

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Oligo- und Polynukleotidsonden-gestützte
Charakterisierung und Anreicherung
bisher nicht kultivierbarer Acidobacteria**

Friedrich Johannes Zimmermann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. apl. Prof. Dr. A. Hartmann,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 2. Oktober 2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28. Oktober 2002 angenommen.

Für Chrissie

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zimmermann, J., Ludwig W. and K.-H. Schleifer: DNA Polynucleotide Probes Generated from Representatives of the Genus *Acinetobacter* and Their Application in Fluorescence *in situ* Hybridization of Environmental Samples. *System. Appl. Microbiol.* **24**: 238-244 (2001).

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	IX
A	Einleitung	
1	Die Bedeutung nicht kultivierbarer Mikroorganismen	1
2	Das Phylum <i>Holophaga-Acidobacterium</i>	2
3	Polynukleotidsonden als Werkzeuge der molekularen Ökologie	5
4	Die Domäne III der 23S-rRNA als Zielregion für Polynukleotidsonden	6
5	Die Gattung <i>Acinetobacter</i> als Modelltaxon zur Evaluation von DNA-Polynukleotidsonden	7
B	Material und Methoden	
1	Umweltproben	9
2	Mikroorganismen	10
3	Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung	10
3.1	Nährmedien	10
3.2	Zellanzucht und Stammhaltung	11
4	Isolierung von Nukleinsäuren	12
4.1	Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNA nach Wisotzkey <i>et al.</i> (1990, mod.)	12
4.2	Isolierung von DNA aus Umweltproben	13
4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	13
5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	14
6	Agarose-Gelelektrophorese	15
7	<i>In vitro</i> -Amplifikation mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	17
7.1	Oligonukleotide	17
7.2	Durchführung	18
7.3	Random and limited PCR (RL-PCR)	19
8	Reinigung von PCR-Produkten	20
9	Klonierung von Nukleinsäurefragmenten	20
10	DNA-Sequenzanalyse	21
11	Auswertung von Sequenzdaten und Konstruktion von Oligonukleotidsonden	22
11.1	Vergleichende Anordnung von Sequenzen (Alignment)	22
11.2	Rekonstruktion von Stammbäumen	22

11.3	Sondenkonstruktion	23
12	Konstruktion von Polynukleotidsonden	24
12.1	Konstruktion von RNA-Polynukleotidsonden	24
12.2	Konstruktion von DNA-Polynukleotidsonden	25
13	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
13.1	Fixierung von Probenmaterial	28
13.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden	28
13.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit RNA-Polynukleotidsonden	30
13.4	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit DNA-Polynukleotidsonden	30
13.4.1	1. Variante: Analog zur RNA-Polynukleotidsonden-Hybridisierung	30
13.4.2	2. Variante: Analog zur Oligonukleotidsonden-Hybridisierung	31
13.5	Detektion von Zielzellen	32
14	Hybridisierung in Mikrotiterplatten	33
14.1	Immobilisierung von Polynukleotidsonden	33
14.2	Hybridisierung in Lösung	34
14.3	1. Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	34
14.4	2. Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	34
15	Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse	35
16	Isolierung von Zielzellen mittels Durchflußcytometrie	35
17	Isolierung von Zielzellen mittels Mikromanipulation	36
C	Ergebnisse	
1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit DNA-Polynukleotidsonden	37
1.1	Konstruktion von DNA-Polynukleotidsonden	37
1.2	Einsatz von DNA-Polynukleotidsonden in künstlichen Bakterienmischungen	38
2	Untersuchungen zu gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten DNA-Polynukleotidsonden am Beispiel der Gattung <i>Acinetobacter</i>	39
2.1	Evaluation der Spezifität von gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten DNA-Polynukleotidsonden	39
2.2	Vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA-Gene von Angehörigen der Gattung <i>Acinetobacter</i>	43
2.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung von Umweltproben mit fluoreszenzmarkierten DNA-Polynukleotidsonden	45
2.4	Rückhaltung von Zielzellen durch DNA-Polynukleotidsonden- Hybridisierung in Mikrotiterplatten	48
3	Untersuchungen zu bislang unkultivierten Acidobacteria durch vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA	50

