2a2	kreisförmig, flach	Zentrum weiß, Rand eher grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, runde Enden, mit „Einschlüssen“, einzeln, Aggregate	0,92 ± 0,06 x 1,8 ± 0,38	-	+	+	+	γ
15b2b1	kreisförmig, flach	gelblich grün, transparenter Hof	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, Kette, Aggregate, runde Enden	0,46 ± 0,05 x 2,02 ± 0,49	-	+	+	+	α
15b2b2	kreisförmig, flach	Rand transparent, Zentrum weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln 2er, 3er	0,93 ± 0,07 x 1,77 ± 0,5	-	+	+	+	γ
16a1a	kreisförmig, flach	Zentrum beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,89 ± 0,03 x 1,9 ± 0,33	-	-	+	+	γ
16a1b	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,82 ± 0,04 x 1,75 ± 0,18	-	-	+	+	α
16b	kreisförmig, konvex	Zentrum gelblich, weißer Rand	ganz / glänzend, körnig	dickere längere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. in Paketen	0,87 ± 0,08 x 3,26 ± 0,85	-	+	+	-	HGC
17a	kreisförmig, konvex	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, tw. „Einschlüsse“	0,84 ± 0,1 x 1,78 ± 0,23	-	+	+	+	γ
17b	kreisförmig, konvex	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, ein 5er, tw. Aggregate	0,87 ± 0,05 x 1,74 ± 0,35	-	+	+	+	γ
18	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,41 ± 0,03 x 1,97 ± 0,3 (max. 0,7 x 6,5)	-	+	++ (5 d)	+	α
19a1a	kreisförmig, erhaben	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,53 ± 0,07 x 1,99 ± 0,49	-	+	++ (5 d)	+	α
19a1b	kreisförmig, erhaben	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleinere Aggregate	0,4 ± 0,05 x 1,88 ± 0,4	-	+	++ (5 d)	+	α
19a1c1	kreisförmig, konvex (fast knopfförmig)	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. helle „Einschlüsse“, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,77 ± 0,07 x 2,15 ± 0,42	-	-	+	+	α
19a1c2	kreisförmig, erhaben	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,53 ± 0,07 x 1,62 ± 0,44	-	+	++	+	α
19a2	kreisförmig, erhaben	grünlich-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,43 ± 0,05 x 1,65 ± 0,41	-	-	++ (3 d)	+	α
19b1	kreisförmig, flach	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, helle „Einschlüsse“, Aggregate	0,75 ± 0,07 x 1,58 ± 0,36 (max. 0,9x 6,2)	-	+	+	+	γ
19b2	kreisförmig, konvex	orange-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,4 ± 0,07 x 1,92 ± 0,64	-	+	+	+	α
19b3	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, daran tw. sehr lange	0,22 ± 0,04 x 2,6 ± 1,01	-	-	+	+	α
20a	kreisförmig, konvex	grün-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,43 ± 0,05 x 1,49 ± 0,36	-	+	++ (5 d)	+	α
20b1	kreisförmig, flach	mattgrün, heller Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, meist einzeln, 3er, Aggregate	0,21 ± 0,03 x 1,61 ± 0,34	-	-	+	+	α
20b2	kreisförmig, leicht erhaben	gelb-oranger	ganz / glatt, glänzend	ältere Kultur, ca. 6 d, Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,51 ± 0,06 x 1,95 ± 0,19	-	-	+	+	α
21a	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,48 ± 0,04 x 1,85 ± 0,23 0,2 x 1,65 ± 0,39	-	-	++ (3 d)	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Koloniemorphologie			Zellmorphologie			Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
Isolat	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
21b1	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. mit „Einschlüssen“, 2er-8er-Kette, über „Stege“ verbunden, Aggregate	$0,98 \pm 0,04 \times 2,03 \pm 0,38$	-	+	++	+	γ
21b2	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, 1er, Aggregate	$0,58 \pm 0,06 \times 1,92 \pm 0,79$	-	+	++	+	α
21c1	kreisförmig, erhaben	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, tw. „Einschlüsse“	$0,43 \pm 0,13 \times 1,83 \pm 0,41$	-	+	++ (5 d)	+	α
22a1	kreisförmig, konvex	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er	$1,09 \pm 0,03 \times 1,82 \pm 0,15$	-	+	+	+	γ
22a2	kreisförmig, erhaben	grün-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	$0,44 \pm 0,05 \times 1,91 \pm 0,17$	-	+	++ (6 d)	+(6 d)	α
22b	kreisförmig, flach	Zentrum milchig, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er, 4er	$1,1 \pm 0,05 \times 1,91 \pm 0,12$ (max. 1 x 6,5)	-	+	+	+	γ
22c	kreisförmig, flach	Zentrum milchig, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er, ein 4er	$1,06 \pm 0,05 \times 1,92 \pm 0,1$	-	+	+	+	γ
23a1	„kreisförmig“ = unruhig, flach	transparent	gewellt, unruhig/pickelig	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, 2er, Kette, helle „Einschlüsse“	$0,82 \pm 0,11 \times 1,9 \pm 0,34$	-	+	+	+	γ
23a2a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, Enden tw. spitz zulaufend, einzeln, 2er, bis 12er, Aggregate	$0,9 \pm 0,05 \times 1,75 \pm 0,25$	-	-	+	+	α
23a3	kreisförmig, erhaben	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde bis spitze Enden, einzeln, Aggregate	$0,5 \pm 0,08 \times 2,11 \pm 0,48$	-	+	+	+	α
23b1	kreisförmig, flach	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, sehr agil, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	$0,48 \pm 0,04 \times 2,2 \pm 0,49$ (max. 0,7 x 5,9)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
23b2	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde-spitze Enden, einzeln, 2er	$0,48 \pm 0,04 \times 2,16 \pm 0,37$	-	+	+	+	α
23c	kreisförmig, flach	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	$0,98 \pm 0,04 \times 1,7 \pm 0,31$	-	+	-(6 d)	+(6 d)	γ
23d1	kreisförmig, konvex	milchig grau (klarer)	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. „Einschlüsse“	$0,84 \pm 0,07 \times 1,77 \pm 0,33$	-	+	+(6 d)	+	γ
23d2	kreisförmig, konvex	milchig grau (milchiger)	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	$1,12 \pm 0,06 \times 1,8 \pm 0,27$	-	+	-(6 d)	+	γ
24a1	kreisförmig, flach	rosa-transparent, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	Kurzstäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. eiförmig	$0,87 \pm 0,05 \times 1,29 \pm 0,37$	-	+	+	+	γ
24a2	kreisförmig, flach erhaben	weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	$0,84 \pm 0,05 \times 1,74 \pm 0,25$	-	-	+	+	α
24b1a	kreisförmig, konvex	weiß, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	gestielte Bakterien, einzeln, Aggregate, tw. zum Stiel hin etwas schmaler werdend, tw. budding über Hyphe	$0,57 \pm 0,07 \times 1,76 \pm 0,2$	-	+	+(5 d)	+	α
24b1b	kreisförmig, konvex	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	$0,41 \pm 0,07 \times 1,58 \pm 0,41$	-	-	++ (5 d)	+	α
24b1c1	kreisförmig, konvex	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, daran tw. längere und dickere; Gram: Zellen häufig leicht gekrümmt	$0,33 \pm 0,08 \times 1,76 \pm 0,32$	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
24b1c2	kreisförmig, flach	Zentrum: beige-bräunlich, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	$0,91 \pm 0,06 \times 1,52 \pm 0,36$ (max. 0,7 x 11,2)	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
24b2a	kreisförmig, konvex	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	$0,32 \pm 0,04 \times 1,66 \pm 0,49$	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
24c	kreisförmig, erhaben	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, tw. erst vibrioformig, sehr agil, versch. Länge, Enden rund bis spitz, einzeln, Aggregate	$0,48 \pm 0,04 \times 2,54 \pm 0,77$	-	+	+	+	α
25a1	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, eine 8er-Kette aus längeren Zellen, wenig Aggregate	$0,25 \pm 0,05 \times 2,26 \pm 0,54$	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
25a2	kreisförmig, konvex	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleinere Aggregate	$0,41 \pm 0,6 \times 1,75 \pm 0,5$	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
25b1	kreisförmig, flach erhaben	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	$0,17 \pm 0,05 \times 2,09 \pm 0,39$	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
25b2	kreisförmig, flach	beige, Zentrum trüb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, oft zentral (o. terminal) helle „Einschlüsse“	$0,85 \pm 0,05 \times 1,59 \pm 0,3$	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
25c1	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, tw. mit „Einschlüssen“, runde Enden, einzeln, 2er, versch. Länge	$0,82 \pm 0,09 \times 2,03 \pm 0,85$ (max. 0,8 x 10,6)	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
25c2	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	$1 \times 1,56 \pm 0,28$	-	+	-(6 d)	+(6 d)	γ
26	kreisförmig, leicht erhaben	milchig weiß, Zentrum dichter	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	$0,82 \pm 0,06 \times 1,95 \pm 0,33$	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
27a	kreisförmig, flach	grau transparent	gewellt / matt-glänzend, Vertiefungen	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-8er-Kette, „Einschlüsse“, tw. leicht gekrümmt	$0,7 \pm 0,22 \times 2,26 \pm 0,62$ $0,84 \pm 0,07 \times 2,02 \pm 0,23$	-	+	+(5 d)	+	γ
27b	kreisförmig, flach	beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, tw. etwas eiförmig, runde Enden, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	$0,9 \pm 0,05 \times 1,93 \pm 0,47$	-	+	+	+	γ
28a	kreisförmig, konvex	grünelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	$0,79 \pm 0,03 \times 2,12 \pm 0,35$	-	-	++ (4 d)	+(4 d)	α
28b1	kreisförmig, konvex	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, tw. mit Stiel, einzeln, große Aggregate	$0,66 \pm 0,14 \times 1,34 \pm 0,33$	-	+	+(3 d)	+(3 d)	α
28c1	kreisförmig, konvex	grün-gelb	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	$0,31 \pm 0,07 \times 2,16 \pm 0,53$	-	-	++ (3 d)	+(3 d)	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Koloniemorphologie			Zellmorphologie			Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
Isolat	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
28c2	kreisförmig, konvex, knopflähnlich	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,73 ± 0,08 x 1,66 ± 0,2	-	-	+ (5 d)	+	α
29a	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,44 ± 0,05 x 1,27 ± 0,25 0,6 ± 0,16 x 1,59 ± 0,24	-	+	++ (5 d)	+	α
30a	kreisförmig, flach	grünlich	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,47 ± 0,08 x 1,61 ± 0,26	-	-	++ (4 d)	+(4 d)	α
30b1a	kreisförmig, konvex	mattgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,28 ± 0,04 x 1,66 ± 0,37	-	-	+	+	α
30b1b	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,79 ± 0,06 x 1,88 ± 0,26	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
30b2b	kreisförmig, erhaben bis konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,77 ± 0,08 x 1,8 ± 0,34	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
31a	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, mit „Einschlüssen“, Sphäroblasten	0,88 ± 0,04 x 1,63 ± 0,36	-	+	+	+	γ
31b1a	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 4er-Kette, „Einschlüsse“ zentral oder terminal	0,89 ± 0,07 x 1,96 ± 0,42 (max. 0,9 x 5 und 0,8 x >12)	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
31b1b	kreisförmig, konvex (knopflähnlich)	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, sehr viele sternförmige Aggregate	0,77 ± 0,07 x 2,04 ± 0,28	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
31b2a	kreisförmig, flach erhaben	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,31 ± 0,06 x 1,95 ± 0,57	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
31b2b	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde - spitze Enden, einzeln, 2er, Aggregate (klein)	0,47 ± 0,05 x 2,15 ± 0,39	-	+	+(4 d)	+(4 d)	α
31b3a1	kreisförmig, flach	beige	ganz / glatt, glänzend	kurze Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, viel „Einschlüsse“	0,86 ± 0,08 x 1,68 ± 0,37	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
31b3a2	kreisförmig, flach	weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, evtl. leicht spitz, einzeln	0,51 ± 0,03 x 2,3 ± 0,35	-	+	+	+	α
31b3b1	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, evtl. leicht spitz, einzeln	0,47 ± 0,07 x 2,58 ± 0,5	-	+	+	+	α
31b3b2	kreisförmig, konvex	weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, 2er: über „Steg“ verbunden	0,85 ± 0,05 x 1,68 ± 0,23	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
31b3b3	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate, tw. sternförmig	0,35 ± 0,05 x 2,25 ± 0,56	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
31c	kreisförmig, erhaben	milchig beige, fast transparent	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, runde Enden, versch. Länge, einzeln, Aggregate	0,53 ± 0,05 x 2,6 ± 0,55	-	+	+	+	α
32	kreisförmig, konvex	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, meist sternförmige Aggregate	0,34 ± 0,05 x 1,64 ± 0,28	-	-	++ (3 d)	+(3 d)	α
34a	kreisförmig, erhaben	grün-blau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,5 ± 0,07 x 2,01 ± 0,28	-	-	++ (4 d)	+(4 d)	α
34b1a	kreisförmig, konvex	gelb-oranger, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,5 ± 0,09 x 1,83 ± 0,22	-	-	++ (3 d)	+(3 d)	α
34b1b	kreisförmig oder flächig, flach	transparent-grau	gewellt / körnig	längere dickere Stäbchen, versch. Länge, runde, tw. spitze Enden, tw. gekrümmt wie Spirillen, einzeln, 2er-5er-Kette, tw. „Einschlüsse“	0,89 ± 0,07 x 2,22 ± 0,54	-	-	+(3 d)	+(3 d)	γ
34b2	kreisförmig-flächig, flach	transparent	ganz-gewellt / glatt, picke-lig glänzend	lange Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, 2er-7er-Kette, tw. helle „Einschlüsse“	0,86 ± 0,05 x 2,56 ± 0,79	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
34c1a1	kreisförmig, konvex	gelb-grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate	0,38 ± 0,06 x 1,97 ± 0,43	-	-	++ (3 d)	+(3 d)	α
34c1a2	kreisförmig, flächig	transparent, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,79 ± 0,1 x 1,94 ± 0,51	-	+	+	+	γ
34c1b1	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate (daran tw. sehr lange, tw. mit hellen „Einschlüssen“)	0,3 ± 0,05 x 1,73 ± 0,29	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
34c1b2	flächig, flach	Zentrum grau, Rand transparent und breit	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,76 ± 0,12 x 1,76 ± 0,25	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
34c1c	kreisförmig, erhaben	grün-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,36 ± 0,05 x 1,75 ± 0,3	-	-	++ (3 d)	+(3 d)	α
34c2	kreisförmig, erhaben	grau bis milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. eiförmig	1 x 1,78 ± 0,3	-	+	+	+	γ
35	kreisförmig, erhaben	grünlich-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,44 ± 0,08 x 1,65 ± 0,43	-	-	++ (4 d)	+(4 d)	α
36	kreisförmig	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. mit „Einschlüssen“, Sphäroblasten	0,98 ± 0,06 x 1,88 ± 0,37 (max. 1 x 5,6)	-	+	+	+	γ
37a	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, sehr versch. Länge (pleomorph), runde Enden, tw. leicht gekrümmt, Sphäroblasten	1,19 ± 0,19 x 8,72 ± 9,12	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
37b1	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	1 x 2,05 ± 0,59	-	-	+	+	α
37b2	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,6 ± 0,13 x 2,63 ± 1,66	-	-	++	-	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
38a	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, auch extrem lange (pleomorph), runde Enden, einzeln, 2er, Ketten, Sphäroblasten	0,99 ± 0,03 x 9,06 ± 11,84	-	+	+	+	γ
38b1	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Ketten, Sphäroblasten	0,92 ± 0,06 x 1,99 ± 0,17 (max. 0,9 x 8)	-	+	+	+	γ
38b2	kreisförmig, erhaben	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,5 ± 0,07 x 1,51 ± 0,37	-	+	++ (6 d)	+(6 d)	α
38c1a	kreisförmig, flach	grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen und tw. nur leicht gekrümmte o. gerade Stäbchen, versch. Länge, runde bis spitze Enden, einzeln, tw. helle „Einschlüsse“	0,66 ± 0,05 x 1,78 ± 0,5	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
38c1b	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,39 ± 0,06 x 1,61 ± 0,3	-	+	+(4 d)	+(4 d)	α
40a1	kreisförmig, flach	mattgrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 3er (Reihe und sternförmig), 7er (Reihe), kleine Aggregate, daran tw. sehr lange	0,25 ± 0,05 x 1,9 ± 0,42 (max. 0,3 x >14)	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
40a2	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 4er, kleine Aggregate	0,22 ± 0,04 x 2,03 ± 0,62	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
40a3	kreisförmig, erhaben	milchig weiß, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,9 ± 0,05 x 1,84 ± 0,14	-	-	+	+	α
40b	kreisförmig, (klein)	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	kürzere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleinere Aggregate	0,38 ± 0,04 x 1,5 ± 0,25	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
40c1a	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,22 ± 0,04 x 1,68 ± 0,37	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
40c1b	kreisförmig, konvex	orange-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	0,57 ± 0,07 x 2,05 ± 0,3	-	-	+	+	α
40c1c	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,76 ± 0,05 x 1,96 ± 0,45	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
41a1	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, tw. „Einschlüsse“, einzeln bis 5er Kette	1 ± 0,07 x 1,92 ± 0,16	-	+	+	+	γ
41a2	kreisförmig, flach	milchig beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-4erKette, Sphäroblasten	1,04 ± 0,07 x 2,15 ± 0,44	-	+	++	+	γ
41b1	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	0,89 ± 0,03 x 1,97 ± 0,44	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
41b2	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen mit „Einschlüssen“, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,89 ± 0,06 x 2,14 ± 0,3	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
42	kreisförmig	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, wenige sternförmige Aggregate	0,31 ± 0,03 x 1,79 ± 0,24	-	+	+	+	α
43a1	kreisförmig	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,88 ± 0,06 x 2,12 ± 0,34	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
43a2	kreisförmig, erhaben	bläulich weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, sehr agil!, 1 „Korkenzieher“, auf Agar viele leicht gekrümmt	0,57 ± 0,08 x 1,14 ± 0,38	-	+	+(6 d)	+(6 d)	γ
43b1	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, tw. „Einschlüsse“, runde Enden, einzeln, 2er	0,95 ± 0,05 x 1,69 ± 0,43	-	+	+	+	γ
43b2	kreisförmig, flach	bläulich (Bino), sonst transparent	ganz / glatt, glänzend	sehr kleine, leicht gekrümmte Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,42 ± 0,11 x 1,26 ± 0,46	-	+	+	+	γ
44a1a1	kreisförmig, konvex	weiß, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, tw. mit Stiel, runde Enden, zum Stiel hin etwas schmaler, einzeln, tw. budding	0,59 ± 0,11 x 1,43 ± 0,33	-	+	+	+	α
44a1a2	kreisförmig, flach	Zentrum: beige-bräunlich, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	0,93 ± 0,05 x 1,47 ± 0,36	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
44a1b	kreisförmig, konvex	mattgrün, Zentrum trüber, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. Ketten, Aggregate	0,29 ± 0,03 x 1,61 ± 0,35	-	+	+	+	α
44a2	kreisförmig, flach	Zentrum milchig graubraun, Rand transparent; an Impföse rötlich	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, selten 2er	0,85 ± 0,05 x 1,58 ± 0,3	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
44b1	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, wenig kleine Aggregate	0,37 ± 0,05 x 1,78 ± 0,47	-	-	+	+	α
44b2a1	kreisförmig, erhaben	mattgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,3 ± 0,05 x 2,06 ± 0,42	-	-	+	+	α
44b2a2	kreisförmig, flach	transparent-grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln	0,91 ± 0,03 x 1,59 ± 0,27	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
44b2b1	kreisförmig, erhaben	mattgrün, Rand transparent	glatt / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, daran tw. sehr lange, tw. helle „Einschlüsse“	0,34 ± 0,05 x 2,04 ± 0,36	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
44b2b2	kreisförmig, konvex	Zentrum weiß, breiter transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend; evtl. Gruppen, wirkt gepunktet	Stäbchen, versch. Länge, ein rundes Ende, ein spitzer zulaufendes, dort häufig Stiel, einzeln, budding, Aggregate	0,51 ± 0,12 x 1,63 ± 0,26	-	+	+(3 d)	+(3 d)	α
44b3	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, meist einzeln, 2er, kleine bis mittlere Aggregate	0,36 ± 0,05 x 1,57 ± 0,45	-	-	+	+	α
44c1a	kreisförmig, erhaben	mattgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden einzeln, Aggregate	0,31 ± 0,06 x 1,83 ± 0,35	-	+	+	+	α
44c1b	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	kürzere Stäbchen, ein Ende rund, anderes spitzer zulaufend, gestielte unbeweglich, einzeln, tw. budding, Aggregate	0,62 ± 0,12 x 1,43 ± 0,27	-	+	+	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)					Taxonomische		
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*			
44c2	kreisförmig, flach	grau, Zentrum trüber, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,87 ± 0,05 x 1,64 ± 0,26	+	3,1 cm (4 d)	-	+	+	+	γ	
44d	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, sehr versch. Längen, runde Enden, einzeln, 2er	0,88 ± 0,04 x 1,76 ± 0,21	+	1,5 mm (1 d)	-	-	+	+	+	γ
44d3	kreisförmig, erhaben o. konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,8 x 1,99 ± 0,35	+	2 mm (12 d)	-	-	+	+	+	α
44e1a	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, lange oft an Aggregaten, wenige mit hellen „Einschlüssen“	0,19 ± 0,06 x 1,63 ± 0,37	+	1 mm (3 d)	-	-	+	+	+	α
44e1b	kreisförmig, flach	grau, Zentrum trüber, leicht rosa	ganz, leicht gewellt / glatt, glänzend	dickere Kurzstäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht eiförmig, einzeln.	0,82 ± 0,04 x 1,57 ± 0,25	taumeln, bis 2 mm (5 d)	-	+	+	+	+	γ	
44e1c	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, tw. kokkoid, tw. länger, runde Enden, einzeln, 2er-5er-Kette, lange mit hellen „Einschlüssen“	0,77 ± 0,05 x 1,46 ± 0,25	+	1,5 mm (3 d)	-	-	+	+	+	α
44e2a	kreisförmig, flach	mattdrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, daran auch längere	0,31 ± 0,03 x 1,92 ± 0,53	+	ca. 1,5 mm (1 d)	-	-	+	+	+	α
44e2b	kreisförmig, flach erhaben	grau, Zentrum trüber, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge/ Dicke, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, tw. aufgequollene	1,03 ± 0,05 x 1,68 ± 0,34	taumeln, 9 mm (1 d)	-	+	+	-	-	γ	
44e2c	kreisförmig, konvex	Zentrum weiß, breiter transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend; evtl. Gruben, wirkt gepunktet	Stäbchen, versch. Länge, ein rundes Ende, ein spitzer zulaufendes, dort häufig Stiel, einzeln, budding, Aggregate	0,67 ± 0,11 x 1,51 ± 0,34	+	bis 2 mm (1 d)	-	+	+	+	+	α
45a	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,33 ± 0,05 x 1,9 ± 0,56	+	3,5-4 mm (4 d)	-	-	+	+	+	α
45b1	kreisförmig, erhaben	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, auch ganz langes	1,1 ± 0,05 x 1,81 ± 0,3	taumeln, 4 mm (5 d)	-	+	-	-	+	+	γ
45b2	kreisförmig, konvex	milchig weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, wenig Aggregate	0,99 ± 0,03 x 1,68 ± 0,32	-	(14 d)	-	-	+	+	α	
45c	kreisförmig, flach erhaben	milchig grau-weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, einzeln, 2er	1,02 ± 0,04 x 1,89 ± 0,24	+	1,3 cm (6 d)	-	+	+	+	γ	
45d1	kreisförmig, konvex	milchig weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, tw. eine Seite etwas angeschwollen, runde Enden, versch. Länge, einzeln, selten Aggregate	0,69 ± 0,05 x 1,81 ± 0,19	taumeln; bis 1,5 mm (14 d)	-	-	+	+	+	α	
46a	kreisförmig, konvex	grüngelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,38 ± 0,06 x 2,09 ± 0,44	+	3,5 mm (4 d)	-	-	+	+	+	α
46b	kreisförmig, flach	milchig grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er, lange Kette (>20), Sphäroblasten	1,14 ± 0,05 x 1,77 ± 0,33	+	ca. 3,5 mm (8 d)	-	+	+	+	γ	
46c1a1	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. eiförmig, 2er, tw. „Einschlüsse“	0,89 ± 0,03 x 1,59 ± 0,3	taumeln; 1-1,5 mm (14 d)	-	-	+	+	+	α	
46c1a2	kreisförmig, konvex	beige, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,89 ± 0,07 x 1,53 ± 0,33	taumeln, 2,5 mm (2 d)	-	-	++	+	+	α	
46c1b	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. eiförmig, selten 2er	1,17 ± 0,13 x 1,97 ± 0,27 (max. 1 x >12)	+	3,5-4 mm (7 d)	-	+	+	+	γ	
46c2	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke, kürzere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,97 ± 0,07 x 1,33 ± 0,23	taumeln, bis 4 mm (2 d)	-	-	++	+	+	α	
47a1	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-9er-Kette, viele Ketten, kleinere Aggregate	0,89 ± 0,06 x 1,87 ± 0,28	+	8 mm (10 d)	-	-	+	+	γ	
47a2a	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,39 ± 0,07 x 1,99 ± 0,56	+	1 mm (18 d)	-	-	+	+	+	α
47a2b1	kreisförmig, erhaben	grau-transparent	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde-spitze Enden, einzeln, Aggregate	0,43 ± 0,05 x 2,38 ± 0,45	+	1,7 cm (7 d)	-	+	+	+	α	
47b	kreisförmig, konvex	gelbgrün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,39 ± 0,06 x 1,81 ± 0,6	+	2,5 mm (3 d)	-	-	+	+	α	
47c1	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1,09 ± 0,07 x 1,87 ± 0,22 (max. 1 x >22)	taumeln, 4,5 mm (7 d)	-	+	+	+	+	γ	
47c2	kreisförmig, erhaben	gelb-grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,5 ± 0,08 x 1,58 ± 0,45	+	bis 2 mm (1 d)	-	-	++	-	α	
48a1	kreisförmig, flach	milchig grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, sehr lange und sehr kurze, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, Ketten	0,99 ± 0,03 x 2,25 ± 0,76	+	ca. 2 cm (5 d)	-	+	+	+	γ	
48a2a1	kreisförmig, flach	beige-transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln-7er Ketten	1,03 ± 0,05 x 2,06 ± 0,49	+	3 mm (4 d)	-	+	+	+	γ	
48a2a2	kreisförmig, flach (Kolonien größer als bei a1)	Zentrum milchig beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln-7er Kette, auch dicke, aufgequollene, unförmige	1 ± 0,05 x 2,13 ± 0,33 (max. 1,1 x 1,3)	+	2,4 cm (7 d)	-	+	++	+	γ	
48a2b	kreisförmig, erhaben	grüngelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,6 ± 0,08 x 2,02 ± 0,62	+	bis 3 mm (1 d)	-	-	++	+	α	
48b1a	kreisförmig, leicht konvex (knopf-ähnlich)	milchig, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,86 ± 0,05 x 1,78 ± 0,54	-	(14 d)	-	-	+	+	α	
48b1b	kreisförmig, flach	beige, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 5er, kleinere Aggregate, helle „Einschlüsse“	0,8 ± 0,05 x 1,77 ± 0,13	+	7 mm (1 d)	-	+	+	+	γ	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/ Schwärmagrar)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/ Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)						Gruppierung (FISH)*
48b1c	kreisförmig, flach	beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, helle „Einschlüsse“	0,82 ± 0,1 x 2,03 ± 0,55	+, 3 mm (1 d)	-	+	+	+	γ
48b2b	kreisförmig, erhaben, evtl knopförmig (sehr klein)	milchig weiß, Zentrum trüber, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, viele Aggregate	0,83 ± 0,07 x 1,56 ± 0,21	- (14 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
48b2c1	kreisförmig, flach	beige, Zentrum trüb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, helle „Einschlüsse“, einzeln, 2er	0,91 ± 0,07 x 1,85 ± 0,26	+, bis 2 mm (7 d)	-	+	+	+	γ
48c2a	kreisförmig, konvex, ältere Kol. konzentrisch	weiß, Rand transparent, Zentrum dichter	glatt / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. helle „Einschlüsse“	0,83 ± 0,05 x 1,96 ± 0,33	taumeln, bis 2mm (14 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
48c2b	kreisförmig, flach	transparent, Zentrum trüber	glatt / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht gekrümmt, einzeln, Aggregate, tw. helle „Einschlüsse“	0,72 ± 0,06 x 1,8 ± 0,07	+, 4 mm (2 d)	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ
48d	kreisförmig, flach	milchig weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, längere + kürzere, runde Enden, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	1,02 ± 0,08 x 1,93 ± 0,47	+, 2 mm (6 d)	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
49a1	kreisförmig, konvex	gelbgrün, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,31 ± 0,03 x 2,2 ± 0,44	+, 4 mm (12 d)	-	-	+	+	α
49a2	kreisförmig, knopfähnlich	weiß grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate (kleine sternförmig und größere)	0,8 ± 0,05 x 1,98 ± 0,34	+, 6 mm (12 d)	-	-	+	+	α
49b	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,33 ± 0,05 x 2,39 ± 0,53	+, 1,5-4 mm (1 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
49c1	kreisförmig, flach	transparent	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,54 ± 0,05 x 2,36 ± 0,54	+, ca. 9 mm (6 d)	-	+	+	+	α
49c2	kreisförmig, flach	durchscheinend beige, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,54 ± 0,05 x 2,06 ± 0,33	+, 7 mm (7 d)	-	+	+	+	α
50a1	kreisförmig, flach	orange-gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,46 ± 0,2 x 1,42 ± 0,36	+, 1 mm (5 d)	-	-	+	+	α
50a2	kreisförmig, erhaben	weiß	ganz-gewellt / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er, 3er, tw. haben Stäbchen hellen Einschluss am Ende	0,85 ± 0,05 x 2,03 ± 0,3	+, 4 mm (2 d)	-	-	+(4 d)	+(4 d)	γ
50b1	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,32 ± 0,04 x 2,07 ± 0,51	+, 1-2 mm (3 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
50b2	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	kürzere Stäbchen, tw. spitz zulaufend, tw. gestielt, einzeln, budding, Aggregate	0,84 ± 0,07 x 1,68 ± 0,38	+, bis 3 mm (4 d)	-	+	+(3 d)	+(3 d)	α
50c	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge (auch sehr lange), runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,39 ± 0,06 x 2,04 ± 0,42	+, 3 mm (2 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
51a1a	kreisförmig, konvex	orange-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,48 ± 0,04 x 1,77 ± 0,21	+, bis 2 mm (1 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
51a1b	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-5er-Kette, Aggregate, daran häufig sehr lange Stäbchen	0,28 ± 0,06 x 1,99 ± 0,26	+, 3,5 mm (2 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
51a2	kreisförmig, flach erhaben	milchig beige-grau, bei großer Kol. Zentrum dunkler Punkt	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Längen, Enden rundspitz, kleine sternförmige (3er) Aggregate	0,48 ± 0,08 x 2,15 ± 0,49	+, 1 cm (2 d)	-	+	+(3 d)	+(3 d)	α
51b1	kreisförmig, erhaben	orange-gelb, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,44 ± 0,07 x 1,84 ± 0,42	+, 1 mm (11 d)	-	+	+	+	α
51b2	kreisförmig, flach	mattegrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,23 ± 0,05 x 2,04 ± 0,52	+, 4 mm (2 d)	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
51c1	kreisförmig, flach	Zentrum mattegrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, wenige kleine Aggregate	0,33 ± 0,05 x 2,22 ± 0,46	+, 4 mm (2 d)	-	-	+	+	α
51c2	kreisförmig, flach konvex	grünlichgelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,74 ± 0,07 x 2,03 ± 0,56	taumeln, 2-3,5 mm (5 d)	-	-	++(4 d)	+(4 d)	α
51c3	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde-spitze Enden, gestielt, einzeln, Aggregate	0,5 ± 0,09 x 1,6 ± 0,35	taumeln, bis 2 mm (1 d)	-	+	+(4 d)	+(4 d)	α
52a1a	kreisförmig, flach	grau-weiß, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, tw. eiförmig, 2er, tw. haben Stäbchen hellen Einschluss am Ende	1,01 ± 0,03 x 1,79 ± 0,33	+, 1-1,5 mm (1 d)	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ
52a1b	kreisförmig, flach erhaben	grünlichgelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleinere Aggregate	0,19 ± 0,03 x 2,07 ± 0,31	+, 3 mm (2 d)	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α
52a2a	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, kleinere Aggregate	0,34 ± 0,05 x 2,46 ± 0,48	+, 3 mm (2 d)	-	-	+	+	α
52a2b	kreisförmig, flach	grau, Zentrum trüber, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke, tw. kokkoide Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	1,03 ± 0,05 x 1,83 ± 0,38	taumeln, 2 mm (6 d)	-	+	-(3 d)	+(3 d)	γ
52b1a	kreisförmig, flach erhaben	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, daran tw. auch sehr lange	0,76 ± 0,05 x 1,8 ± 0,21	+, 1mm (3 d)	-	-	+	+	α
52b2a	kreisförmig, erhaben	mattegrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,31 ± 0,06 x 1,4 ± 0,33	+, 2 mm (4 d)	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α
52b2b	kreisförmig, konvex	weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	gestielte und ungestielte, runde Enden, eine Seite häufig spitz zulaufend (bei gestielten = die Stielseite), budding, einzeln	0,55 ± 0,07 x 1,65 ± 0,39	+, bis 4 mm (4 d)	-	+	+	+	α
52c1a	kreisförmig, erhaben	grau, Zentrum trüb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzen	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht gekrümmt, einzeln, 2er, kleinere Aggregate	0,78 ± 0,06 x 2,59 ± 0,33	+, 1,5-2 mm (6 d)	-	-	+	+	α
52c1b	kreisförmig, flach	mattegrün	ganz / glatt, glänzen	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,22 ± 0,04 x 2,14 ± 0,65	+, bis 1 mm (1 d)	-	-	+	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Koloniemorphologie				Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische	
Isolat	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*	
52c1c	kreisförmig, erhaben; vorher trüber Agar um Impfstrich klar	beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. helle „Einschlüsse“, kleinere Aggregate	0,8 ± 0,07 x 1,84 ± 0,28	-	+	+	+	γ	
52d1a	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1,15 ± 0,1 x 1,94 ± 0,28	-	+	+	+	γ	
52d1b1	kreisförmig, flach	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln	0,99 ± 0,03 x 1,97 ± 0,31	-	+	-	+	γ	
52d1b2	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate, versch. Länge	0,77 ± 0,08 x 2,08 ± 0,5	-	-	+	+	α	
52d2a	kreisförmig, erhaben	schwach grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,54 ± 0,12 x 2,13 ± 0,86	-	-	++	+	α	
52d2b	kreisförmig, konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,83 ± 0,08 x 2,01 ± 0,37	-	-	+	+	α	
52e1	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-8erKette	1,07 ± 0,05 x 1,8 ± 0,41	-	+	+	+	γ	
52e2	kreisförmig, flach	grünlich (schwach)	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,48 ± 0,04 x 1,9 ± 0,46	-	-	++	+	α	
53a1a	kreisförmig, flach	transparent	gewellt / gepunktet	längere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, helle „Einschlüsse“	0,81 ± 0,03 x 2,29 ± 0,42	-	+	+	+	γ	
53a1b	kreisförmig, flach	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, tw. helle „Einschlüsse“ (terminal o. zentral)	0,78 ± 0,04 x 1,73 ± 0,19	-	+	+	+	γ	
53a2a	kreisförmig, flach	weiß-beige, Zentrum trüber, heller Rand	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, helle „Einschlüsse“, Aggregate	0,8 ± 0,07 x 1,61 ± 0,45	-	+	+	+	γ	
53a2b	kreisförmig, flach	transparent	matt, unruhig / glatt-gewellt	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, helle „Einschlüsse“	0,81 ± 0,07 x 2,03 ± 0,34	-	+	+	+	γ	
53b1	kreisförmig, flach	transparent	ganz / glatt, glänzend	längere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, helle „Einschlüsse“	0,82 ± 0,06 x 2,26 ± 0,71	-	+	+	+	γ	
53c	kreisförmig, flach	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Ketten	0,99 ± 0,03 x 2,08 ± 0,47	-	+	+	+	γ	
54a1	kreisförmig, erhaben	gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,64 ± 0,13 x 1,71 ± 0,52	-	-	++	+	α	
54a2	kreisförmig, flach	milchig grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1,03 ± 0,11 x 1,86 ± 0,19	-	+	+	+	γ	
54a3	kreisförmig, konvex	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,81 ± 0,07 x 2,02 ± 0,52	-	-	+	+	α	
54b1	kreisförmig, erhaben	milchig weiß-grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-4er-Kette	0,89 ± 0,07 x 1,85 ± 0,14	-	-	+	+	γ	
54b2	kreisförmig, leicht konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige und größere Aggregate	0,74 ± 0,08 x 1,91 ± 0,14	-	-	+	+	α	
54b3	kreisförmig, erhaben	gelbgrün, transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,2 x 1,55 ± 0,31 (max. 0,4 x 7,2)	-	-	+	+	α	
54c1	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln-18er-Kette	1,15 ± 0,07 x 1,94 ± 0,21	-	+	+	+	γ	
54c2	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,62 ± 0,11 x 3,05 ± 2,36	-	-	++	+	α	
55a	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,54 ± 0,07 x 2,21 ± 0,58	-	-	++	-	α	
55b1a	kreisförmig, flach	orange-gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,43 ± 0,05 x 1,71 ± 0,35	-	-	+	+	α	
55b1c	kreisförmig, flach-leicht erhaben	milchig grau-weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,87 ± 0,05 x 2,01 ± 0,22	-	-	+	+	γ	
55b2	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 4er, Aggregate, daran auch sehr lange	0,28 ± 0,04 x 1,84 ± 0,28	-	-	+	+	α	
55c1	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,33 ± 0,05 x 1,89 ± 0,3	-	-	+	+	α	
56	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,71 ± 0,11 x 2,4 ± 0,79	-	-	++	±	α	
58a1	kreisförmig, flach	Zentrum milchig weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,97 ± 0,05 x 1,85 ± 0,39	-	-	+	+	γ	
58a2	kreisförmig, leicht erhaben; vorher trüber Agar um Impfstrich klar	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, tw. helle „Einschlüsse“	0,83 ± 0,05 x 1,9 ± 0,34	-	+	+	+	γ	
58b1a	kreisförmig, leicht erhaben	beige	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde-spitze Enden, einzeln, Aggregate	0,48 ± 0,06 x 2,32 ± 0,7	-	+	++	+	α	
58b1b	kreisförmig, konvex - knopfförmig	weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, sternförmige Aggregate	0,79 ± 0,03 x 1,85 ± 0,22	-	-	+	+	α	
58b2a	kreisförmig, flach	weiß, Zentrum etwas trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,94 ± 0,05 x 1,96 ± 0,4	-	+	+	+	γ	
58b2b	kreisförmig, flach	transparent, Zentrum etwas trüber	gewellt / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, kleinere Aggregate, helle „Einschlüsse“	0,78 ± 0,04 x 1,76 ± 0,25	-	+	+	+	γ	
60	kreisförmig, konvex	grüngrau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,76 ± 0,08 x 1,91 ± 0,55	-	+	++	+	α	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)				Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH)*
62	kreisförmig, konvex	grünlich gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, wenige Aggregate	0,32 ± 0,04 x 1,86 ± 0,45	-	-	+	+	α
63a1a1	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,24 ± 0,05 x 1,93 ± 0,19	-	-	+	+	α
63a1a2	kreisförmig, flach	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er – 9er-Kette, längere St. mit „Einschlüssen“	0,55 ± 0,08 x 1,74 ± 0,33	-	+	-	+	γ
63a1b	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln-4erKette	0,61 ± 0,09 x 1,72 ± 0,3	-	+	+	+	γ
63a2a	kreisförmig, erhaben	grünlich gelb	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,53 ± 0,05 x 1,82 ± 0,47	-	-	++	+	α
63a2b	kreisförmig, erhaben	beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, leicht gekrümmt	0,69 ± 0,09 x 1,92 ± 0,1	-	+	+	+	γ
63b2	kreisförmig, flach	milchig beige-transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, völlig versch. Länge, extrem lange, runde Enden, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“, Ketten, Sphäroblasten	1,13 ± 0,14 x 3,12 ± 1,5	-	+	+	+	γ
63c1b	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Kette (>20)	0,54 ± 0,08 x 2,28 ± 0,49	-	+	+	+	α
63c1c	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, runde Enden, versch. Länge, einzeln	0,56 ± 0,07 x 2,29 ± 0,39	-	+	+	+	α
63c2a	kreisförmig, flach	milchig grau-transparent	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,53 ± 0,05 x 2,19 ± 0,41	-	+	+	+	α
63c2b	kreisförmig, konvex	Zentrum gelbgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,28 ± 0,04 x 1,66 ± 0,41	-	+	++	+	α
65	kreisförmig, erhaben	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,59 ± 0,11 x 1,9 ± 0,43	-	-	++	+	α
66	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate	0,33 ± 0,05 x 1,87 ± 0,22	-	-	+	+	α
67a	kreisförmig, flach	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, einzeln, 2er, tw. eiförmig, versch. Länge	1,02 ± 0,04 x 1,88 ± 0,23	-	+	+	+	γ
67b1	kreisförmig, flach	weiß grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-5er-Kette, viele Ketten	0,9 ± 0,05 x 1,93 ± 0,13	-	+	+	+	γ
67b2	kreisförmig, flach	weiß	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-17er-Kette, viele Ketten,	0,98 ± 0,04 x 1,87 ± 0,29 (max. 1 x 6)	-	-	++ (3 d)	+	γ
67c1a	kreisförmig, flach	mattgrün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,28 ± 0,04 x 1,7 ± 0,31	-	+	+	+	α
67c1b1	kreisförmig, flach	grau, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, helle „Einschlüsse“, tw. leicht gekrümmte Stäbchen	0,67 ± 0,07 x 1,54 ± 0,26	-	+	+	+	γ
67c1b2	kreisförmig-flächig, flach	transparent	ganz-gewellt / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, Aggregate	0,78 ± 0,04 x 1,93 ± 0,31	-	-	+	+	α
67c2a	kreisförmig, erhaben	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, kleine Aggregate, tw. helle „Einschlüsse“	0,7 ± 0,08 x 1,58 ± 0,28	-	+	+	+	γ
67c3a	kreisförmig, flach	grau weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht gekrümmt, helle „Einschlüsse“, einzeln	0,72 ± 0,08 x 1,77 ± 0,28	-	+	+	+	γ
67c3b	kreisförmig, konvex	weiß-grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,75 ± 0,05 x 1,94 ± 0,31	-	-	+	+	α
67d1a	kreisförmig, flach	gelblich grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-5er-Kette, kleinere Aggregate	0,28 ± 0,04 x 1,64 ± 0,3	-	+	+	+	α
67d2a	kreisförmig, flach	beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln – 6er Kette (viele Ketten)	0,92 ± 0,06 x 1,73 ± 0,32	-	-	+	+	γ
67d2b1a	kreisförmig, flach	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,31 ± 0,11 x 1,68 ± 0,36	-	-	+	+	α
67d2b2a	kreisförmig, flach	beige-grau	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er-6er Kette, Aggregate, Ketten: Verbindung über „Stege“	0,86 ± 0,07 x 1,85 ± 0,16 (max. 1 x 8)	-	+	+	+	γ
67d2b2b	kreisförmig, flach	transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, tw. „Hohlräume“, einzeln, 4er	0,85 ± 0,05 x 2,06 ± 0,41	-	+	+	+	γ
68a	kreisförmig	milchig beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er, Kette, Aggregate	1,08 ± 0,04 x 1,79 ± 0,28	-	+	+	+	γ
68b1a	kreisförmig, flach	beige	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig	1,11 ± 0,07 x 2,01 ± 0,14	-	+	+	+	γ
68b1b	kreisförmig, konvex	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	gestielte Stäbchen, einzeln, 2er, Aggregate	0,54 ± 0,07 x 1,26 ± 0,28 (mit Stiel: 2,83 ± 0,59)	-	+	+	+	α
68b2	kreisförmig, erhaben	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,63 ± 0,14 x 2,04 ± 0,16	-	-	++	+	α
68c1a	kreisförmig, konvex	grünlich gelb, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,33 ± 0,05 x 1,84 ± 0,58	-	+	+	+	α
68c1b	kreisförmig, flach	grau, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge/Dicke, runde Enden, tw. leicht gekrümmt, tw. leicht eiförmig, einzeln, 2er	1,05 ± 0,07 x 1,66 ± 0,29	-	+	+	+	γ
68c2	kreisförmig, erhaben	grün, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleine Aggregate	0,43 ± 0,05 x 1,63 ± 0,16	-	+	+	+	α
69a1	kreisförmig	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,43 ± 0,07 x 1,66 ± 0,51	-	-	++	+	α

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6.7c

Isolat	Koloniemorphologie			Zellmorphologie		Beweglichkeit (mikroskopisch/Schwärmagar)					Taxonomische
	Form	Farbe	Rand/Oberfläche	Zellform	Zellgröße (µm)	Gram	KOH	Katalase	Oxidase	Gruppierung (FISH) <sup>a</sup>	
69a2	kreisförmig, erhaben	milchig beige, Rand transparent, Zentrum trüber	ganz / glatt, glänzend	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er	0,96 ± 0,05 x 2,27 ± 0,33	-	-	++	+	γ	
69b1	kreisförmig bis flächig	transparent, Zentrum trüber	ganz / Zentrum glänzend, Rand matt	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,75 ± 0,07 x 1,91 ± 0,4	-	+	+	+	γ	
69b2	kreisförmig, erhaben	gelblich grün, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden einzeln, Aggregate	0,32 ± 0,04 x 1,91 ± 0,4	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α	
70a1	Zentrum kreisförmig, flach, Ränder verlaufen ineinander	Zentrum milchig, breiter Rand transparent	ganz-gewellt / glatt, glänzend	Stäbchen, sehr versch. Längen, runde Enden, einzeln, 2er, helle „Einschlüsse“ oft mittig, Aggregate	0,69 ± 0,07 x 1,82 ± 0,34	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ	
70a2	kreisförmig, flach	Bino: bläulich, so: milchig, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	kleine Stäbchen, versch. Länge, leicht gekrümmt, Spirillen, runde Enden, einzeln, ein Korkenzieherförmiges Bakterium	0,41 ± 0,03 x 1,23 ± 0,32	-	+	+(3 d)	+(3 d)	γ	
70b	kreisförmig, konvex	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, tw. „Einschlüsse“	0,99 ± 0,06 x 2,27 ± 0,4	-	+	+	+	γ	
70c1	kreisförmig, flach	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Spirillen, versch. Länge, runde-spitze Enden, einzeln, kleinere Aggregate	0,37 ± 0,05 x 2,29 ± 0,39 (max. 0,4 x 9)	-	+	+	+	α	
70c2	kreisförmig, flach	bläulich	ganz / glatt, glänzend	dünne, kurze Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. leicht gekrümmt, einzeln, große unbewegliche Spirillen	0,37 ± 0,05 x 1,27 ± 0,38	-	+	+(4 d)	+(4 d)	γ	
72a	kreisförmig	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,41 ± 0,03 x 1,75 ± 0,38 (max. 0,5 x 10)	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α	
72b1	kreisförmig, erhaben	grünlich, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln	0,25 ± 0,05 x 2,21 ± 0,47	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α	
72b2	kreisförmig, konvex	milchig weiß, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,88 ± 0,04 x 2,03 ± 0,29 0,83 ± 0,07 x 1,92 ± 0,2	-	-	+	+	α	
73a	kreisförmig, konvex	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,66 ± 0,05 x 1,71 ± 0,38	-	-	++	+	α	
73b	kreisförmig, konvex	gelblich grün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,57 ± 0,09 x 1,59 ± 0,46	-	-	++	+	α	
74a1a	kreisförmig, konvex	weiß	ganz / glatt, glänzend	dickere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,84 ± 0,08 x 2,41 ± 0,55	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α	
74a1b	kreisförmig, erhaben	grau-beige, Rand transparent	ganz / glatt, glänzend	dicke, kürzere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, tw. eiförmig, einzeln, 2er	1,01 ± 0,03 x 1,64 ± 0,37	-	+	-(3 d)	+(3 d)	γ	
74a1c	kreisförmig, knopfförmig	gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 3er-5er-Kette, Aggregate	0,2 x 1,95 ± 0,34	-	-	+	+	α	
74a2	kreisförmig, konvex	gelblich grün, Rand transparenter	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, auch sehr lange, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,34 ± 0,05 x 2,1 ± 0,52	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α	
74b1	kreisförmig, konvex (fast knopfförmig)	weiß, Zentrum ist leicht rötlich-braun	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,8 ± 0,05 x 2,51 ± 0,54	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α	
74b2	kreisförmig, erhaben	grünlich	ganz / glatt, glänzend	dünnere Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate, daran tw. auch sehr lange Stäbchen	0,32 ± 0,04 x 1,27 ± 0,28	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α	
74c1a	kreisförmig, knopfförmig	grün-grau (mattgrün)	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	0,32 ± 0,04 x 2,02 ± 0,53	-	-	+	+	α	
74c1b	kreisförmig, flach erhaben	Zentrum gelbgrün, Rand durchscheinend	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, 3er, kleine Aggregate	0,21 ± 0,03 x 2,13 ± 0,74	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α	
74c1c	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	dicke, kürzere Stäbchen, versch. Länge/ Dicke, runde Enden, einzeln, 2er, tw. eiförmig	0,99 ± 0,06 x 1,61 ± 0,36	-	+	+	+	γ	
74d1a	kreisförmig, flach	matt gelbgrün	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, kleinere Aggregate	0,2 x 2,09 ± 0,37	-	+	+(3 d)	+(3 d)	α	
74d1b	kreisförmig, erhaben	weiß, Zentrum trüber, Rand heller	ganz / glatt, glänzend	dickere, kurze Stäbchen, tw. eiförmig, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er	0,81 ± 0,1 x 1,31 ± 0,31	-	-	+(3 d)	+(3 d)	α	
74d2	kreisförmig, flach	mattgrün-blau-grün, grün-transparenter Rand	ganz / glatt, glänzend	dünne Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, daran tw. sehr lange	0,24 ± 0,05 x 1,61 ± 0,36	-	-	+(4 d)	+(4 d)	α	
75a1	kreisförmig, flach	milchig grau	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. „Einschlüsse“	0,84 ± 0,13 x 2,06 ± 0,45	-	+	+	+	γ	
75a2	kreisförmig, flach	milchig weiß	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate, tw. „Einschlüsse“	1,05 ± 0,05 x 1,98 ± 0,3 (max. 1 x 8 und 0,8 x 9)	-	+	+	+	γ	
75b1	kreisförmig, erhaben	milchig beige	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, tw. mit „Einschlüssen“	0,88 ± 0,08 x 1,94 ± 0,49	-	+	+	+	γ	
75b2	kreisförmig, konvex	grünlich	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,44 ± 0,1 x 1,82 ± 0,32 (max. 0,7 x 8)	-	-	++	+	α	
75c1	kreisförmig, flach	milchig grau	gefurcht / gewellt	dicke Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, 2er, Aggregate	1,04 ± 0,05 x 2,28 ± 0,39	-	+	++	+	γ	
75c2	kreisförmig, flach	grünlich	ganz / glatt, glänzend	Stäbchen, versch. Länge, runde Enden, einzeln, Aggregate	0,53 ± 0,08 x 1,75 ± 0,44 (max. 0,7 x 5)	-	-	++	+	α	

-, negativ oder unbeweglich; +, positiv oder beweglich; ++ (nur Katalase-Test), starke Sauerstoffbildung; tw., teilweise; versch., verschiedene; evtl., eventuell

<sup>a</sup> α, α-Proteobacteria; γ, γ-Proteobacteria; HGC, hoher G+C-Gehalt; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*

---

**6.6 16S rRNA-Sequenzen der Isolate 3 und 4a1c aus 150 m Wassertiefe von Station 7004-1**

**Isolat 3 (571 nt):** 5'-AGGAGGGAGCTAGCCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG  
GCGGCTTTCCAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCC  
TTGAAACTGGATGGCTAGAATACTGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAG  
AGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCACT  
GGACAGTTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATAACTAGCTGTCCGAGCTCAT  
GGAGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGG  
TCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAG  
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATCCT  
AGGACGACTTCTGGAGACAGATTTCTTCCCTTCGGGGACCTAGTGACAGGTG  
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA  
C-3'

**Isolat 4a1c (573 nt):** 5'-ACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACG  
TAGGCGGCTTTCCAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTG  
CCCTTGAAACTGGATGGCTAGAATACTGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG  
TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC  
ACTGGACAGTTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATAACTAGCTGTCCGAGCTC  
ATGGAGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACAT  
CCTAGGACGACTTCTGGAGACAGATTTCTTCCCTTCGGGGACCTAGTGACAG  
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGA-3'

---

## 7 Literaturverzeichnis

- ACINAS SG, RODRÍGUEZ-VALERA F, PEDRÓS-ALIÓ C (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol* 24, 27-40
- ACINAS SG, ANTÓN J, RODRÍGUEZ-VALERA F (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 65, 514-522
- ALLDREDGE AL, YOUNGBLUTH MJ (1985) The significance of macroscopic aggregates (marine snow) as sites for heterotrophic bacterial production in the mesopelagic zone of the subtropical Atlantic. *Deep-Sea Res* 32, 1445-1456
- ALLDREDGE AL, COLE JJ, CARON DA (1986) Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol Oceanogr* 31, 68-78
- ALLDREDGE AL, SILVER MW (1988) Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog Oceanogr* 20, 41-82
- ALLDREDGE AL, PASSOW U, LOGAN BE (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res I* 40, 1131-1140
- ALLGAIER M, UPHOFF H, FELSKE A, WAGNER-DÖBLER I (2003) Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl Environ Microbiol* 69, 5051-5059
- AMANN RI, KRUMHOLZ L, STAHL DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172: 762-770
- AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169
- AMY PS, MORITA RY (1983) Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Appl Environ Microbiol* 45, 1109-1115
- AZAM F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280, 694-696
- AZAM F, FENCHEL T, FIELD JG, MEYER-REIL RA, THINGSTAD F (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10, 257-263
- AZAM F, SMITH DC, LONG RA, STEWARD GF (1995) Bacteria in oceanic carbon cycling as a molecular problem. In: *Molecular ecology of aquatic microbes* (Joint I, ed). Springer, Berlin, pp 39-54
- AZAM F, LONG RA (2001) Sea snow microcosms. *Nature* 414, 495-498
- BAKKER K (1999) Nährstoffe in antarktischen Gewässern. In: *Die Expedition ANTARKTIS XV/4 des Forschungsschiffes "Polarstern" 1998* (Fahrbach E, ed). *Ber Polarforsch* 314, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Deutschland, pp 46-50
- BAST E (1999) *Mikrobiologische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- BENLLOCH S, RODRÍGUEZ-VALERA F, MARTINEZ-MURCIA AJ (1995) Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 18, 267-280

- 
- BERKENHEGER I (2004) Nachweis zum Vorkommen von Bakterien und deren physiologischer Aktivitäten auf marinen Partikeln in der Wassersäule. Dissertation, Universität Bremen, Germany
- BERKENHEGER I, HEUCHERT A, DE SILVA S, FISCHER U (2004) Heterotrophic particle-associated bacteria from the South Atlantic: a community of marine microorganisms with a high organic carbon degradation potential. In: The South Atlantic in the late quaternary: reconstruction of material budgets and current systems (Wefer G, Mulitza S, Ratmeyer V, eds). Springer-Verlag Berlin, pp 65-79
- BERRY A, JANSSENS D, HÜMBELIN M, JORE JPM, HOSTE B, CLEENWERCK I, VANCANNEYT M, BRETZEL W, MAYER AF, LOPEZ-ULIBARRI R, SHANMUGAM B, SWINGS J, PASAMONTES L (2003) *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 53, 231-238
- BERTONE S, GIACOMINI M, RUGGIERO C, PICCAROLO C, CALEGARI L (1996) Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. Appl Environ Microbiol 62, 2122-2132
- BHAKOO M, HERBERT RA (1980) Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures. Arch Microbiol 126, 51-55
- BIDLE KD, FLETCHER M (1995) Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. Appl Environ Microbiol 61, 944-952
- BÖCKELMANN U, MANZ W, NEU TR, SZEWZYK U (2000) Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ("river snow") in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. FEMS Microbiol Ecol 33, 157-170
- BOWMAN JP, CAVANAGH J, AUSTIN JJ, SANDERSON K (1996) Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. Int J Syst Bacteriol 46: 841-848
- BOWMAN JP, MCCAMMON SA, BROWN MV, NICHOLS DS, McMEEKIN TA (1997a) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl Environ Microbiol 63, 3068-3078
- BOWMAN JP, NICHOLS DS, McMEEKIN TA (1997b) *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. Syst Appl Microbiol 20, 209-215
- BOZAL N, TUDELA E, ROSSELLÓ-MORA R, LALUCAT J, GUINEA J (1997) *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. Int J Syst Bacteriol 47, 345-351
- BRENOWITZ S, CASTENHOLZ RW (1997) Long-term effects of UV and visible irradiance on natural populations of a scytonemin-containing cyanobacterium (*Calothrix* sp.). FEMS Microbiol Lett 24, 343-352
- BRESCHER TS, SINGLETON FL (1992) Use of the API rapid NFT system for identifying nonfermentative and fermentative marine bacteria. Appl Environ Microbiol 58, 21-26
- BRINKMEYER R, KNITTEL K, JÜRGENS J, WEYLAND H, AMANN R, HELMKE E (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice: a comparison. Appl Environ Microbiol 69, 6610-6619
- BRITSCHGI TB, GIOVANNONI SJ (1991) Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. Appl Environ Microbiol 57, 1707-1713
- BRITTON G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J 9, 1551-1558
-

- 
- BROWN GR, SUTCLIFFE IC, BENDELL D, CUMMINGS SP (2000) The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii*<sup>T</sup> when subjected to both osmotic and organic solvent stress. FEMS Microbiol Lett 189, 149-154
- BUCK JD (1982) Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. Appl Environ Microbiol 44: 992-993
- BUDZIKIEWICZ H (1992) Massenspektrometrie. Eine Einführung. 3. Auflage, VCH, Weinheim
- BUSSE HJ, DENNER EBM, LUBITZ W (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J Biotechnol 47, 3-38
- CARERI M, ELVIRI L, MANGIA A (1999) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of  $\beta$ -carotene and xanthophylls: validation of the analytical method. J Chromatogr A 854, 233-244
- CARLUCCI AF, SHIMP SL, CRAVEN DB (1986) Growth characteristics of low-nutrient bacteria from the north-east and central Pacific Ocean. FEMS Microbiol Ecol 8, 1-10
- CARON DA, DAVIS PG, MADIN LP, SIEBURTH JMCN (1982) Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. Science 218, 795-797
- CHAPMAN JR (1985) Practical organic mass spectrometry. John Wiley & Sons, New York
- CHATTOPADHYAY MK, JAGANNADHAM MV, VAIRAMANI M, SHIVAJI S (1997) Carotenoid pigments of an Antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. Biochem Biophys Res Commun 239, 85-90
- CHATTOPADHYAY MK, JAGANNADHAM MV (2001) Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria. Polar Biol 24, 386-388
- CHO B, AZAM F (1988) Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. Nature 332, 441-443
- CHOI KH, DOBBS FC (1999) Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. J Microbiol Meth 36, 203-213
- CHRÓST RJ, FAUST MA (1980) Molecular weight fractionation of dissolved organic matter (DOM) released by phytoplankton. Acta Microbiol Pol 29, 79-88
- CHRÓST RJ, FAUST MA (1999) Consequences of solar radiation on bacterial secondary production and growth rates in subtropical coastal water (Atlantic Coral Reef off Belize, Central America). Aquat Microb Ecol 20, 39-48
- COLLIEC JOUAULT S, ZANCHETTA P, HELLEY D, RATISKOL J, SINQUIN C, FISCHER AM, GUEZENEC J (2003) Exopolysaccharides produced by bacteria isolated from deep-sea hydrothermal vents: new agents with therapeutic potential. Abstract zur Polymerix 2003: Biopolymers: health, food & cosmetic applications, 21. & 22.5.2003, Rennes.  
[www.cbb-developpement.com/polymerix2003/fr](http://www.cbb-developpement.com/polymerix2003/fr)
- CONNOR SA, GIOVANNONI SJ (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Appl Environ Microbiol 68, 3878-3885
- COTTRELL MT, KIRCHMAN DL (2000a) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 66, 5116-5122
-

- 
- COTTRELL MT, KIRCHMAN DL (2000b) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66, 1692-1697
- CUMMINGS L, RILEY L, BLACK L, SOUVOROV A, RESENCHUK S, DONDOHANSKY I, TATUSOVA T (2002) Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol Lett* 216: 133-138
- DANG H, LOVELL CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66, 467-475
- DECHO AW (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* 20, 1257-1273
- DEL GIORGIO PA, COLE JJ (2000) Bacterial energetics and growth efficiency. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 289-325
- DELILLE D (1992) Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge, distribution of psychrophilic and psychrotrophic populations. *Polar Biol* 12, 205-210
- DELILLE D (1993) Seasonal changes in the abundance and composition of marine heterotrophic bacterial communities in an Antarctic coastal area. *Polar Biol* 13, 463-470
- DELILLE D, PERRET E (1989) Influence of temperature on the growth potential of southern polar marine bacteria. *Microb Ecol* 18, 117-123
- DELONG EF (1992) *Archaea* in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5685-5689
- DELONG EF, FRANKS DG, ALLDREDGE AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* 38, 924-934
- DENNER EBM, MARK B, BUSSE HJ, TURKIEWICZ M, LUBITZ W (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Syst Appl Microbiol* 24, 44-53
- DENNER EBM, VYBIRAL D, KOBLÍŽEK M, KÄMPFER P, BUSSE HJ, VELIMIROV B (2002) *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellow-pigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll *a*, isolated from the western Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1655-1661
- DE SILVA S (2001) Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen an zwei "Partikel-assoziierten" Bakterien aus dem Südpolarmeer mit extrazellulärer Enzymproduktion. Diplomarbeit, Universität Bremen, Germany
- DILLING L, ALLDREDGE AL (2000) Fragmentation of marine snow by swimming macrozooplankton: a new process impacting carbon cycling in the sea. *Deep-Sea Res I* 47, 1227-1245
- DORONINA NV, TROTSENKO YA, KUZNETZOV BB, TOUROVA TP (2002) Emended description of *Paracoccus kondratievae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 679-682
- DREWS G (1983) *Mikrobiologisches Praktikum*. 4. Auflage, Springer, Berlin
- DUCKLOW H (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 85-120
- EDGE R, MCGARVEY DJ, TRUSCOTT TG (1997) The carotenoids as anti-oxidants – a review. *J Photochem Photobiol B* 41, 189-200
-

- 
- EGUCHI M, ISHIDA Y (1990) Oligotrophic properties of heterotrophic bacteria and in situ heterotrophic activity in pelagic seawaters. *FEMS Microbiol Ecol* 73, 23-30
- EILERS H, PERNTHALER J, GLÖCKNER FO, AMANN R (2000a) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66, 3044-3051
- EILERS H, PERNTHALER J, AMANN R (2000b) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Appl Environ Microbiol* 66, 4634-4640
- EILERS H, PERNTHALER J, PEPLIES J, GLÖCKNER FO, GERDTS G, AMANN R (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl Environ Microbiol* 67, 5134-5142
- ENZELL CR, BACK S (1995) Mass spectrometry. In: Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy (Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, eds). Birkhäuser, Basel, pp 261-320
- FAHRBACH E, FRENZEL M, HARMS S, HÄRTER FETTER A, IAREMTCHOUK A, LANGREDER J, LOSKE S, MEISSNER K, MIR CASANOVAS C, MONSEES M, PEREIRA A, ROHARDT G, SCHRÖDER M, WISOTZKI A, WITTE H (1999) Tiefen- und Bodenwasserbildung im Weddellmeer. In: Die Expedition ANTARKTIS XV/4 des Forschungsschiffes "Polarstern" 1998 (Fahrbach E, ed). *Ber Polarforsch* 314, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Deutschland, pp 14-19
- FERGUSON RL, BUCKLEY EN, PALUMBO AV (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol* 47, 49-55
- FERRIER-PAGÈS C, KARNER M, RASSOULZADEGAN F (1998) Release of dissolved amino acids by flagellates and ciliates grazing on bacteria. *Oceanol Acta* 21, 485-494
- FIELD KG, GORDON D, WRIGHT T, RAPPÉ M, URBACH E, VERGIN K, GIOVANNONI SJ (1997) Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63, 63-70
- FISCHER G (2002) CTD-O<sub>2</sub>-chlorophyll-fluorescence probe. In: Report and preliminary results of RV Meteor-cruise M49/4, Salvador da Bahia – Halifax, 4.4.-5.5.2001 (Fischer G, Baumann KH, Böke W, Buschhoff H, Daberkow T, Erbacher J, Gutsch M, Heidersdorf F, Heuchert A, Knuth E, Mutterlose J, Ochsenhirt WT, Rosiak U, Ruhland G, Schlemm V, Schulte S, Vink A, Zühlsdorff L). *Berichte aus dem Fachbereich Geowissenschaften der Universität Bremen*, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen 194, p 10-11
- FLEMMING HC (2000) Mikroorganische Wohngemeinschaften zwischen Bad und Backenzahn: Physikalische Chemie von Biofilmen. *Forum Forschung*, Gerhard-Mercator-Universität, Duisburg, p 1-3
- FLEMMING HC, WINGENDER J (2001) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biol in uns Zeit* 3, 169-180
- FOX GE, WISOTZKEY JD, JURTSCHUK P JR (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* 42, 166-170
- FUHRMAN J (2000) Impact of viruses on bacterial processes. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 327-350
- FUHRMAN JA, MCCALLUM K, DAVIS AA (1993) Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl Environ Microbiol* 59, 1294-1302
-

- 
- FUHRMAN JA, LEE SH, MASUCHI Y, DAVIS AA, WILCOX RM (1994) Characterization of marine prokaryotic communities via DNA and RNA. *Microb Ecol* 28, 133-145
- FUKUNAGA N, RUSSELL NJ (1990) Membrane lipid composition and glucose uptake in two psychrotolerant bacteria from Antarctica. *J Gen Microbiol* 136, 1669-1673
- GALINSKI EA (1986) Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien. Dissertation, Universität Bonn, Germany
- GARCIA-PICHEL F (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol Oceanogr* 39, 1704-1717
- GARCIA-PICHEL F, CASTENHOLZ RW (1993) Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl Environ Microbiol* 59, 163-169
- GARLAND JL, MILLS AL (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol* 57, 2351-2359
- GIACOMINI M, RUGGIERO C, CALEGARI L, BERTONE S (2000) Artificial neural network based identification of environmental bacteria by gas-chromatographic and electrophoretic data. *J Microbiol Meth* 43, 45-54
- GIOVANNONI SJ, MULLINS TD, FIELD KG (1995) Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. In: *Molecular ecology of aquatic microbes* (Joint I, ed). Springer, Berlin, pp 217-248
- GIOVANNONI S, RAPPÉ M (2000) Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 47-84
- GLASEL (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18, 62-63
- GLÖCKNER FO, AMANN R, ALFREIDER A, PERNTHALER J, PSENNER R, TREBESIOUS K, SCHLEIFER KH (1996) An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst Appl Microbiol* 19, 403-406
- GLÖCKNER FO, FUCHS BM, AMANN R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65, 3721-3726
- GOSINK JJ, WOESE CR, STALEY JT (1998) *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48: 223-235
- GOUNOT A (1991) Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J Appl Bacteriol* 71, 386-397
- GRAM L, GROSSART HP, SCHLINGLOFF A, KIØRBOE T (2002) Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acetylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Appl Environ Microbiol* 68, 4111-4116
-

- 
- GROSSART HP (1995) Auftreten, Bildung und mikrobielle Prozesse auf makroskopischen organischen Aggregaten (Lake Snow) und ihre Bedeutung für den Stoffumsatz im Bodensee. Dissertation, Universität Konstanz, Germany
- GROSSART HP, SIMON M (1998) Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquat Microb Ecol* 15, 127-140
- GROSSART HP, KIØRBOE T, TANG K, PLOUG H (2003) Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Appl Environ Microbiol* 69, 3500-3509
- GURTLER V, WILSON VA, MAYALL BC (1991) Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J Gen Microbiol* 137: 2673-2679
- GUTNICK DL, BACH H (2000) Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 451-460
- HAGSTRÖM Å, PINHASSI J, ZWEIFEL UL (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 21, 231-244
- HAMAMOTO T, TAKATA N, KUDO T, HORIKOSHI K (1994) Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. *FEMS Microbiol Lett* 119, 77-82
- HEISSENBERGER A, LEPPARD GG, HERNDL GJ (1996) Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62, 4521-4528
- HELLEBUST JA (1965) Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 10, 192-206
- HEUCHERT A (1999) Isolierung und vergleichende Charakterisierung von zwei Partikel-assoziierten heterotrophen Bakterien aus dem Südatlantik (Antarktis). Diplomarbeit, Universität Bremen, Germany
- HEUCHERT A, GLÖCKNER FO, AMANN R, FISCHER U (2004) *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica). *Syst Appl Microbiol* 27, 399-406
- HEYDUCK-SÖLLER B (2003) Untersuchung zur Charakterisierung von marinen Cyanobakterien der Gattung *Anabaena* und ihrer Licht- und UV-absorbierenden Substanzen. Dissertation, Universität Bremen, Germany
- HOLMES B (1992) The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weeksella*. In: *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds). Springer, New York, pp 3620-3630
- HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol Ecol* 30, 285-293
- IRIBERRI J, HERNDL GJ (1995) Formation and microbial utilization of amorphous aggregates in the sea: ecological significance. *Microbiología Sem* 11, 309-322
- ITURRIAGA R (1981) Phytoplankton photoassimilated extracellular products; heterotrophic utilization in marine environments. *Kieler Meeresforsch Suppl* 5, 318-324
-

- 
- IVANOVA EP, NICOLAU DV, YUMOTO N, TAGUCHI T, OKAMOTO K, TATSU Y, YOSHIKAWA S (1998a) Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Mar Biol* 130, 545-551
- IVANOVA EP, KIPRIANOVA EA, MIKHAILOV VV, LEVANOVA GF, GARAGULYA AD, GORSHKOVA NM, VYSOTSKII MV, NICOLAU DV, YUMOTO N, TAGUCHI T, YOSHIKAWA S (1998b) Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *Int J Syst Bacteriol* 48, 247-256
- IVANOVA EP, CHUN J, ROMANENKO LA, MATTE ME, MIKHAILOV VV, FROLOVA GM, HUQ A, COLWELL RR (2000) Reclassification of *Alteromonas distincta* Romanenko et al. 1995 as *Pseudoalteromonas distincta* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 141-144
- IVANOVA EP, GORSHKOVA NM, SAWABA T, ZHUKOVA NV, HAYASHI K, KURILENKO VV, ALEXEEVA Y, BULJAN V, NICOLAU DV, MIKHAILOV VV, CHRISTEN R (2004) *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster eques-tris*) and sea grass (*Zostera marina*). *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 475-480
- JAGANNADHAM MV, CHATTOPADHYAY MK, SUBBALAKSHMI C, VAIRAMANI M, NARAYANAN K, MOHAN RAO C, SHIVAJI S (2000) Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. *Arch Microbiol* 173, 418-424
- JANNASCH HW, JONES GE (1959) Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol Oceanogr* 4, 128-139
- JEFFREY WH, PLEDGER RJ, AAS P, HAGER S, COFFIN RB, VON HEVAN R, MITCHELL DL (1996) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 137, 283-291
- JOHNSON JL (1994) Similarity Analysis of DNAs. In: *Methods for general and molecular bacteriology* (Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds). American Society for Microbiology, Massachusetts, pp 655-682
- JUNI E (1992) The genus *Psychrobacter*. In: *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds). Springer, New York, pp 3241-3246
- KAPRELYANTS AS, GOTTSCHAL JC, KELL DB (1993) Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 104, 271-286
- KARSTEN U, GARCIA-PICHEL F (1996) Chemosystematics of *Microcoleus* (Cyanobacteria): phyco-bilins, carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds. *Syst Appl Microbiol* 19: 285-294
- KATAYAMA Y, HIRAISHI A, KURAISHI H (1995) *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiol* 141, 1469-1477
- KIØRBOE T (2001) Formation and fate of marine snow: small-scale processes with large-scale implications. *Sci Mar* 65, 57-71
- KIRCHMAN DL (2000) Preface. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp vii-viii
- KIRCHMAN DL (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 91-100
-

- 
- KIRCHMAN DL, WILLIAMS PJ LE B (2000) Introduction. In: Microbial ecology of the oceans (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 1-11
- KIS M, ZSIROS O, FARKAS T, WADA H, NAGY F, GOMBOS Z (1998) Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. Proc Natl Acad Sci 95, 4209-4214
- KLEIN W, WEBER MHW, MARAHIEL MA (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: iso-leucin-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. J Bacteriol 181, 5341-5349
- KNAUER GA, HEBEL D, CIPRIANO F (1982) Marine snow: major site of primary production in coastal waters. Nature 300, 630-631
- KOCUR M (1984) Genus *Paracoccus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg NR, Holt JG, eds). Williams & Wilkins, Baltimore, pp 399-402
- KÖNNEKE M (2001) Untersuchung der zellularen Fettsäuren von sulfatreduzierenden Bakterien aus kalten, marinen Sedimenten. Dissertation, Universität Bremen, Germany
- KOIKE I, HARA S, TERAUCHI, K, KOGURE K (1990) Role of sub-micrometre particles in the ocean. Nature 345, 242-244
- KUHLMANN AU, BREMER E (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp.. Appl Environ Microbiol 68, 772-783
- LABARE MP, GUTHRIE K, WEINER RM (1989) Polysaccharide exopolymer adhesives from periphytic marine bacteria. J Adhesion Sci Technol 3: 213-223
- LABRENZ M (1999) Charakterisierung ausgesuchter antarktischer Bakterien: ökologische Ansprüche von Stämmen aus einem hypersalinen See und Versuche zur Identifizierung potentiell anthropogener Bodenisolat. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Germany
- LABRENZ M, COLLINS MD, LAWSON PA, TINDALL BJ, BRAKER G, HIRSCH P (1998) *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho Lake. Int J Syst Bacteriol 48, 1363-1372
- LAMPERT W (1978) Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. Limnol Oceanogr 23, 831-834
- LAMPITT RS (1998) Snow falls in the open ocean. In: Oceanography: an illustrated guide (Summerhayes CP, Thorpe SA, eds). Manson Publishing, London, UK, 2<sup>nd</sup> impression, pp 96-112
- LANE DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackebrandt E, Goodfellow M, eds). John Wiley, Chichester, pp 115-175
- LAUER A (2001) Diversität und Dynamik nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien-gruppen eines Ackerbodens. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany
- LECHEVALIER MP (1977) Lipids in bacterial taxonomy – a taxonomist's view. Crit Rev Microbiol 5, 109-210
- LEE SH, KANG YC, FUHRMAN JA (1995) Imperfect retention of natural bacterioplankton cells by glass fibre filters. Mar Ecol Prog Ser 119, 285-290
- LEHMANN WD (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- LEIS AP, SCHNEIDER RP (1999) The role of conditioning films in the attachment of biofouling bacteria. Abstract for the 10<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, [www.dst.defence.gov.au/corporate/conferences/icmcf/fullabstractsL-Z.html](http://www.dst.defence.gov.au/corporate/conferences/icmcf/fullabstractsL-Z.html)
-

- 
- LONG RA, AZAM F (1996) Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat Microb Ecol* 10, 213-221
- LONG RA, AZAM F (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67, 4975-4983
- LOTTSPEICH F, ZORBAS H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Heidelberg
- LUDWIG W, STRUNK O, WESTRAM R, RICHTER L, MEIER H, YADHUKUMAR, BUCHNER A, LAI T, STEPPI S, JOBB G, FÖRSTER W, BRETTSCHE I, GERBER S, GINHART AW, GROSS O, GRUMANN S, HERMANN S, JOST R, KÖNIG A, LISS T, LÜBMANN R, MAY M, NONHOFF B, REICHEL B, STREHLOW R, STAMATAKIS A, STUCKMANN N, VILBIG A, LENKE M, LUDWIG T, BODE A, SCHLEIFER KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32, 1363-1371
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J (2000) *Brock – Biology of microorganisms*. 9<sup>th</sup> edition. Prentice Hall International Inc., New Jersey
- MANCUSO NICHOLS CA, GARON S, BOWMAN JP, RAGUÉNÈS G, GUÉZENNEC J (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J Appl Microbiol* 96, 1057-1066
- MANZ W, AMANN R, LUDWIG W, WAGNER M, SCHLEIFER KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15, 593-600
- MANZ W, AMANN R, LUDWIG W, VANCANNEYT M, SCHLEIFER KH (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* 142: 1097-1106
- MARMUR J, DOTY P (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Molec Biol* 3: 585-594
- MASSANA R, MURRAY AE, PRESTON CM, DELONG EF (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* 63, 50-56
- MEIER H, AMANN R, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C-content. *Syst Appl Microbiol* 22: 186-196
- MESBAH M, PREMACHANDRAN U, WHITMAN WB (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39: 159-167
- MEYER SP (2000) Developments in aquatic microbiology. *Internatl Microbiol* 3, 203-211
- MICHAUD L, DI CELLO F, BRILLI M, FANI R, GIUDICE AL, BRUNI V (2004) Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiol Lett* 230, 63-71
- MIKHAILOV VV, ROMANENKO LA, IVANOVA EP (2002) The genus *Alteromonas* and related Proteobacteria. In: *The Prokaryotes* (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>), release 3.10
- MOESENEDER MM, WINTER C, HERNDL GJ (2001) Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnol Oceanogr* 46, 95-107
-

- 
- MOORE E, ARNSCHEIDT A, KRÜGER A, STRÖMPL C, MAU M (1999) Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: Molecular Microbial Ecology Manual (Akkermans ADL, Van Elsas JD, De Bruijn FJ, eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1.6.1/1-1.6.1/15
- MORAN MA, ZEPP RG (2000) UV radiation effects on microbes and microbial processes. In: Microbial ecology of the oceans (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 201-228
- MÜLLER HJ (2001) PCR Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- MÜLLER-NIKLAS G, SCHUSTER S, KALTENBÖCK E, HERNDL GJ (1994) Organic content and bacterial metabolism in amorphous aggregations of the northern Adriatic Sea. *Limnol Oceanogr* 39, 58-68
- MÜNSTER U, CHRÓST RJ (1990) Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: Aquatic microbial ecology: biomechanical and molecular approaches (Overbeck J, Chróst RJ, eds) Springer, New York, pp 8-46
- MULLINS TD, BRITSCHGI TB, KREST RL, GIOVANNONI SJ (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Oceanogr* 40, 148-158
- NAGL W (1981) Elektronenmikroskopische Laborpraxis. Springer, Berlin
- NEEF A (1997) Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Dissertation, Technische Universität München, Germany
- NEILAN BA (1995) Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol* 61: 2286-2291
- NICHOLS DS, BROWN JL, NICHOLS PD, McMEEKIN TA (1997) Production of eicosapentaenoic and arachidonic acids by an antarctic bacterium: response to growth temperature. *FEMS Microbiol Lett* 152, 349-354
- NICOLAUS B, MANCA MC, LAMA L, ESPOSITO E, GAMBACORTA A (2001) Lipid modulation by environmental stresses in two models of extremophiles isolated from Antarctica. *Polar Biol* 24, 1-8
- NIELSEN PH, JAHN A (1999) Extraction of EPS. In: Microbial extracellular polymeric substances – Characterization, structure and function (Wingender J, Neu TR, Flemming HC, eds). Springer, Berlin, p 49-72
- OHARA M, KATAYAMA Y, TSUZAKI M, NAKAMOTO S, KURAISHI H (1990) *Paracoccus kocurii* sp. nov., a tetramethylammonium-assimilating bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 40: 292-296
- OLSEN GJ, LANE DJ, GIOVANNONI SJ, PACE NR, STAHL DA (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 40, 337-365
- OTT J (1988) Meereskunde: Einführung in die Geographie und Biologie der Ozeane. Ulmer, Stuttgart
- PACE NR, STAHL DA, LANE DL, OLSEN GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In: Advances in microbial ecology, vol 9 (Marshall KC, ed). Plenum Press, New York, pp 1-55
- PASSOW U, ALLDREDGE AL, LOGAN BE (1994) The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Res* 41, 335-357
-

- 
- PASSOW U, ALLDREDGE AL (1994) Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 113, 185-198
- PEMBREY RS, MARSHALL KC, SCHNEIDER RP (1999) Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microbiol* 65, 2877-2894
- PFENNIG N, WAGENER S (1986) An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J Microbiol Meth* 4: 303-306
- PINHASSI J, ZWEIFEL UL, HAGSTRÖM Å (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63, 3359-3366
- PLOUG H, GROSSART HP, AZAM F, JØRGENSEN BB (1999) Photosynthesis, respiration, and carbon turnover in sinking marine snow from surface waters of Southern California Bight: implications for the carbon cycle in the ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 179, 1-11
- PORADA M (2000) Mikrobielle Oxidation eines methanolhaltigen Destillationssumpfes unter Einsatz methylother Organismen. Diplomarbeit, Universität Bremen, Germany
- PRESTON-MAFHAM J, BODDY L, RANDERSON PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiol Ecol* 42, 1-14
- PUKALL R, BUNTEFUß D, FRÜHLING A, ROHDE M, KROPPESTEDT RM, BURGHARDT J, LEBARON P, BERNARD L, STACKEBRANDT E (1999) *Sulfitobacter mediterraneus* sp. nov., a new sulfite-oxidizing member of the  $\alpha$ -Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 49: 513-519
- RABENSTEIN A (1997) Untersuchungen zu physiologischen und biochemischen Veränderungen bei Cyanobakterien unter dem Einfluss von anorganischen Schwefelverbindungen. Dissertation, Universität Bremen, Germany
- RADJASA OK, URAKAWA H, KITA-TSUKAMOTO K, OHWADA K (2001) Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. *Mar Biotechnol* 3, 454-462
- RAPPÉ MS, KEMP PF, GIOVANNONI SJ (1997) Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol Oceanogr* 42, 811-826
- RATH J, WU KY, HERNDL GJ, DELONG EF (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat Microb Ecol* 14, 261-269
- REHNSTAM AS, BÄCKMAN S, SMITH D, AZAM F, HAGSTRÖM Å (1993) Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiol Lett* 102, 161-166
- REICHENBACH H (1992) The order Cytophagales. In: *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds). Springer, New York, pp 3631-3675
- RIEBESSELL U (1992) The formation of large marine snow and its sustained residence time in surface waters. *Limnol Oceanogr* 37, 63-76
- RIEMANN L, STEWARD GF, AZAM F (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environ Microbiol* 66, 578-587
- RIEMANN L, WINDING A (2001) Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb Ecol* 42, 274-285
- RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY JB, HERDMAN M, STANIER RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61
-

- ROLLER C, WAGNER M, AMANN R, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1994) In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C-content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140: 2849-2858
- ROMANENKO LA, SCHUMANN P, ROHDE M, LYSENKO AM, MIKHAILOV VV, STACKEBRANDT E (2002) *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1291-1297
- ROSSELLÓ-MORA R, AMANN R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67
- ROSZAK DB, COLWELL RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51, 365-379
- RÜGER HJ (1993) Isolierung und Identifizierung benthischer Bakterien. In: *Mikrobiologie des Meeresbodens* (Meyer-Reil LA, Köster M, eds). Gustav Fischer, Stuttgart, pp 121-143
- RÜGER HJ, KRAMBECK HJ (1994) Evaluation of the BIOLOG substrate metabolism system for classification of marine bacteria. *Syst Appl Microbiol* 17, 281-288
- RUSSELL NJ, NICHOLS DS (1999) Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiol* 145, 767-779
- SATO T, OSE Y (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Wat Res* 14: 333-338
- SAWABE T, TANAKA R, IQBAL MM, TAJIMA K, EZURA Y, IVANOVA EP, CHRISTEN R (2000) Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 265-271
- SCHLEGEL HG (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart
- SCHMIDT TM, DELONG EF, PACE NR (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 173, 4371-4378
- SCHUT F, DE VRIES EJ, GOTTSCHAL JC, ROBERTSON BR, HARDER W, PRINS RA, BUTTON DK (1993) Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol* 59, 2150-2160
- SCHUT F, PRINS RA, GOTTSCHAL JC (1997) Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat Microb Ecol* 12, 177-202
- SCHWEITZER B, HUBER I, AMANN R, LUDWIG W, SIMON M (2001)  $\alpha$ - and  $\beta$ -*Proteobacteria* control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Appl Environ Microbiol* 67, 632-645
- SHANKS AL, TRENT JD (1979) Marine snow: microscale nutrient patches. *Limnol Oceanogr* 24, 850-854
- SHERR E, SHERR B (2000) Marine microbes: an overview. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 13-46
- SHIBA T (1992) The genus *Erythrobacter*. In: *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds). Springer, New York, pp 2485-2489
- SILLER H, RAINEY FA, STACKEBRANDT E, WINTER J (1996) Isolation and characterization of a new Gram-negative, acetone-degrading, nitrate-reducing bacterium from soil, *Paracoccus solventivorans* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1125-1130

- 
- SIMON M, GLÖCKNER FO, AMANN R (1999) Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquat Microb Ecol* 18, 275-284
- SLY LI, BLACKALL LL, KRAAT PC, TIAN-SHEN T, SANGKHOBOL V (1986) The use of second derivative plots for the determination of mol% guanine plus cytosine of DNA by the thermal denaturation method. *J Microb Meth* 5: 139-156
- SMITH DC, SIMON M, ALLDREDGE AL, AZAM F (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359, 139-142
- SOROKIN DY (1995) *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. – a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation. *Mikrobiologiya* 64, 354-365 (English translation, 295-305)
- STACKEBRANDT E, GOEBEL BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849
- STAHL DA, AMANN R (1991) Development and application of nucleic acid probes. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E, Goodfellow M, eds). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 205-248
- STALEY JT, KONOPKA A (1985) Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39, 321-346
- STROM SL (2000) Bacterivory: interactions between bacteria and their grazers. In: *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman DL, ed). Wiley-Liss, New York, pp 351-386
- STROM SL, BENNER R, ZIEGLER S, DAGG MJ (1997) Planktonic grazers are a potentially important source of marine dissolved organic carbon. *Limnol Oceanogr* 42, 1364-1374
- SÜBMUTH R, EBERSPÄCHER J, HAAG R, SPRINGER W (1999) *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart
- SUZUKI MT, RAPPÉ MS, HAIMBERGER ZW, WINFIELD H, ADAIR N, STRÖBEL J, GIOVANNONI SJ (1997) Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl Environ Microbiol* 63, 983-989
- SUZUKI MT, PRESTON CM, CHAVEZ FP, DELONG EF (2001) Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. *Aquat Microb Ecol* 24, 117-127
- SWOFFORD DL (2002) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4b10. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts
- SWOFFORD DL, OLSEN GJ, WADDELL PJ, HILLIS DM (1996) Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics*, 2<sup>nd</sup> ed (Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp 407-514
- TAKAICHI S, SHIMADA K, ISHIDSU JI (1988) Monocyclic cross-conjugated carotenal from an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*. *Phytochem* 27, 3605-3609
- TAKAICHI S, SHIMADA K, ISHIDSU JI (1990) Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*:  $\beta$ -Carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch Microbiol* 153, 118-122
- TRÜPER HG, PFENNIG N (1992) The family Chlorobiaceae. In: *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds). Springer, New York, pp 3583-3592
-

- 
- TRUU J, TALPSEP E, HEINARU E, STOTTMEISTER U, WAND H, HEINARU A (1999) Comparison of API 20 NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. *J Microbiol Meth* 36, 193-201
- UNANUE M, AYO B, AZÚA I, BARCINA I, IRIBERRI J (1992) Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microb Ecol* 23, 27-39
- VANEECHOUTTE M, ROSSAU R, DE VOS P, GILLIS M, JANSSENS D, PAEPE N, DE ROUCK A, FIERS T, CLAEYS G, KERSTERS K (1992) Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* 93: 227-234
- VAN TRAPPEN S, MERGAERT J, SWINGS J (in press) *Loktanella fryxellensis* gen. nov., sp. nov., *Loktanella vestfoldensis* sp. nov. and *Loktanella salsilacus* sp. nov., new members of the *Roseobacter* clade, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol*
- VINCENT WF (1988) *Microbial ecosystem of Antarctica*. Cambridge University Press, Cambridge
- VOGT C (1997) Untersuchungen zum Metabolismus von DMS und verwandter Verbindungen durch phototrophe Bakterien. Dissertation, Universität Bremen, Germany
- WAGNER M, SCHMID M, JURETSCHKO S, TREBESIU KH, BUBERT A, GOEBEL W, SCHLEIFER KH (1998) In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Letters* 160: 159-168
- WAYNE LG, BRENNER DJ, COLWELL RR, GRIMONT PAD, KANDLER O, KRICHEVSKY MI, MOORE LH, MOORE WEC, MURRAY RGE, STACKEBRANDT E, STARR MP, TRÜPER HG (1987) Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463-464
- WEBSTER NS, WILSON KJ, BLACKALL LL, HILL RT (2001) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* 67, 434-444
- WEISS P, SCHWEITZER B, AMANN R, SIMON M (1996) Identification *in situ* and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl Environ Microbiol* 62, 1998-2005
- WELLS ML (1998) A neglected dimension. *Nature* 391, 530-531
- WELLS ML, GOLDBERG ED (1991) Occurrence of small colloids in sea water. *Nature* 353, 342-344
- WHITMAN WB, COLEMAN DC, WIEBE WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6578-6583
- WILLIAMS PJ le B (1981) Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch Suppl* 5, 1-28
- WITZEL KP (1990) Approaches to bacterial population dynamics. In: *Aquatic microbial ecology: biomechanical and molecular approaches* (Overbeck J, Chróst RJ, eds) Springer, New York, pp 96-128
- WOESE CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271
- WORM J, GUSTAVSON K, GARDE K, BORCH NH, SØNDERGAARD M (2001) Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. *Aquat Microb Ecol* 25, 103-111
-

- WRANGSTADH M, SZEZYK U, OSTLING J, KJELLEBERG S (1990) Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9. *Appl Environ Microbiol* 56, 2065-2072
- WRIGHT TD, VERGIN KL, BOYD PW, GIOVANNONI SJ (1997) A novel  $\delta$ -subdivision proteobacterial lineage from the lower ocean surface layer. *Appl Environ Microbiol* 63, 1441-1448
- YUMOTO I, HIROTA K, SOGABE Y, NODASAKA Y, YOKOTA Y, HOSHINO T (2003) *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipase-producing new fakultative psychrophile isolated from the coast of Okhotsk Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1985-1989
- ZAVARZIN GA, STACKEBRANDT E, MURRAY RG (1991) A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can J Microbiol* 37, 1-6
- ZWEIFEL UL, HAGSTRÖM Å (1995) Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl Environ Microbiol* 61, 2180-2185

## 8 Publikationsliste

1. **Berkenheger I, Heuchert A, de Silva S, Fischer U** (2004) Heterotrophic particle-associated bacteria from the South Atlantic: a community of marine microorganisms with a high organic carbon degradation potential. In: The South Atlantic in the late quaternary: reconstruction of material budgets and current systems (Wefer G, Mulitza S, Ratmeyer V, eds). Springer-Verlag Berlin, pp 65-79
2. **Heuchert A, Glöckner FO, Amann R, Fischer U** (2004) *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica). Syst Appl Microbiol 27, 399-406

1.

**Heterotrophic particle-associated bacteria from the South Atlantic: a community of marine microorganisms with a high organic carbon degradation potential**

Imke Berkenheger, Anja Heuchert, Sadana de Silva, Ulrich Fischer

In: The South Atlantic in the late quaternary: reconstruction of material budgets and current systems (Wefer G, Mulitza S, Ratmeyer V, eds). Springer-Verlag Berlin, pp 65-79 (2004)

# Heterotrophic Particle-Associated Bacteria from the South Atlantic: A Community of Marine Microorganisms with a High Organic Carbon Degradation Potential

I. Berkenheger\*, A. Heuchert, S. de Silva and U. Fischer

*Universität Bremen, Fachbereich Biologie/Chemie, Zentrum für Umweltforschung  
und Umwelttechnologie (UFT), Abt. Marine Mikrobiologie, Leobener Straße,  
28359 Bremen, Germany*

*\* corresponding author (e-mail): imke@biotec.uni-bremen.de*

**Abstract:** Samples of the Equatorial Atlantic (EA) and the South Atlantic/Antarctica (SA) were taken during two cruises with RV *Meteor* in 1996 and 1997 and one cruise with RV *Polarstern* in 1998 in order to study the bacterial communities attached to organic particles. Ten heterotrophic bacterial strains, isolated from particles of the EA, and 11 strains, isolated from particles of the SA, were chosen for further investigations. All isolates are Gram-negative rods, which differ strongly in their ability to metabolize high and low molecular weight organic compounds (polysaccharides, di- and monosaccharides, organic acids). The phylogenetic composition of the bacterial communities on sinking particles was investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and 16S rDNA-sequencing. In both investigation areas, members of the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subclass of Proteobacteria and also of the *Cytophaga/Flavobacteria*-cluster were detected. The genus *Sulfitobacter* was present in both investigation areas, whereas other genera such as *Marinobacter* and *Psychrobacter* could each be found on only one sampling site.

## Introduction

Macroscopic aggregates (marine snow, particles > 0.5 mm in size) are the dominant fraction involved in the transport of biogenic carbon from the surface water to the deep-sea bottom (Alldredge and Silver 1988).

Marine snow shows highly variable physical characteristics, appearance, and composition. The aggregates originate from two general pathways of formation (Alldredge and Silver 1988): (a) particles can be produced *de novo* by plants and mucus feeding webs of zooplankton, and (b) particles result from the biologically-enhanced physical aggregation of smaller particles (e.g. micro-aggregates, fecal pellets). In the senescent phase of the phytoplankton bloom, the cell surface becomes sticky due to the release of polysaccharides, and then single phytoplankton cells aggregate (Iriberry and Herndl 1995).

Meanwhile, several new classes of organic particles of smaller size (from 20 nm to hundreds of micrometers) have been discovered, hence changing the ideas of the physical and chemical nature of the particle field with which pelagic bacteria interact (Long and Azam 1996; Azam 1998). These smaller particles were 2 to 3 orders of magnitude more abundant than large particles and their components are polysaccharides, transparent exopolymer particles (TEP), or proteins (Alldredge et al. 1993; Long and Azam 1996).

TEP are highly significant components of marine aggregates, form the matrix of marine snow, and serve as substrates and microhabitats which provide attached bacteria with physical refuges from predators unable to feed on surfaces. Investigations of marine snow samples collected off coastal California showed that 24-68% of the bac-

teria in seawater samples were attached to TEP (Alldredge et al. 1993).

All aggregates have higher concentrations of nutrients and show elevated microbial activities in comparison to the surrounding water (Shanks and Trent 1979; Caron et al. 1982; Azam et al. 1993). Their degradation is characterized by microbial succession in which auto- and heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa are involved (Biddanda and Pomeroy 1988; Iriberry and Herndl 1995). The particle-associated microbial communities undergo complex successional changes which significantly alter the chemical and biological properties of the particles. Rates of particle production and breakdown are difficult to predict flux and to understand biological community structure and transformations of matter and energy in the water column (Alldredge and Silver 1988). Aggregates provide enriched microenvironments of organic matter in the oligotrophic ocean and are in so far hotspots of microbial respiration which cause a fast and efficient respiratory turnover of particulate organic carbon in the sea (Caron et al. 1982; Azam 1998; Ploug et al. 1999). Marine snow is a microhabitat highly enriched in phytoplankton, bacteria, flagellates and detritus compared to the surrounding water (Ploug et al. 1999). In both habitats, different bacterial populations developed concerning their metabolic, morphological and biochemical properties. More rod-like and in general larger bacteria exist on the aggregates than in the surrounding water (Alldredge et al. 1986), and phylogenetic differences exist, as well. Associated heterotrophic bacteria could be classified as *Cytophaga/Flavobacteria*, *Planctomyces*, or  $\gamma$ -Proteobacteria, whereas most of the free-living bacteria could be classified as  $\alpha$ -Proteobacteria and some as  $\gamma$ -Proteobacteria (DeLong et al. 1993; Rath et al. 1998; Schweitzer et al. 2001). Acinas et al. (1999) showed a very low diversity of attached bacteria-assemblages from the Mediterranean Sea, which consist only of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria.

Fukami and coworkers (1981) found high abundances of species of the *Cytophaga/Flavobacteria*-group on particles. Members of this branch are able to degrade a large spectrum of polymers (proteins, polysaccharides, chitin, nucleic acids) and

some species are well-known for their ability of surface-associated gliding motility and the production of hydrolytic exoenzymes. In the decomposition of marine phytoplankton, the change of the population structure correlates with the ability of degrading high-molecular organic components. Laboratory investigations on the microbial degradation of chitin over a long period have shown a decrease of attached bacteria, whereas the number of free-living bacteria increased (Kirchner 1995). While particle-associated bacteria are able to solubilize more dissolved organic matter (DOM) than they can actually consume, free-living bacteria can benefit from the DOM pool cleaved by the attached bacterial community (Karner and Herndl 1992).

It is known that, in spite of better cultivation conditions, usually only a small part of bacteria (often less than 1%) of a natural marine sample can be cultivated with conventional cultivation approaches. Molecular methods, such as sequencing of 16S rDNA or fluorescence *in situ* hybridization (FISH), may help to solve this problem. Because of better fluorescent dyes (e.g. CY3, a very sensitive carbocyanine-dye), FISH enables identification of routinely more than 50% of the cells even in oligotrophic aquatic samples in which the visualization of small cells with low numbers of ribosomes had been problematic so far (Amann et al. 1997). But there is still a need of classical methods for a better identification and comparison of microorganisms (Rüger 1993).

It was the aim of this study to describe and characterize the bacterial community attached to sinking particles in the Equatorial Atlantic and in the South Atlantic (Antarctica). Since there exists nearly no information about the examined habitats concerning bacterial abundances, it was necessary to determine the most densely populated layer first. Then, bacterial strains could be isolated from particles, representing typical microorganisms of these habitats. In order to study the microbial decomposition potential of sinking aggregates, which depends upon multiple interacting factors, the isolated strains were investigated with classical, modern microbiological, and molecular-biological methods concerning their physiological and phylogenetic properties.

## Sampling Site

Seawater samples were taken in the Equatorial Atlantic (EA) and in the South Atlantic/Antarctica (SA) during two cruises with RV *Meteor* in 1996 and 1997 (stations 3906-3, 3907-3, 3908-10, 3925-4, 4301-10, 4302-2, 4303-3, 4305-5 and 4318-8) and one cruise with RV *Polarstern* in 1998 (stations 49/020/1 and 49/088/2). The sampling sites (Fig. 1) differ significantly in their grade of eutrophication. Stations 4301-10 (north of Gran Canaria), 4302-2 (Cape Blanc) and 4303-3 (south of Cape Verde Islands) represent habitats in an eutrophic upwelling zone in the eastern EA, stations 3906-3, 3907-3, 3908-10, and 4318-8 stand for oligotrophic areas in the western EA (continental slope off Northern Brazil). The sampling sites in the SA were chosen to investigate the influence of the water temperature on the composition of the attached bacterial community and physiological properties of single isolates.

## Methods

*Water sampling and cell count.* Water samples were taken using 10 l Niskin-bottle water samplers (Hydrobios, Kiel, Germany) and portions of 20 ml were fixed with formaldehyde (2% v/v). Two ml of such preserved samples were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) as described by Grossart (1995). Total cell counts were determined by epifluorescence microscopy (Zeiss Axiolab) equipped with a filterset for DAPI (filterset 02, Zeiss, Germany). For each sample, at least 100 fields (14,4 mm<sup>2</sup>) were counted.

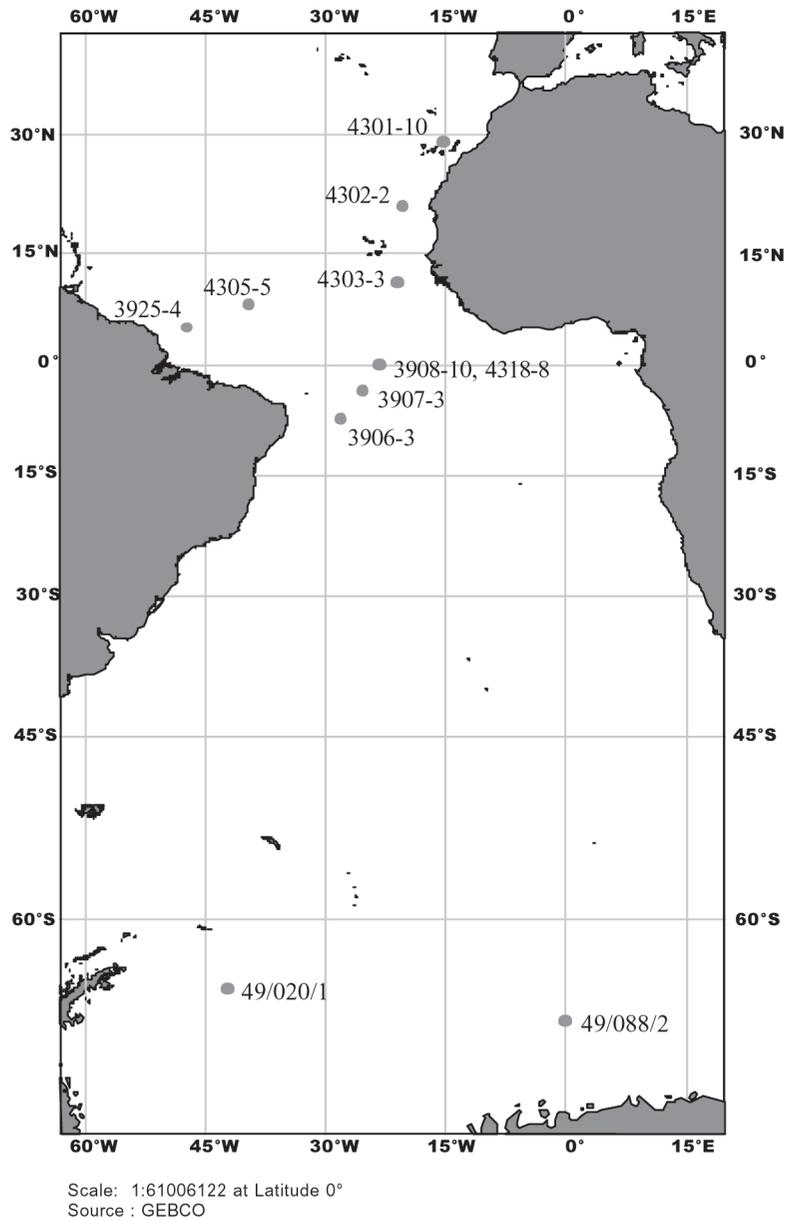
*Isolation of bacteria.* Water samples from 50 m waterdepth of stations 4301-10 and 4318-8 (EA) were filtered using Isopore membranes (2.5 cm in diameter, 10 µm pore-size, Millipore, Eschborn, Germany), which were then transferred into sterile seawater, gently shaken to suspend the aggregates, and stored at 4 °C on board of the RV and in the lab until cultivation. Dilution series up to 10<sup>5</sup> were made with these aggregate suspensions in order to isolate dominant species. Agar plates with ASN<sub>III</sub> medium (Rippka et al. 1979) were used as isolation medium (3.3-3.7% salinity) with the following modification: citric acid and EDTA were

omitted, but 0,1% w/v yeast extract, trace elements SL10 (Trüper and Pfennig 1992), a 7 vitamin-solution (Vogt, 1997), 0.05% w/v actidione, and 2% agar were added. Plates were inoculated with material from the highest dilution rate and incubated at 19 °C (station 4301-10) and 27 °C (station 4318-8) up to two weeks.

Water samples from Antarctica were also taken using 10 l Niskin-bottle water samplers. Water samples from 20 m waterdepth were filtrated either through polycarbonate membranes with 10 µm pore size (station 49/020/1) or with 5 µm pore size (station 49/088/2). The filters were then transferred into sterile seawater and stored at -30 °C on board of the RV and at -18 °C in the lab until cultivation. 50 and 100 µl of each thawed sample were streaked onto ASN<sub>III</sub>-agar plates and incubated at 27 °C and nearly 0 °C up to four weeks.

Colonies were randomly picked and purification of isolates was performed by streaking a single-cell colony onto new agar plates. This procedure was repeated several times in order to get pure isolates. Plates were incubated in the dark at the same temperatures as described above.

*Utilization of substrates.* Since aggregates consist of different polymers, enzymatic activities of cellulase, gelatinase, amylase, lecithinase and DNase were tested by streaking the isolates on artificial seawater agar plates (ASN<sub>III</sub> with 0.1% w/v yeast extract, supplemented with either 1% w/v cellulose, 0.4% w/v gelatin, 2% w/v starch, 5% w/v egg yolk emulsion or 0.2% w/v DNA and 0.005% w/v methylgreen, respectively). Cellulase activity of the EA isolates was tested by streaking them onto agar plates with ASN<sub>III</sub> and cellulose (1% w/v) as sole carbon source. The plates were incubated at 27 °C for 4-6 days. Cellulose hydrolysis resulted in clear zones (SA) or forming of colonies (EA) on the agar plates, while lecithinase was detectable by its appearance of cloudy precipitations (modified after Gerhardt et al. 1994). Starch hydrolysis was documented using Lugol's iodine solution forming colorless areas around the growth, and gelatin degradation by using picric acid to visualize unhydrolyzed polymers (modified after Süßmuth et al. 1999). DNA hydrolysis was analyzed treating the plates with 2 M HCl to reveal undigested DNA (modified after Smith et al. 1969).



**Fig.1.** Sampling sites of two cruises with RV *Meteor* in spring 1996 (stations 3906-3, 3907-3, 3908-10 and 3925-4) and spring 1997 (stations 4301-10, 4302-2, 4303-3, 4305-5 and 4318-8) and one cruise with RV *Polarstern* in spring 1998 (stations 49/020/1 and 49/088/2).

Utilization of low molecular weight organic compounds such as sugars, organic – or amino acids as sole carbon sources for growth was examined by following the increase of the optical density at 600 nm. ASN<sub>III</sub>-medium without yeast and Fe-NH<sub>4</sub>-citrate served as basic growth medium.

Activity of exoenzymes (amylase, DNase, and protease) in dependence of temperature was docu-

mented by measuring the clear zones on agar plates (methods as described above, protease was estimated as reported by Frazier and Rupp 1928 and modified after Brand 1939) after incubating at 5, 27, and 30 °C. The influence of salinity was investigated with NaCl concentrations ranging from 0.5 to 10%. The pH-optimum was detected by incubating the organisms between pH 5 and pH 10.

BIOLOG GN microtiter plates (Biolog, Hayward, USA) were inoculated with the following mixtures of strains (in equal amounts): i) all 10 EA isolates, ii) strains 4301-10/1, 4301-10/2, 4301-10/3, 4301-10/4, 4301-10/5, 4301-10/6 and iii) strains 4318-8/1, 4318-8/2, 4318-8/4, 4318-8/7. The plates were incubated at 27 °C for 72 h.

**RAPD-PCR.** DNA was isolated with Qiagen Genomic-tips 100/G as described in the Qiagen Genomic DNA Handbook (1997). The genomic DNA was amplified by using *Taq* Polymerase (1.25 U, REDTaq™, Sigma-Aldrich Co.). Bacterial primers CRA22 (5'-CCGCAGCCAA-3') and CRA23 (5'-GCGATCCCCA-3') were used for amplification (Neilan, 1995).

**ARDRA.** Genomic DNA (isolation as described above) was amplified using REDTaq™ and the bacterial primers 10-30F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCGA-3') and 1542R (5'-AGAAAGGAG GTGATCCARCC-3'). The amplification mixture consisted of 25-30 ng template DNA, 0.4 µM of each primer, 200 µM dNTP-Mix, 4 µl bovine serum albumin (2 mg/ml), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 11 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% gelatin), 2 U REDTaq Polymerase and sterile water to a final volume of 50 µl. The PCR products (5 µl) were digested for 1 h at 37 °C with 3 U of the following restriction enzymes each, recognizing four bp sites: *Hin*6I, *Alu*I, *Hpa*II, *Bsh*1236I, *Bsu*RI, and *Mbo*I, 1 µl reaction buffer (MBI Fermentas), and sterile water to a final volume of 10 µl. Amplification was performed with a Biometra Personal Cycler™. Thermal cycling conditions consisted of a hot start (95 °C for 5 min) and a cooling down to 85 °C, followed by 30 cycles of denaturing (93 °C, 30 s), annealing (52 °C, 30 s), and extension steps (72 °C, 60 s). Afterwards, a final polymerization for 5 min at 72 °C was performed. The patterns were analyzed in a 2% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide.

**FISH.** Formaldehyde-fixed (7% final concentration) cells from a single colony of each isolate were transferred onto Teflon-coated microscope slides and immobilized by drying at 46 °C. After dehydration and fixation with 50, 80, and 96% (v/v) ethanol, slide-fixed cells were hybridized with oligonucleotide probes EUB338 (5'-GCTGCCT

CCCGTAGGAGT-3'), ARCH915 (5'-GTGCTCC CCCGCCAATTCCT-3'), CF319a (5'-TGGTCCG TGTCTCAGTAC-3'), ALF968 (5'-GGTAAGGT TCTGCGCGTT-3'), BET42a (5'-GCCTTCCCA CTTCGTTT-3'), and GAM42a (5'-GCCTTCCCA CATCGTTT-3') (modified after Eilers et al. 2000). All probes were CY3-labeled and synthesized by Interactiva (Ulm, Germany). The cells were counter-stained with DAPI (1 µg/ml) and incubated for 5 min in the dark. After washing (70% ethanol, aqua bidest.) and air drying, the slides were mounted with a 5:1 (v/v) mixture of Citifluor AF1 (Citifluor, London, UK) and Vectashield (Linaris, Wertheim, Germany). The evaluation was performed by an epifluorescence microscope (Zeiss Axiolab) with filtersets for DAPI (see above) and CY3 (Chroma HQ 41007).

**16S rDNA sequencing.** Isolation of DNA, bacterial primers and amplification were the same as described above. PCR amplification was confirmed via gel electrophoresis with a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products were purified with QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) and desalted by using 0.025 µm nitrocellulose filters (Millipore). Sequencing was conducted with the bacterial primers 10-30F (5'-AGAGTTTG ATCMTGGCTCGA-3') and 518F (5'-CCAGCAG CCGCGTAAT-3') by MWG Biotech, Germany. For each sequence, the closest relative was determined by comparison to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## Results and Discussion

### *Abundances of Free Living Bacteria*

In order to define the layer with the highest microbial density, the abundances of free-living bacteria in the upper 250 m of the watercolumn were estimated by staining with DAPI. The results are summarized in Table 1. The highest abundances were found in a waterdepth of 20 m (0.95 to 2.89 x 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>), with the exception of station 4301-10. At this station, the most densely populated layer was found at 100 m depth (0.59 x 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>).

Only little is known about the abundances of free-living bacteria in the Equatorial Atlantic de-

Station No.	Sampling site (Latitude/Longitude)	Date	Depth (m)	Temperature <sup>a</sup> (°C)	Total cell numbers (10 <sup>5</sup> ml <sup>-1</sup> )
3906-3	07°24.8'S/28°08.0'W	21.03.96	20	28.4	0.95 ± 0.3
			50	27.5	0.95 ± 0.4
			100	23.4	0.64 ± 0.2
			250	9.9	0.42 ± 0.2
3907-3	03°55.8'S/25°41.0'W	23.03.96	20	28.5	1.99 ± 0.5
			50	25.5	1.02 ± 0.4
			100	13.3	0.25 ± 0.2
			250	10.6	0.33 ± 0.2
3908-10	00°00.4'S/23°26.4'W	26.03.96	20	27.8	2.16 ± 0.9
			100	16.0	0.29 ± 0.1
			250	13.1	0.24 ± 0.3
3925-4	05°08.3'N/47°30.7'W	07.04.96	20	27.5	1.49 ± 0.5
			50	27.5	0.88 ± 0.5
			100	27.3	0.98 ± 0.4
			250	9.9	0.21 ± 0.2
4301-10	29°10.0'N/15°30.1'W	26.01.97	25	19.2	0.20 ± 0.1
			50	19.2	0.49 ± 0.3
			100	18.9	0.59 ± 0.3
			200	15.8	0.14 ± 0.1
4302-2	21°18.5'N/20°39.6'W	28.01.97	20	21.3	2.89 ± 0.7
			50	21.2	1.70 ± 0.6
			100	20.2	0.67 ± 0.3
			200	16.7	0.20 ± 0.1
4303-3	11°28.9'N/21°01.0'W	01.02.97	20	24.6	1.42 ± 0.5
			50	18.8	0.23 ± 0.2
			100	14.3	0.20 ± 0.2
			200	12.5	0.73 ± 0.3
4305-5	08°29.7'N/39°57.3'W	08.02.97	20	25.5	2.81 ± 0.6
			50	18.9	0.18 ± 0.2
			100	13.1	0.12 ± 0.1
			200	10.0	0.57 ± 0.1

<sup>a</sup> measured by CTD (Conductivity-Temperature-Depth) -profiler (Ratmeyer, 2002)

**Table 1.** Total cell numbers (DAPI cell counts) of free-living bacteria from seawater-samples of stations 3906-3, 3907-3, 3908-10 and 3925-4, taken in March/April 1996 (cruise M34/4) and stations 4301-10, 4302-2, 4303-3 and 4305-5, taken in January/February 1997 (cruise M38/1).

tected by direct counting. Eilers and coworkers (2000) found  $1.2 - 10.5 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in the North Sea near Helgoland, while Glöckner et al. (1999) detected  $0.7 - 1.6 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in the South Atlantic (Antarctica). Bacterial abundances in the

Pacific range from  $0.6 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> (Oregon Coast, Suzuki et al. 1993) to  $3 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> (Playa del Rey, Glöckner et al. 1999). All these data show 10fold higher cell numbers which could attribute to higher nutrient contents.

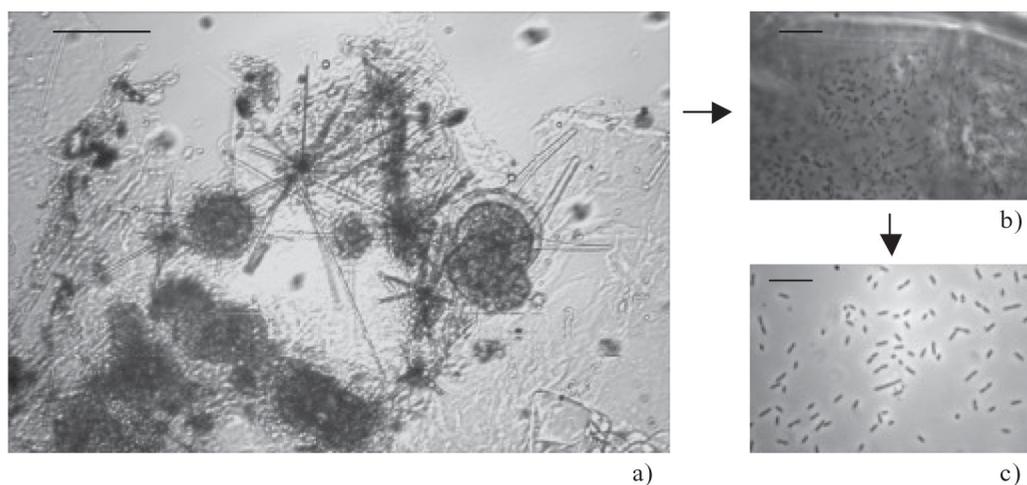
### *Morphological, Physiological and Taxonomical Properties of Particle-Associated Bacteria*

Twenty-one strains of heterotrophic bacteria were isolated from organic particles with sizes  $>10\ \mu\text{m}$  (see Fig. 2). Ten strains originated from stations 4301-10 and 4318-8 (EA) and eleven strains were isolated from stations 49/020/1 and 49/088/2 (SA). These isolates were taken for a comparative characterization of particle-associated bacteria.

**Morphology:** All of the 21 isolates are Gram-negative, rod-shaped ( $0.5 \times 1\text{--}20\ \mu\text{m}$ ) or more or less coccoid ( $0.7 \times 0.8\text{--}2\ \mu\text{m}$ ). Twelve strains showed motility on swarming agar. All isolates form colonies of similar shape (circular with convex or flat surface) on artificial seawater agar plates (ASN<sub>III</sub> plus 0.1% yeast extract). The pigmentation of the colonies varied from colorless to white, grayish, yellow or brown.

**Utilization of substrates:** The obtained isolates were examined with regard to their enzymatic equipment and ability to use different substances as sole carbon source (Tab. 2). All strains differ strongly in their capacity to metabolize high-molecular organic compounds such as starch and cellulose. As shown in Table 2, only one of the SA

strains (strain 88/2-1) and three of the EA ones (strains 4301-10/1, 4301-10/4 and 4301-10/5) can use starch and gelatin, while three of the SA isolates and four of the EA isolates metabolize only either starch or gelatin. Seven SA and three EA isolates are not able to use neither starch nor gelatin. Cellulose is metabolized by seven of the ten EA isolates (strains 4301-10/1, 4301-10/2, 4301-10/5, 4301-10/6, 4318-8/2, 4318-8/4 and 4318-8/7). Likewise, the isolates vary in their ability to metabolize different lower molecular weight compounds (organic acids, mono- and disaccharides or amino acids), which were offered in different concentrations (1 mM or 5 mM). The majority of the isolates shows better growth with the higher concentration. This is in agreement to Unanue and coworkers (1999), who found two different uptake systems for carbohydrates and proteins. The authors suggested that free-living bacteria should be adapted to low concentrations, while attached bacteria could operate efficiently at very high substrate concentrations. Strains 4301-10/2, 4301-10/5, 4301-10/4, 4301-10/7, 20/1-2, 20/1-3, and 20/1-4 can use nearly all organic compounds tested, while strain 88/2-4 uses only the lower molecular weight ones. Some isolates are very restricted in their enzymatic equipment and are only able to use one or two of the



**Fig. 2.** Photomicrographs of aggregates and attached bacteria from the Equatorial Atlantic demonstrating isolation of a single bacterial strain from a mixed culture. **a)** organic particle, consisting of zoo- and phytoplankton debris, bar = 100  $\mu\text{m}$ ; **b)** particle colonised with a bacterial community consisting of different bacterial cell types, bar = 10  $\mu\text{m}$ ; **c)** pure culture of strain 4301-10/1, isolated from particles, bar = 10  $\mu\text{m}$ .

Properties		Equatorial Atlantic strains									South Atlantic (Antarctica) strains												
		4301-10/1	4301-10/2	4301-10/3	4301-10/4	4301-10/5	4301-10/6	4318-8/1	4318-8/2	4318-8/4	4318-8/7	88/2-1	88/2-2	88/2-3	88/2-4	88/2-5	88/2-6	88/2-7	20/1-1	20/1-2	20/1-3	20/1-4	
Enzymes	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	
	Oxidase	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	
	Cellulase	+	+	-	-	+	+	-	(+)	(+)	+	n.t.	n.t.	-	-	n.t.	n.t.	-	n.t.	-	n.t.	n.t.	
	Gelatinase	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	n.t.	n.t.	
	Amylase	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	Lecithinase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	n.t.	n.t.	+	-	n.t.	n.t.	+	n.t.	+	n.t.	n.t.	
	DNase	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	n.t.	n.t.	-	-	n.t.	n.t.	-	n.t.	+	+	+	
Carbon sources	Acetate	-	+	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	-	+	(+)	n.t.	-	(+)	(+)	+	+		
	L-Alanine	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	n.t.	+	-	(+)	+	+		
	Cellobiose	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	n.t.	n.t.	
	Citrate	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	(+)	n.t.	-	(+)	+	+	+	
	Fructose	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	
	Glucose	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
	Glycogen	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	n.t.											
	Maltose	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Mannose	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-	
	Propionat	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
	Sucrose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	

- negative reaction, (+) weak reaction, + positive reaction, n.t. not tested

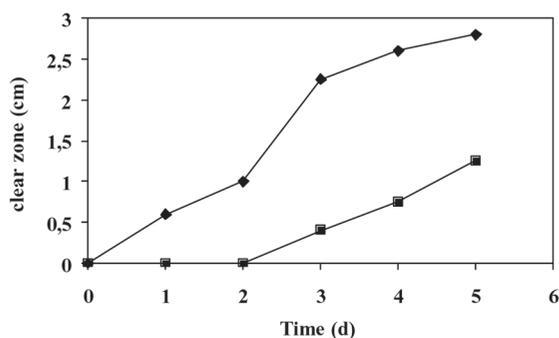
**Table 2.** Physiological investigations of 21 bacterial strains isolated from particles of *Meteor*-cruise M38/1 (EA 1997) and *Polarstern*-cruise ANT XV/4 (SA 1998).

offered carbon sources: strains 4301-10/4 (gelatin and starch), 88/2-2 (acetate), 88/2-3 (lecithin), and 88/2-7 (lecithin and alanine). Only one EA isolate (4301-10/1) utilizes sucrose as sole carbon source, while the majority of SA isolates is able to degrade this disaccharide.

Production of exoenzymes (amylase, DNase, and protease) in dependence of time, temperature, salinity, and pH was investigated with SA isolates 20/1-3 and 20/1-4. Hydrolysis of starch depending on the incubation time is shown in Figure 3. Isolate 20/1-4 exhibits amylase activity immediately, while isolate 20/1-3 needs a lag-time of two days until starch can be degraded. Amylase seems to be constitutively available in isolate 20/1-4, while it is synthesized *de novo* in isolate 20/1-3. Both isolates exhibit highest amylase activity at 30 °C, while that of isolate 20/1-3 is strongly inhibited at 5 °C. DNase activity of both isolates is highest at 27 °C, but is inhibited at 5 °C. The psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*, a mem-

ber of the same genus as isolate 20/1-3, shows highest amylase activities also at relative high temperatures between 30 and 40 °C (Feller et al. 1994). The production of extracellular protease, amylase, and DNase depends on the sodium chloride concentration in the medium. For both isolates, the decomposition of the substrates by these enzymes occurs between 1 and 3.5% NaCl (salinity of seawater). No amylase and DNase activity were found in the presence of 10% NaCl. High sodium chloride concentrations inhibit the production of enzymes, because they induce an instability (Cope land 1996). While isolate 20/1-3 prefers weak alkaline pH values (7-8) for optimal amylase activity, the other isolate needs weak acidic conditions (pH 6-7).

Additionally to the investigation of the metabolic properties of each individual isolate, experiments with defined mixed cultures were carried out using the BIOLOG-method, in order to examine bacterial community behavior. BIOLOG-plates (micro-



**Fig. 3.** Time dependent hydrolysis of starch by amylase excreted by the isolates 20/1-3 (■) and 20/1-4 (◆). Amylase activity is expressed by the clear zones (cm) formed (data taken from de Silva 2001).

titer plates with 95 different substrates, indicating a positive reaction by a change of color) were inoculated with three different mixed cultures: all six isolates from station 4301-10 (A), all four isolates from station 4318-8 (B), and all 10 isolates from both stations (C). It could be demonstrated that the culture-mixtures (A) and (B) had more positive reactions than single isolates and that the combined culture (C) had more positive reactions than the other two culture mixtures (A) and (B). These results suggest the existence of a synergistic behavior of aggregate-attached bacteria. Single species or groups of bacteria profit from each other and are able to degrade more substrates in a community than alone.

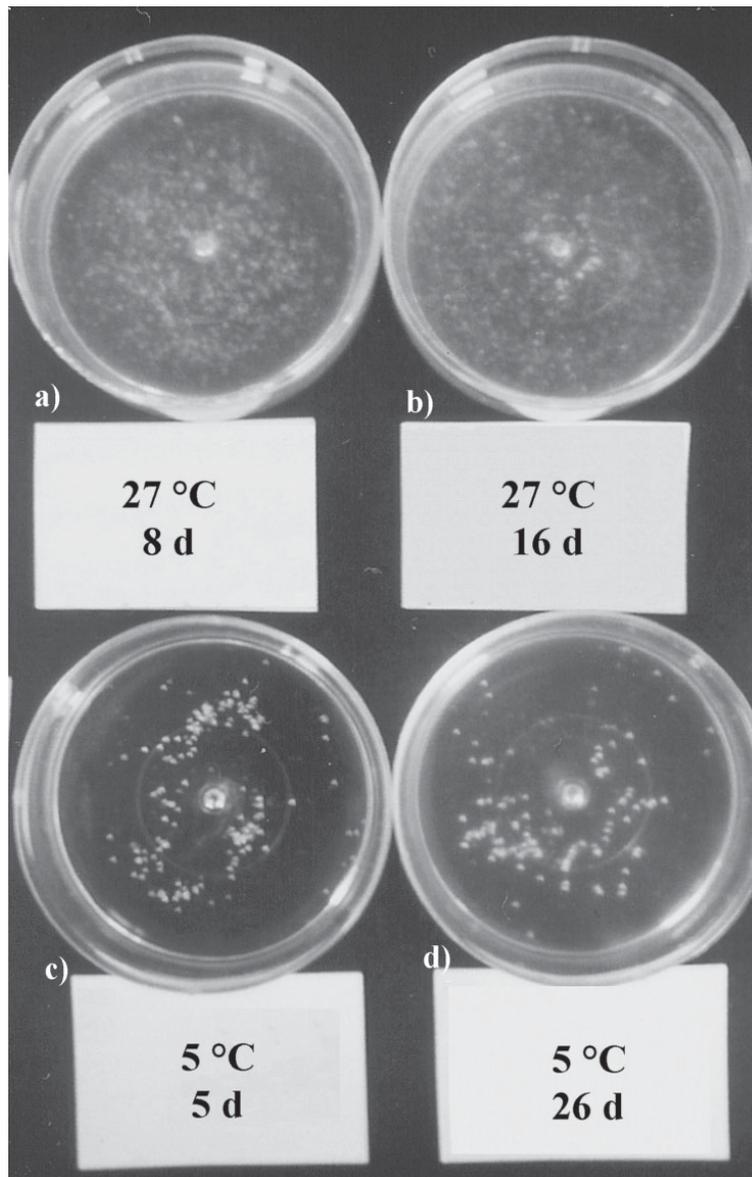
**Salinity range:** The isolates were grown in media containing 0-20% NaCl (except isolates 20/1-3 and 20/1-4, which were cultivated in the range of 0-16% NaCl). EA strains 4301-10/2, 4301-10/5, 4318-8/4 and 4318-8/7 and SA strain 88/2-4 grow in the presence of 0-20% NaCl and, therefore, show a halotolerant growth behavior (Brock et al. 2000). At low NaCl concentrations, growth of EA strains 4301-10/4 and 4318-8/1 (growth at 3.4-5% NaCl) and SA strains 88/2-1, 20/1-1 (growth at 2-4% NaCl) and 88/2-5 (growth at 2-8% NaCl) is inhibited. This is typical for marine organisms, which have a demand of sodium ions for their growth activities (Brock et al. 2000; see also chapter: Utilization of substrates).

**Temperature range:** Temperature dependency for growth was investigated by incubating the cultures

at temperatures ranging from 5-40 °C for SA strains and 5-42 °C for EA strains. All strains grow well at temperatures between 5 and 30 °C. Some isolates (4301-10/2, 4301-10/5, 4318-8/4, 4318-8/7, 88/2-2 and 88/2-4) are even able to grow at relatively high temperatures (40-42 °C). Therefore, these isolates could be classified as psychrotroph (optimal growth temperature >20 °C, but growth can occur also at about 4 °C; Bowman 1997). Within the Antarctic strains, no psychrophilic strains were found, which are characterized by inhibition of growth above 20 °C. Bowman and coworkers (1997) as well as Delille (1992) have demonstrated that most of the Antarctic bacterial strains, isolated from seawater, must be considered as psychrotrophs and not as psychrophiles.

SA isolate 88/2-7 showed an unusual growth behavior when a 24 h old liquid culture, pregrown at 27 °C, was incubated for four days at 5 °C on a rotary shaker (Fig. 4). Under this low temperature condition, the cells of the culture developed large, spherical to elliptic shaped flocs (up to 1 mm in diameter), and the medium became clear. After transferring the culture back to 27 °C, the flocs disaggregated and the medium became turbid again. The observed aggregation could be a kind of adaptation mechanism to low temperatures, because such a strong reaction did not occur at 27 °C. Isolate 88/2-7 seems to produce exopolymeric substances (EPS), which were visible as small slime layers after staining with nigrosin. The EPS could be necessary for the attachment of the cells to other cells or particles.

**Taxonomy:** To divide the isolated bacterial strains into groups of very related ones and those which are nearly identical, different molecular-biological methods such as random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used for a taxonomical characterization. RAPD produces DNA-fragments of varying nuclear size which can be used as fingerprints on agarose gels to distinguish between related individuals. Using this method, four of our EA isolates 4301-10/2, 4301-10/5, 4318-8/4, and 4318-8/7 can be summarized in one group, while the two isolates 4301-10/3 and 4301-10/6 form another distinct group (see Fig. 5). All other

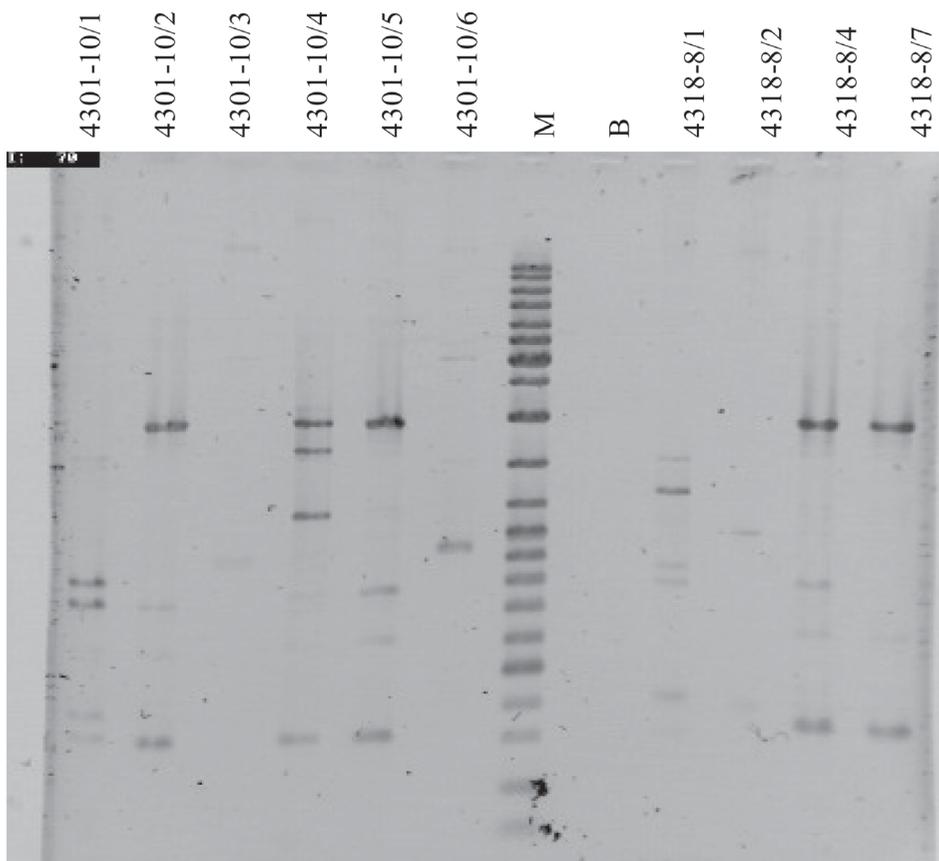


**Fig. 4.** Comparison of flocculation of isolate 88/2-7 at different temperatures and incubation times. **a)** and **b)** appearance of the culture after growth at 27 °C for 8 and 16 d, respectively. **c)** appearance of the culture after growth at 5 °C for 5 d (the culture was pregrown at 27 °C for 24 h). **d)** appearance of the culture after growth at 5 °C for 26 d (the culture was inoculated with a colony taken from a slant agar tube). Modified after Heuchert 1999.

isolates are very different from each other and can therefore not be combined in one group. The SA-isolates seem to have a higher diversity in their RAPD PCR pattern than the EA-isolates. Only isolates 20/1-1 and 88/2-5 match in their DNA-fingerprints (data not shown).

Different restriction enzymes (e.g. Hin6I, AluI, HpaII, Bsh1236I, BsuRI and MboI) are applied in

ARDRA, which is an efficient method to examine the diversity of a microbial community and which was used to reduce the number of isolated strains that were analyzed further. The isolates 88/2-5 and 88/2-6 show no difference in their PCR-patterns independent of the restriction enzymes used (data not shown). All other SA isolates show mismatch by the use of at least one restriction enzyme. The



**Fig. 5.** RAPD-PCR of ten bacterial isolates from two sampling sites of the Equatorial Atlantic (B: control; M: DNA Ladder Mix).

discrepancies in the RAPD- and ARDRA-results do not contradict to each other, because the distinguishable ARDRA patterns may be derived from the same organism as reported by Dang and Lovell (2000).

FISH with different rRNA-targeted oligonucleotide probes for Bacteria, Archaea, *Cytophaga/Flavobacteria*,  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria, and  $\gamma$ -Proteobacteria was used for a systematic classification of our EA and SA isolates (see Tab. 3). As expected, all strains hybridized with the Bacteria probe and none with the probe for Archaea. Four strains of the EA and SA samples each could be detected with the probe for the  $\gamma$ -subclass of Proteobacteria (GAM42a). The probe, specific for most members of the *Cytophaga/Flavobacteria* group (CF319a), hybridized with two EA and one SA strains. This corresponds

to the investigations of DeLong and coworkers (1993) with aggregates collected in the Santa Barbara Channel. The most abundant phylogenetic types detected in macroaggregate-associated bacterial populations fell within the groups of *Cytophaga/Flavobacteria*, *Planctomyces* and  $\gamma$ -Proteobacteria. *Cytophaga* was highly abundant in aggregate-associated bacterial communities in the Southern Californian Bight (Ploug et al. 1999). The probe for the  $\alpha$ -subclass of Proteobacteria hybridized with four EA and three SA strains, while the probe for the  $\beta$ -subclass of the Proteobacteria did not hybridize with any of the isolates tested. Although  $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria coexist in coastal environments,  $\beta$ -Proteobacteria are not found in the oligotrophic ocean but are abundant in freshwater habitats, where they seem to displace  $\gamma$ -Proteobacteria (Cottrell and Kirchman 2000). Representa-

Investigation area and Isolate	Oligonucleotide probe					
	EUB338	ARCH915	CF319a	ALF968	BET42a	GAM42a
<b>Equatorial Atlantic</b>						
4301-10/1	+	-	+	-	-	-
4301-10/2	+	-	-	-	-	+
4301-10/3	+	-	-	+	-	-
4301-10/4	+	-	+	-	-	-
4301-10/5	+	-	-	-	-	+
4301-10/6	+	-	-	+	-	-
4318-8/1	+	-	-	+	-	-
4318-8/2	+	-	-	+	-	-
4318-8/4	+	-	-	-	-	+
4318-8/7	+	-	-	-	-	+
<b>South Atlantic (Antarctica)</b>						
88/2-1	+	-	+	-	-	-
88/2-3	+	-	-	-	-	+
88/2-4	+	-	-	+	-	-
88/2-5	+	-	-	+	-	-
88/2-6	+	-	-	+	-	-
88/2-7	+	-	-	-	-	+
20/1-3	+	-	-	-	-	+
20/1-4	+	-	-	-	-	+

EUB338, Bacteria; ARCH915, Archaea; CF319a, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF968,  $\alpha$ -Proteobacteria; BET42a,  $\beta$ -Proteobacteria; GAM42a,  $\gamma$ -Proteobacteria

+, positive reaction; -, no reaction

**Table 3.** Fluorescence *in situ* hybridization with samples collected from the Equatorial and South Atlantic using different oligonucleotide probes.

tives of the  $\beta$ -Proteobacteria group were found only within lake or river snow-associated bacteria and free-living bacteria in coastal oceans and freshwater habitats, whereas members of the  $\alpha$ -Proteobacteria occur particle-associated as well as free-living in both, seawater and freshwater environments (Schweitzer et al. 2001; Crump et al. 1999; Rath et al. 1998; Acinas et al. 1999). Bowman and coworkers (1997) found bacterial isolates from Antarctic sea ice, which belong to the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subdivisions of Proteobacteria and the *Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga* phylum.

Based on the results obtained by RAPD, 16S rDNA-sequencing was carried out with one representative of each group of the EA samples and with all isolates of the SA samples. Sequence results correspond with the investigations obtained by FISH (Tab. 4). Only members of the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subclass of Proteobacteria and of the *Cytophaga/*

*Flavobacteria* group were found. The genus *Sulfitobacter* was present in both investigation areas, whereas other genera such as *Cytophaga*, *Roseobacter* and *Marinobacter* (EA) and *Polaribacter*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas* and *Psychrobacter* (SA) were found only in one sampling site each. Members of the genus *Roseobacter* ( $\alpha$ -Proteobacteria) are known as ubiquitously occurring organisms and rapid colonizers of surfaces in coastal environments (Dang and Lovell 2000), playing an important role in primary succession of surfaces. Members of the  $\gamma$ -subclass of Proteobacteria appeared to be involved in the very early stages of colonization as well. DeLong and coworkers (1993) reported that *Cytophaga/Flavobacteria*-species show highest abundances on particles. This finding differs from our observation, because only one representative of this group was detected in the EA (isolate 4301-10/1) and SA (iso-

Bacterial groups/species	Isolates		16S rDNA-sequence similarity (%)
	Equatorial Atlantic	South Atlantic (Antarctica)	
<i>Cytophaga/Flavobacteria</i>			
<i>Cytophaga</i> sp. KT11ds2	4301-10/1		99
<i>Polaribacter irgensii</i>		88/2-1	97
<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>			
$\alpha$ -Proteobacterium QSSC9-5		88/2-5, 88/2-6, 20/1-1	97-98
<i>Paracoccus</i> sp. MBIC3966		88/2-4	98.1*
<i>Roseobacter</i> sp.DSS-8	4318-8/1		97
<i>Sulfitobacter mediterraneus</i>		88/2-2	97
<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	4301-10/3; 4301-10/6		99
Marine bacterium SCRIPPS_101	4318-8/2		99
<b><math>\gamma</math>-Proteobacteria</b>			
<i>Marinobacter</i> sp.	4301-10/2; 4301-10/5; 4318-8/4; 4318-8/7		99
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. ER72M2		20/1-2, 20/1-3	99
Psychrophilic sea water bacterium PS16		20/1-4	99
<i>Psychrobacter glacincola</i>		88/2-7, 88/2-3	99.6*, 97

\* Isolate 88/2-4 and 88/2-7 are completely sequenced (Heuchert personal communication)

**Table 4.** Percent similarity of the isolates originating from organic particles of the Equatorial and South Atlantic, respectively, with strains in BLAST based on their 16S rDNA-sequences.

late 88/2-1), each. Both of these species are able to use high-molecular weight compounds such as gelatin and starch, as mentioned above (Tab. 2). It is known that representatives of this group produce one or more exoenzymes and are able to degrade a wide spectrum of polymeric compounds such as proteins, polysaccharides, chitin, and nucleic acids (DeLong et al. 1993).

## Conclusions

All our bacterial strains, isolated from particles, can be classified as  $\alpha$ - (42.85%) or  $\gamma$ -Proteobacteria (42.85%) or as a member of the *Cytophaga/Flavobacteria* group (14.3%). The isolates are all Gram-negative, psychrotrophic and differ strongly in their capacity to utilize the major polymeric components of sinking particles in the watercolumn (cellulose, starch, chitin) as well as the hydrolyzed products (di- and monosaccharides, organic acids). From this consumption behavior we presume that there must exist a complex synergy between the

different species which is very interesting and demands further investigation. This assumption is confirmed by a study with seawater samples of the Delaware Bay estuary (Cottrell and Kirchman 2000). The authors detected that no phylogenetic group dominated the consumption of all DOM, suggesting that the participation of a diverse assemblage of bacteria is essential for the complete degradation of complex DOM in the oceans. Grossart (1995) demonstrated for Lake Constance that Lake Snow plays an important role in the supply of substrates for bacteria of the aphotic zone because of the significant DOM release even beyond the thermokline.

## Acknowledgements

Helpful comments were provided by two anonymous referees. This study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 261, Teilprojekt A1). Data are available under [www.pangaea.de/Projects/SFB261](http://www.pangaea.de/Projects/SFB261).

## References

- Acinas SG, Antón J, Rodríguez-Valera F (1999) Diversity of free-living and attached bacteria on offshore western mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 65: 514-522
- Allredge AL, Cole JJ, Caron DA (1986) Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol Oceanogr* 31: 68-78
- Allredge AL, Silver MW (1988) Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog Oceanogr* 20: 41-82
- Allredge AL, Passow U, Logan BE (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res* 40: 1131-1140
- Amann R, Glöckner FO, Neef A (1997) Modern methods in subsurface microbiology: *In situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol Rev* 20: 191-200
- Azam F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science* 280: 694-696
- Azam F, Martínez J, Smith D (1993) Bacteria-organic matter coupling on marine aggregates. In: Guerrero R and Pedrós-Alió C (eds) *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology, Barcelona, Spain, pp 410-414
- Biddanda BA, Pomeroy LR (1988) Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Mar Ecol Prog Ser* 42: 79-88
- Bowman JP, McCammon SA, Brown MV, Nichols DS, McMeekin TA (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* 63: 3068-3078
- Brand H (1939) Die bakteriologische Untersuchung von Butter und ihre Auswirkungen. *Molkereizeitung* 9: 262-264
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) *Biology of Microorganisms* (9<sup>th</sup> ed) Prentice Hall International Limited, London
- Caron DA, Davis PG, Madin LP, Sieburth JMcN (1982) Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science* 218: 795-797
- Copeland RE (1996) *Enzymes*. VCH Publishers, Inc New York
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacteria* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66: 1692-1697
- Crump BC, Armbrust EV, Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 65: 3192-3204
- Dang H, Lovell CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66: 467-475
- de Silva S (2001) Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen an zwei "Partikel-assoziierten" Bakterien aus dem Südpolarmeer mit extrazellulärer Enzymproduktion. Diploma-Thesis, Universität Bremen, Germany
- Delille D (1992) Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge: Distribution of psychrophilic and psychrotrophic populations. *Polar Biol* 12: 205-210
- DeLong EF, Franks DG, Allredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* 38: 924-934
- Eilers H, Pernthaler J, Glöckner FO, Amann R (2000) Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66: 3044-3051
- Feller G, Payan F, Theys F, Qian M (1994) Stability and structural analysis of alpha amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanktis*. *Eur J Biochem* 222: 441-447
- Frazier WC, Rupp P (1928) Studies on the proteolytic bacteria of milk. 1. Medium for the direct isolation of caseolytic milk bacteria. *J Bacteriol* 16: 57-63
- Fukami K, Simidu U, Taga N (1981) Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J Exp Mar Biol Ecol* 55: 171-184
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (1994) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC
- Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999) Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: A First Comparison Based on Fluorescence *in situ* Hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 3721-3726
- Grossart HP (1995) Auftreten, Bildung und mikrobielle Prozesse auf makroskopischen organischen Aggregaten (Lake Snow) und ihre Bedeutung für den Stoffumsatz im Bodensee. PhD-Thesis, Universität Konstanz, Germany
- Heuchert A (1999) Isolierung und vergleichende Charakterisierung von zwei Partikel-assoziierten

- heterotrophen Bakterien aus dem Südatlantik (Antarktis). Diploma-Thesis, Universität Bremen, Germany
- Iriberry J, Herndl GJ (1995) Formation and microbial utilization of amorphous aggregates in the sea: Ecological significance. *Microbiologia Sem* 11: 309-322
- Karner M, Herndl GJ (1992) Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine-snow-associated bacteria. *Mar Biol* 113: 341-347
- Kirchner M (1995) Microbial colonization of copepod body surfaces and chitin degradation in the sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 49: 201-212
- Long RA, Azam F (1996) Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat Microb Ecol* 10: 213-221
- Neilan BA (1995) Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol* 61: 2286-2291
- Ploug H, Grossart HP, Azam F, Jørgensen BB (1999) Photosynthesis, respiration, and carbon turnover in sinking marine snow from surface waters of Southern California Bight: Implications for the carbon cycle in the ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 179: 1-11
- Rath J, Wu KY, Herndl GJ, DeLong EF (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat Microb Ecol* 14: 261-269
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61
- Rüger HJ (1993) Isolierung und Identifizierung benthischer Bakterien. In: Meyer-Reil LA, Köster M (eds) *Mikrobiologie des Meeresbodens*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 121-143
- Schweitzer B, Huber I, Amann R, Ludwig W, Simon M (2001)  $\alpha$ - and  $\beta$ -Proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Appl Environ Microbiol* 67: 632-645
- Shanks AL, Trent JD (1979) Marine snow: Microscale nutrient patches. *Limnol Oceanogr* 24: 850-854
- Smith PB, Hancock GA, Rhoden DL (1969) Improved methods for detecting deoxyribonuclease production by bacteria. *Appl Microbiol* 18: 991-993
- Süßmuth R, Eberspächer J, Haag R, Springer W (1999) *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2<sup>nd</sup> ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Suzuki MT, Sherr EB, Sherr BF (1993) DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. *Limnol Oceanogr* 38:1566-1570
- Trüper HG, Pfennig N (1992) The family Chlorobiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, New York, pp 3583-3592
- Unanue M, Ayo B, Agis M, Slezak D, Herndl GJ, Iriberry J (1999) Ecto-enzymatic activity and uptake of monomers in marine bacterioplankton described by a biphasic kinetic model. *Microb Ecol* 37: 36-48
- Vogt C (1997) Untersuchungen zum Metabolismus von DMS und verwandter Verbindungen durch phototrophe Bakterien. PhD-Thesis, Universität Bremen, Germany

2.

***Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica)**

Anja Heuchert, Frank Oliver Glöckner, Rudolf Amann, Ulrich Fischer

Systematic and Applied Microbiology 27, 399-406 (2004)

## *Psychrobacter nivimaris* sp. nov.\*, a Heterotrophic Bacterium Attached to Organic Particles Isolated from the South Atlantic (Antarctica)

Anja Heuchert<sup>1</sup>, Frank Oliver Glöckner<sup>2</sup>, Rudolf Amann<sup>2</sup>, and Ulrich Fischer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Abt. Marine Mikrobiologie, Universität Bremen, Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie (UFT), Bremen, Germany  
<sup>2</sup>Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen, Germany

Received: January 22, 2004

### Summary

An aggregate-attached bacterium, strain 88/2-7, was isolated from samples of the Southern Ocean and investigated in a polyphasic approach. The novel marine isolate is an aerobic, Gram-negative, oxidase- and catalase-positive, non-motile short rod and grows in form of cream-colored colonies. Growth was observed at 5–35 °C. The bacterium tolerated concentrations of 0–13% (w/v) NaCl and utilized a relatively restricted spectrum of carbon sources. The analysis of the fatty acids revealed 18:1 *cis* 9 (18:1 $\omega$ 9c) as main fatty acid. The G+C content of the DNA was approximately 42 mol%. The sequence of the 16S rDNA assigned strain 88/2-7 to the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria* with a similarity of 99.65% to *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>). A DNA-DNA-hybridization study showed only 26.8% renaturation to the respective strain. Based on the morphological, physiological and molecular properties of the new isolate, the name *Psychrobacter nivimaris* sp. nov. (type strain 88/2-7<sup>T</sup>) is proposed.

**Key words:** *Psychrobacter nivimaris* – gammaproteobacteria – attached bacteria – organic particles – South Atlantic

### Introduction

The genus *Psychrobacter* belongs to the family Moraxellaceae [34] within the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria*. The Moraxellaceae also includes the genera *Moraxella* and *Acinetobacter* [3, 34]. Members of the genus *Psychrobacter* are psychrotolerant or psychrophilic and halotolerant [3] and differ in these types of behavior in most cases from the other genera mentioned above. *Psychrobacter* species are described as aerobic, Gram-negative, non-motile, non-pigmented, catalase-, and oxidase-positive coccoidal or rod-like cells [23] and were found in different habitats. They have been isolated from fish, processed meat, poultry, lungs of lambs, seafood [3, 23, 41, 44], human blood [3], seawater, internal tissues of an ascidian [28, 33, 45], and from pigeon faeces [25]. *Psychrobacter* species are also widespread in the Antarctic environment. Bowman et al. [3, 4, 5], Denner et al. [14],

and Bozal and coworkers [6] isolated species from ornithogenic soils (*P. urativorans* and *P. frigidicola*), anchore ice (*P. glacicola*), stomach specimen of an Antarctic krill (*P. proteolyticus*), and from muddy soil and sediment at the South Shetland Islands (*P. luti* and *P. fozii*), respectively.

Since macroscopic aggregates (particles >0.5 mm in size, e. g. marine snow) are the dominant fraction involved in the transport of biogenic carbon from the surface water to the sediments [1, 20], it was the aim of the present study to learn more about the bacterial diversity of organic particles of the South Atlantic. We succeeded

\*The nearly complete 16S rDNA sequence is deposited at the EMBL data bank under accession number AJ313425.

in isolating a heterotrophic bacterium which according to its physiological and molecular properties represents a novel species of the genus *Psychrobacter* and the name *Psychrobacter nivimaris* sp. nov. is proposed.

## Materials and Methods

### Isolation and morphology

Seawater samples from a depth of 20 m were taken in the southern Atlantic Ocean (66° 27.8' S, 00° 00.8' E) during a cruise with the R. V. "Polarstern" from March to May 1998. The samples were collected with a Niskin water sampler, and 10 l of seawater were filtered through a 5 µm polycarbonate filter to retain organic particles. Each filter was transferred into sterile seawater and stored at -30 °C on board of the R. V. and later in the lab at -18 °C until it was used to isolate aggregate-associated bacteria.

ASN<sub>III</sub>-medium [32] was used as isolation and cultivation medium (salinity 3.3–3.4%; pH 7.8–8.2) with the following modifications: citric acid and EDTA were omitted, but 0.1% (w/v) yeast extract, trace elements SL10 [40], and a 7-vitamin-solution [42] were added.

The frozen sample (see above) was thawed and an aliquot was cultivated on ASN<sub>III</sub>-agar plates. Repeated transfers were performed until a pure culture of strain 88/2-7 was obtained. Gram reaction was tested using a Gram staining set (Merck) according to the manufacturer's instructions and was confirmed by the KOH-lysis test [8]. Morphology of cells and colonies were examined by phase-contrast microscopy (Zeiss) and stereomicroscopy (Zeiss) with cells and colonies grown for 24–48 h in ASN<sub>III</sub>-medium, respectively. Cell dimensions were determined with a calibrated micrometer for the phase-contrast microscope. Bacterial motility was proved under the microscope and additionally tested on a semi-solid agar-plate (ASN<sub>III</sub>-medium with 0.3% Agar-Agar).

### Physiological and biochemical characterization

The cultivation conditions were modified by varying the temperature (5–45 °C), pH (4–10) or salinity (0–20% (w/v) NaCl), respectively, by omitting 7-vitamin-solution, and by replacing yeast extract with different carbon sources (acetate, benzoate, citrate, fumarate, glucuronate, malate, propionate, succinate, glucose, mannose, and L-alanine) in two concentrations (1 mM and 5 mM). Growth was measured photometrically at 600 nm (Novaspec II, Pharmacia). Additionally, the aerobic dissimilation of 95 carbon sources was studied by using the BIOLOG GN-system. Cells, taken from a culture grown for 48 h at 27 °C on R2A agar (Difco) plates prepared with ASN<sub>III</sub>-medium, were suspended in a sterile solution of 23.5 g NaCl plus 10.6 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O in 1,000 ml distilled water [35] to a transmission of 49–55% and inoculated into microplate wells. Evaluation was performed after 4, 26, 48 and 119 h, respectively. Oxidase-

activity was tested using Bactident-Oxidase test strips (Merck). Catalase-activity was tested as described by Gerhardt et al. [18]. Hydrolysis of DNA was investigated by a method modified after Smith et al. [37]. Instead of complex media, sterilized original seawater, supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract, was used.

### Lipid analysis

Fatty acid methyl esters were extracted from cells grown in ASN<sub>III</sub>-medium at 27 °C for 48 h. The extraction was done by the Amtliche Materialprüfungsanstalt (Bremen, Germany). For analysis, a gas chromatograph (Shimadzu GC 17A) equipped with a flame ionization detector was used. The "Fatty Acid Methyl Esters"-mix (Sigma, Germany) served as reference standard.

### Molecular analysis

For fluorescence in situ hybridization (FISH) aliquots of a formaldehyde-fixed (3.4%, v/v) pure culture were placed on each well of a Teflon-coated slide and treated as described by Eilers et al. [15]. Hybridization and washing was performed in a hybridization solution as described by Glöckner et al. [19] except that the pH of Tris/HCl (20 mM) was 8.0. Counterstaining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 µg/ml) and mounting for microscopic evaluation were performed as described by Glöckner et al. [19]. The CY3-labeled group-specific oligonucleotide probes, their sequences and references are given in Table 1.

Genomic DNA was isolated using Qiagen Genomic-tip 100 (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the amplification of the 16S rRNA genes two primers, 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGG-3') and 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3') [7], were used. The 16S rDNA PCR amplification was performed as follows: 25–30 ng of target DNA, 0.4 µM of each primer, 200 µM dNTP-mix, 4 µl BSA (2 mg/ml), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5 µl REDTaq reaction buffer (Sigma-Aldrich, Germany) were adjusted to a final volume of 50 µl with sterile distilled water. REDTaq DNA Polymerase was added to the reaction mixture after the "Hot start" (96 °C, 5 min). PCR products were resolved on a 1% (w/v) agarose gel in 1 × TBE buffer (pH 8.2) and visualized under UV light (366 nm) after staining with ethidium bromide (0.1%, w/v).

DNA sequencing was conducted by GAG BioScience GmbH (Bremen, Germany) on automated sequencers (ABI 377, Perkin Elmer, Germany) by cycle sequencing with the chain termination technique using dye-labeled dideoxynucleotides [10].

The mol% G+C content was determined by the thermal denaturation method [36]. Genomic DNA was isolated as described above. DNA from *Escherichia coli* K12 was used as an internal reference standard.

### Phylogeny

The retrieved 16S rDNA sequence was added to the rDNA sequence database of the Technical University Munich (release

Table 1. Description of the oligonucleotide probes.

Probe	Specificity	Sequence (5'-3')	Reference
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	[2]
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	[38]
ALF968	$\alpha$ -proteobacteria	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	[30]
BET42a	$\beta$ -proteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	[26]
GAM42a	$\gamma$ -proteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	[26]
CF319a	<i>Cytophaga-Flavobacteria</i>	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	[27]

January 2001) using the program package ARB [39]. The tool ARB\_ALIGN was used for automatic sequence alignment. The resulting alignments were checked by eye and corrected manually, considering the secondary structure of the rRNA molecule. The ARB-database was supplemented by importing nearly all of the available 16S rDNA sequences (June 2003) from the genus *Psychrobacter*. Tree topologies were evaluated by performing maximum parsimony, neighbor joining, and maximum likelihood analysis. Only at least 90% complete sequences were used for treeing. Alignment positions, at which less than 50% of sequences shared the same residues within the genus *Psychrobacter*, were excluded from the calculations.

#### DNA-DNA-Hybridization

DNA was isolated and purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al. [9]. The hybridization was carried out as described previously [11] with modifications as described by Huss et al. [21] and Escara and Hutton [16] using a model 2600 spectrophotometer equipped with a model 2527-R thermoprogrammer and plotter (Gilford Instrument Laboratories). Renaturation rates were computed with the TRANSFER.BAS program by Jahnke [22]. The DNA-DNA-hybridization was carried out by the Identification Service of the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Germany).

## Results and Discussion

### Morphological and physiological characterization

Strain 88/2-7 was a Gram-negative short to coccoidal rod, which occurred in single cells or in pairs. It grew aerobically and was oxidase- and catalase-positive. It showed cream-colored circular and slightly convex colonies. Cells generally were  $0.8\text{--}1 \times 1.7\text{--}2.2 \mu\text{m}$  in size and motility was never observed. This is in accordance with the description of the genus *Psychrobacter*, which also includes Gram-negative cells showing coccoidal or rod-like morphology and cells were  $0.5\text{--}2 \times 1\text{--}2.5 \mu\text{m}$  in size (Table 2). Members of this genus were non-motile or moved by gliding and were oxidase- and catalase-positive [3, 24].

The optimal growth temperature for strain 88/2-7 was between 10 and 15 °C. It was able to grow at temperatures higher than 20 °C, ceased growth at 40 °C, and showed good growth at 5 °C. Therefore, this strain should be classified as psychrotolerant (optimal growth temperature >20 °C; growth can occur also at about 4 °C [4]). It has been demonstrated that a large majority of the Antarctic bacterial strains isolated from seawater must be considered as psychrotolerant and not as psychrophilic [4, 12].

The genus *Psychrobacter* contains both psychrophilic and psychrotolerant strains. According to the temperature classification given by Morita [29] and Bowman and coworkers [4], *Psychrobacter pacificensis*, *P. submarinus*, and *P. marincola* should therefore better be classified as psychrotolerant than as psychrophilic. The optimal growth temperature of different *Psychrobacter* species lies between 13 and 32 °C, while their maximum growth temperature ranges from 19 to 39 °C (see Table 2).

Salt-requirement for optimal growth was tested with NaCl from 0 to 20% (w/v). Optimal growth was ob-

tained with NaCl between 0 and 9% (w/v). Higher salinity concentrations (10–13% (w/v) NaCl) led to a decrease in growth, and no growth occurred at 14% (w/v). This corresponds to *Psychrobacter*-species from under-ice seawater and some ice-derived species which are broadly halotolerant (growth with 0–15% NaCl, growth is not stimulated by seawater) [4]. About 30% of ice-derived species are moderately halotolerant (growth is stimulated by seawater) [4] and others, such as *Psychrobacter submarinus* and *Psychrobacter marincola*, are moderately halophilic (growth with 0.5–15.5% (w/v) NaCl, seawater is required for growth [33]).

The optimal temperature and the maximum concentration of NaCl for growth of strain 88/2-7 was rather similar to those of *Psychrobacter glacincola*, while the maximum temperature corresponds to the one of *Psychrobacter immobilis*, *P. submarinus*, *P. marincola*, *P. pacificensis*, and *P. proteolyticus* (see Table 2) and the maximum concentration of NaCl to *P. fozii*.

Strain 88/2-7 adjusted the pH of unbuffered ASN<sub>m</sub>-medium, supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract, during growth to pH-values between 8 and 8.8, which is in the range of seawater pH-values. It grew at pH-values ranging from 5.5 to 10, with weaker growth at pH 10. The optimal pH-range for growth in unbuffered medium was between pH 8 and pH 9.5.

Growth was stimulated by the addition of the 7-vitamin-solution, resulting in a nearly twofold optical density (600 nm, data not shown). The strain was unable to hydrolyse gelatine, starch, or DNA.

Strain 88/2-7 seemed to be relatively restricted in its utilization of organic compounds, because it used only some carboxylic and amino acids as well as a few polymers as carbon and energy sources and showed only weak growth with some monosaccharides (Table 2). With only one exception (*Psychrobacter faecalis* [25]) none of the other *Psychrobacter*-species described so far utilized sugars as sole carbon source.

In the BIOLOG GN-system, strain 88/2-7 metabolized tween 40, tween 80, acetic acid, β-hydroxybutyric acid, α-keto glutaric acid, D,L-lactic acid, succinic acid, bromo succinic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, L-proline, L-serine, γ-amino butyric acid, methyl pyruvate, and mono-methyl succinate. The isolate showed a weak reaction with L-arabinose, D-galactose, α-D-glucose, D-mannose, cis-aconitic acid, propionic acid, succinamic acid, urocanic acid, glycogen, D-alanine, L-asparagine, L-leucine, and L-pyrroglutamic acid after 5 d of incubation.

Isolate 88/2-7 showed only weak growth in liquid media with 1 mM benzoate or 5 mM L-alanine, but good growth with 5 mM succinate (data not shown). All other carbon sources (see "Materials and Methods") tested under this condition were not utilized, independent of the concentration offered (1 or 5 mM). This is in contrast to the BIOLOG GN-system, where weak growth was observed with propionate, glucose or mannose while good growth occurred with acetate. No growth was found with L-alanine but a weak one with D-alanine.

Table 2. Comparison of some characteristics of strain 88/2-7 and other *Psychrobacter*-species.

Characteristic	<i>Psychrobacter</i> <sup>a</sup>										
	Strain 88/2-7	<i>proteolyticus</i>	<i>glacicola</i>	<i>immobilis</i>	<i>pacificensis</i>	<i>submarinus</i>	<i>marincola</i>	<i>frigidicola</i>	<i>luti</i>	<i>okhotskensis</i>	<i>fozii</i>
Shape	short to coccoidal rod	rod to coccoidal	coccoidal	coccoidal	coccobacilli	ovoid	coccoidal	coccoidal	cocco-bacilli	rod	cocco-bacilli
Size (µm)	0.8–1.0 x 1.7–2.2 10–15	0.5–1.25 x 1.0–2.5 nd	1.0–1.5 13–15	nd 27–31	1.0–1.5 2.5	0.7–1.0 x 1.6–1.9 2.5–28	0.7–1.0 2.5–28	1.5–2.0 14–16	0.4–0.6 x 0.4–1.8 nd	0.7–1.0 x 0.8–1.3 2.5	0.4–0.6 x 0.4–1.8 nd
Optimal growth temperature (°C)	10–15	1.0–2.5	13–15	27–31	2.5	1.6–1.9	2.5–28	14–16	0.4–1.8	0.8–1.3	0.4–1.8
Maximum growth temperature (°C)	35	<35	19–22	35–39	38	35	35	19–22	30	36	30
Maximum NaCl concentration (% w/v)	13	nd	12	15	5	15.5	15.5	9	9.5	12	12.5
Carbon sources utilized:											
Acetate	+	+	±	+	±	–	–	+	+	nd	±
Benzoate	w	nd	nd	±	nd	nd	nd	–	nd	nd	nd
Citrate	–	+	±	±	–	–	–	–	+	nd	–
Fumarate	–	nd	±	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd
Glucoronate	–	nd	–	±	nd	nd	nd	–	nd	nd	nd
L-glutamate	+	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd
Malate	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+
D, L-lactate	–	–	–	+	±	–	–	–	–	nd	nd
Propionate	w	+	±	±	–	–	–	–	–	nd	+
Succinate	+	nd	–	+	nd	nd	nd	–	–	nd	+
Glucose	w	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Galactose	w	nd	–	–	–	–	–	–	–	–	–
L-Arabinose	w	nd	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mannose	w	nd	–	–	–	–	–	–	–	–	–
L-alanine	w	+	±	+	±	–	–	–	–	–	+
L-phenyl-alanine	–	–	–	+	nd	nd	nd	+	–	nd	–
L-asparagine	w	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	–	nd	–
L-histidine	+	+	+	+	+	–	–	+	+	nd	+
L-leucine	w	nd	±	±	nd	–	–	–	+	nd	+
L-proline	+	+	+	nd	nd	–	–	–	+	nd	+
L-serine	+	nd	+	nd	nd	–	–	+	+	nd	+
γ-amino butyrate	+	nd	nd	±	–	nd	nd	–	+	nd	+
Mol% G+C	42	43.6	43–44	44–47	44–45	46.7	50.7	41–42	45	46.7	44–46
Habitat	organic particles from seawater	stomach of Antarctic krill	ice sea	seawater, fish, meat	deep seawater (5000–6000 m)	seawater (300 m)	ascidian	ornithogenic soils	glacier mud, Antarctica	seawater	sediment, Antarctica

Abbreviations for strain 88/2-7 are: + utilized, – not utilized, w weak growth (max. optical density (600 nm) < 0.1) or weak change in color (macroscopic reading of BIOLOG GN-plates)

Abbreviations for other species are: + utilized, – not utilized, ± some strains are positive, some negative, nd no data

<sup>a</sup> data from: [3, 5, 6, 14, 23, 25, 28, 33, 45]

Table 3. Cellular fatty acid composition (%) of strain 88/2-7 and different *Psychrobacter*-species.

Fatty acid	Strain/species <sup>a</sup>											
	88/2-7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10:0					0.8	3.4	3.1		2.2		5.8	2.9
11:0					0.1							
i11:0												
12:0	6.1	2.51			1.8	7.1	4.4					2.4
3-OH12:0	7.7	4.83		Tr		2.1	3.1	Tr	2.4	Tr	7.1	
14:0		0.15		Tr	0.6							
2-OH14:0	0.5											
3-OH14:0	0.5	0.29										
Σ 14:1 <sup>b</sup>				1	0.1							
15:0					0.3							
i15:0	0.5											
a15:0	0.6	0.36										
16:0	2.3	5.03		2	7.5			1	1.4	3	2.3	
16:1ω5c						1.4	1.6					
16:1ω7c	9.4		44	35	10.7	4.1	3.4	40	16	47	21	9.4
16:1ω9c										1		
Σ 16:1 <sup>b</sup>		22.9			0.4							
17:0		0.57			4.4							
i17:0	0.6	0.44		3	0.3					1		
17:1ω8c		6.67	3	7				4	9.7	7	12.6	2.3
Σ 17:1 <sup>b</sup>					3.9							21.5
18:0		2.91		1	9.4			1		1		
18:1 ω7c				Tr	0.9	3.2		1		2		
18:1 ω9c	44.2	45.45	49	51	51.3	78.9	84.4	52	60.1	37	41.3	57.4
18:1 ω9t/11c		0.8										
18:2					2.5					Tr		
19:0					0.5							
20:0					Tr							

<sup>a</sup>, 1, *P. proteolyticus*; 2, *P. glacincola*; 3, *P. immobilis*; 4, *P. pacificensis*; 5, *P. submarinus*; 6, *P. marincola*; 7, *P. frigidicola*; 8, *P. luti*; 9, *P. urativorans*; 10, *P. fozii*; 11, *P. okhotskensis* [3, 5, 6, 14, 28, 33, 45]

<sup>b</sup>, exact double-bond positions are not known

Tr, trace amount (<0.1%)

gray blocks, strain does not contain these fatty acids or no data, resp.

As shown in Table 2, strain 88/2-7 shares a lot of similarities with *Psychrobacter proteolyticus*, *P. glacincola*, *P. immobilis*, and *P. fozii* [4, 5, 6, 14]. These organisms, like most of the *Psychrobacter* strains, are isolated from a more or less marine environment.

#### Lipid analysis

The analysis of the fatty acids revealed 18:1 *cis* 9 (18:1ω9c) as main fatty acid (44.2%). This is similar to other *Psychrobacter* species [see 3, 5, 6, 14, 25, 28, 33, 44, 45]. The whole profile of cellular fatty acids of strain 88/2-7 in comparison with some other *Psychrobacter* species is given in Table 3.

#### Molecular analysis and phylogeny

By FISH, strain 88/2-7, was typed with group-specific probes. It hybridized with the  $\gamma$ -proteobacteria probe (GAM42a). This corresponds with DeLong et al. [13], who described the  $\gamma$ -proteobacteria as typically aggregate-associated phyla and also with Rath et al. [31], who classified all groups of *Proteobacteria*, except the  $\beta$ -proteobacteria, as marine snow-associated bacteria.

In agreement with FISH, phylogenetic sequence analysis assigns the isolate into the *Psychrobacter* group. The tree shown in Figure 1 was calculated with Maximum likelihood based on nearly full-length sequences (>1,300 bases). Trees constructed with other tree reconstruction

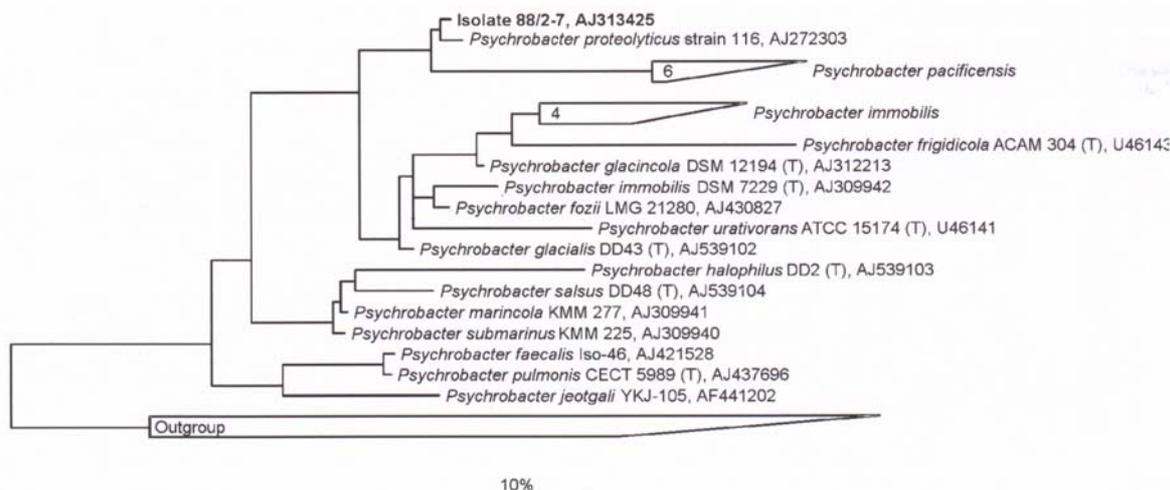


Fig. 1. Maximum likelihood tree based on 135 sequences (1446 alignment positions) of nearly full length 16S rRNA sequences. Selected sequences from the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria* were taken to root the tree. (T) indicates type strains. Accession numbers of the reference sequences are given behind the strains. The bar indicates 10% estimated sequence divergence.

algorithms (neighbor joining and parsimony) generally resulted in the same overall tree topology. The closest relative of strain 88/2-7 was *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>) with 99.65% similarity.

The DNA G+C content (thermal denaturation procedure) of strain 88/2-7 was approximately 42 mol%. Denner et al. [14] found a base composition of 43.6 mol% ( $T_m$ ) for the type species *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>). In general, the G+C content of *Psychrobacter* strains lies between 41 and 50.7 mol% (Table 2).

Strain 88/2-7 and the type strain *Psychrobacter proteolyticus* (DSM 13887<sup>T</sup>) as well as the type strain *Psychrobacter glacincola* (DSM 12194<sup>T</sup>) were found to exhibit only a low level of DNA similarity. They only showed 26.8% and 24.2% DNA-DNA similarity, respectively. *P. glacincola* and *P. proteolyticus* showed only 20.2% DNA-DNA similarity. They could therefore be considered as different species, following the definition of species stated by Wayne et al. [43].

The high similarity in 16S rRNA sequences appears to be inconsistent with the low DNA-DNA-similarity. However, it has been shown before by Fox and co-workers [17] that separate bacterial species might have identical 16S rRNA sequences. Therefore, two organisms – although sharing a nearly identical 16S rRNA sequence – might be clearly distinguished by their DNA-DNA-similarity and phenotypic traits allowing for the definition of two separate species.

On the basis of all morphological, physiological, genotypic, and phylogenetic tests performed, we, therefore, describe strain 88/2-7 as a representative of a new species of the genus *Psychrobacter* for which the name *Psychrobacter nivimaris* sp. nov. is proposed.

#### Description of *Psychrobacter nivimaris* sp. nov.:

(*ni.vi.ma.ris*. L. n. *nix*, *nivis* snow; L. gen. n. *maris* of the sea; N. L. gen. n. *nivimaris* from marine snow). Aerobic, Gram-negative, non-motile, non-pigmented, short to coccoidal rod, 0.8–1 × 1.7–2.2  $\mu$ m in size. Cells occur singly or in pairs. Oxidase- and catalase-positive. Colonies on nutrient agar are circular, slightly convex with an entired margin, and cream-colored. Psychrotolerant. Growth occurs at 5–35 °C, with an optimum at 10–15 °C and no growth at 40 °C. The pH-range for growth in unbuffered medium is 5.5–10, with an optimum at pH 8–9.5. Broadly halotolerant. Seawater is not required for growth. Optimum growth with 0–9% NaCl (w/v), growth occurs at 0–13% (w/v) NaCl. The major fatty acid is 18:1 $\omega$ 9c (44.2%).

Growth factors (vitamins) increased growth. Unable to hydrolyze gelatine, starch, or DNA. Utilization of the following substances was positive: acetic acid, cis-aconitic acid (weak), benzoate (weak), L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-pyroglutamic acid (weak), methyl-pyruvate, mono-methyl-succinate, D,L-lactic acid, propionic acid (weak), succinic acid, bromo succinic acid, succinamid acid (weak), urocanic acid (weak),  $\beta$ -hydroxybutyric acid,  $\gamma$ -amino butyric acid,  $\alpha$ -keto glutaric acid,  $\alpha$ -D-glucose (weak), D-galactose (weak), L-arabinose (weak), mannose (weak), L-alanine (weak), D-alanine (weak), L-asparagine (weak), L-histidine, L-leucine (weak), L-proline, L-serine, glycogen (weak), tween 40, and tween 80.

The G+C content of the DNA is approximately 42 mol% (determined by the thermal denaturation method). The type strain is 88/2-7 (= DSM 16093<sup>T</sup>, = NCIMB 13982<sup>T</sup>). It has been isolated from organic particles originating from the South Atlantic, Antarctica (66° 27.8' S, 00° 00.8' E).

### Acknowledgement

Our special thanks are extended to crew, captain and fellow scientists on board the R. V. "Polarstern". We are grateful to Hans G. Trüper, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn, Germany, for his interest and for suggesting the specific epithet. This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 261, Teilprojekt A1 at Bremen University).

### References

- Allredge, A. L., Silver, M. W.: Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog. Oceanogr.* 20, 41–82 (1988).
- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770 (1990).
- Bowman, J. P., Cavanagh, J., Austin, J. J., Sanderson, K.: Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 841–848 (1996).
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S., McMeekin, T. A.: Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3068–3078 (1997a).
- Bowman, J. P., Nichols, D. S., McMeekin, T. A.: *Psychrobacter glacicola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 209–215 (1997b).
- Bozal, N., Montes, M. J., Tutela, E., Guinea, J.: Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1093–1100 (2003).
- Buchholz-Cleven, B., Rattunde, B., Straub, K.: Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 301–309 (1997).
- Buck, J. D.: Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 992–993 (1982).
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J., Franklin, M.: A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* 81, 461–466 (1977).
- Chen, E. Y., Seeburg, P. H.: Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4(2), 165–170 (1985).
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12, 133–142 (1970).
- Delille, D.: Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge: distribution of psychrophilic and psychrotrophic populations. *Polar Biol.* 12, 205–210 (1992).
- DeLong, E. F., Franks, D. G., Allredge, A. L.: Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 38, 924–934 (1993).
- Denner, A. B., Mark, B., Busse, H.-J., Turkiewicz, M., Lubitz, W.: *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *System. Appl. Microbiol.* 24, 44–53 (2001).
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Amann, R.: Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3044–3051 (2000).
- Escara, J. F., Hutton, J. R.: Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: Acceleration of renaturation rate. *Biopolymers* 19, 1315–1327 (1980).
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Jr.: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 166–170 (1992).
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (eds.): *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1994).
- Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., Schleifer, K. H.: An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 19, 403–406 (1996).
- Grossart, H. P., Simon, M.: Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): Occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance. *Limnol. Oceanogr.* 38 (3), 532–546 (1993).
- Huss, V. A. R., Festl, H., Schleifer, K. H.: Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 184–192 (1983).
- Jahnke, K.-D.: Basic computer program for evaluation of spectrophotometric DNA renaturation data from GILFORD System 2600 spectrometer on a PC/XT/AT type personal computer. *J. Microbiol. Methods* 15, 61–73 (1992).
- Juni, E., Heym, G. A.: *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: Genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 388–391 (1986).
- Juni, E.: The Genus *Psychrobacter*, pp. 3241–3246. In: *The Prokaryotes* (A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer, eds.) 2nd ed., New York, Springer 1992.
- Kämpfer, P., Albrecht, A., Buczolits, S., Busse, H.-J.: *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a new species from a bioaerosol originating from pigeon faeces. *System. Appl. Microbiol.* 25, 31–36 (2002).
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600 (1992).
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K. H.: 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* 142, 1097–1106 (1996).
- Maruyama, A., Honda, D., Yamamoto, H., Kitamura, K., Higashihara, T.: Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 835–846 (2000).
- Morita, R. Y.: Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144–167 (1975).
- Neef, A.: Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph. D. thesis. Technische Universität München, Germany 1997.
- Rath, J., Wu, K. Y., Herndl, G. J., DeLong, E. F.: High phylogenetic diversity in a marine snow-associated bacterial assemblage. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 261–269 (1998).
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y.: Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61 (1979).

33. Romanenko, L. A., Schumann, P., Rohde, M., Lysenko, A. M., Mikhailov, V. V., Stackebrandt, E.: *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1291–1297 (2002).
34. Rossau, R., van Landschoot, A., Gillis, M., de Ley, J.: Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 310–319 (1991).
35. Rüger, H.-J., Krambeck, H.-J.: Evaluation of the BIOLOG Substrate Metabolism System for Classification of Marine Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 281–288 (1994).
36. Sly, L. L., Blackall, L. L., Kraat, P. C., Tian-Shen, T., Sangkhobol, V.: The use of second derivative plots for the determination of mol% guanine plus cytosine of DNA by the thermal denaturation method. *J. Microbiol. Meth.* 5, 139–156 (1986).
37. Smith, P. B., Hancock, G. A., Rhoden, D. L.: Improved methods for detecting deoxyribonuclease production by bacteria. *Appl. Microbiol.* 18, 991–993 (1969).
38. Stahl, D. A., Amann, R.: Development and application of nucleic acid probes, pp. 205–248. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (E. Stackebrandt, M. Goodfellow, eds.) Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 1991.
39. Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A. P., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K.-H.: ARB: a software environment for sequence data (submitted to *Nucleic Acids Research* in Nov 2002)
40. Trüper, H. G., Pfennig, N.: The family Chlorobiaceae, pp. 3583–3592. In: *The Prokaryotes* (A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer, eds.) 2nd ed., New York, Springer 1992.
41. Vela, A. I., Collins, M. D., Latre, M. V., Mateos, A., Moreno, M. A., Hutson, R., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J. F.: *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 415–419 (2003).
42. Vogt, C.: Untersuchungen zum Metabolismus von DMS und verwandter Verbindungen durch phototrophe Bakterien. Ph. D. thesis. Universität Bremen, Germany 1997.
43. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., Trüper, H. G.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463–464 (1987).
44. Yoon, J.-H., Kang, K. H., Park, Y.-H.: *Psychrobacter jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 449–454 (2003).
45. Yumoto, I., Hirota, K., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Yokota, Y., Hoshino, T.: *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipase-producing new facultative psychrophile isolated from the coast of Okhotsk Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, published online (2003).

**Corresponding author:**

Anja Heuchert, Universität Bremen, FB2, UFT, Abt. Marine Mikrobiologie, Leobener Str., 28359 Bremen, Germany  
 Tel.: ++49-(0)421-2187235; Fax: ++49-(0)421-2187222;  
 e-mail: aheu@biotec.uni-bremen.de