3.1	Erstellung von Genbanken	50
3.2	Analyse von 23S-rRNA-Sequenzdaten	53
4	Untersuchungen zu bislang unkultivierten Acidobacteria durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	56
4.1	Untersuchung von Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried	57
4.1.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit für das Phylum Acidobacteria spezifischen Oligonukleotidsonden	57
4.1.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden engerer Spezifität	59
4.1.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden	63
4.1.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit gegen den 5'-terminalen Teil der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden	66
4.1.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Oligo-Oligonukleotidsonden	67
4.1.6	Sondengestützte Isolierung von Zielzellen des ZD7-Clusters mittels Durchflußcytometrie	68
4.2	Untersuchung von filamentösen Matten der Lower Kane Cave, WY	72
4.2.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit für das Phylum Acidobacteria spezifischen Oligonukleotidsonden	72
4.2.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden engerer Spezifität	76
4.2.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit für <i>G. fermentans</i> spezifischen Oligonukleotidsonden	81
4.2.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden	83
4.2.5	Sondengestützte Isolierung von Zielzellen des Typs A und B durch Mikromanipulation	85
D	Diskussion	
1	DNA-Polynukleotidsonden	88
1.1	Verwendung von DNA-Polynukleotidsonden anstelle von RNA-Transkriptsonden in der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	88
1.2	Signalcharakteristika von DNA-Polynukleotidsonden	89
1.3	Die Helix 58 der 23S-rRNA als entscheidende Region für die Bindung von gegen die Domäne III gerichteten Polynukleotidsonden	89
2	Phylogenetische Struktur der Gattung <i>Acinetobacter</i> auf	

	Grundlage von 23S-rRNA-Sequenzdaten	91
3	<i>Acinetobacter baumannii</i> als Eikelboom-Typ 1863	95
4	Phylogenetische Struktur der Acidobacteria auf Grundlage von 23S-rRNA-Sequenzdaten	98
5	Acidobacteria in Boden-, Süßwasser- und Sedimentproben	99
6	Acidobacteria in der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried	100
7	Acidobacteria in der Lower Kane Cave, WY	101
8	Rückhaltung von Zielzellen in Mikrotiterplatten	105
9	Spezifische Isolierung von Acidobacteria	106
E	Zusammenfassung	109
F	Literatur	110

Abkürzungen

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
AE	Altitude Effect
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BP	Bandpaßfilter
C	Cytosin, Cytidin
Cy	Cyanin-Farbstoff
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-oktan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Fluos	Fluorescein
FT	Farbteiler
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
G	Guanosin
GC	Mol% Guanin + Cytosin
h	hekto (10 ²); Stunde
H ₂ O _{dest.}	vollentsalztes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser (MilliQ, Millipore, Eschborn, D)
IR	Infrarot
kb	Kilobase
keV	Kiloelektronenvolt

l	Liter
lsu	große Untereinheit des Ribosoms
m	milli (10^{-3}); Meter
M	molar (mol/l)
μ	mikro (10^{-6})
min	Minute
MTP	Mikrotiterplatte
n	nano (10^{-9})
n.d.	nicht bestimmt
NN	Meereshöhe
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
OTU	operational taxonomic unit
Pa	Pascal
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rDNA	für rRNA codierende DNA
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Nukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sedimentationskoeffizient in Svedberg-Einheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
SSC	Standard-Saline-Citrat
ssp.	Subspezies
ssu	kleine Untereinheit des Ribosoms
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T_d	Dissoziations-temperatur
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten; Uracil, Uridin
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Masse/Volumen

A Einleitung

1 Die Bedeutung nicht kultivierbarer Mikroorganismen

Der Stellenwert der Vielfalt sämtlicher auf der Erde vorkommender Arten lebender Organismen, mit dem griffigen Schlagwort Biodiversität belegt, ist mittlerweile tief im Bewußtsein nicht nur der wissenschaftlichen Gemeinde, sondern auch der Politik, Wirtschaft und nicht zuletzt einer breiten Öffentlichkeit verankert.

Spätestens mit dem umstrittenen Abkommen von 1991 zwischen dem Pharmakonzern Merck und dem costaricanischen Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) zum exklusiven beiderseitigen Austausch von Informationen und biologischem Probenmaterial aus den Ressourcen des Regenwaldes von Costa Rica ist das Interesse an – vor allem bislang nicht eingehender charakterisierten – Arten zum Zweck späterer wirtschaftlicher Ausbeutung deutlich geworden. Viele Fragen zum Status des geistigen Eigentums in den Biowissenschaften, der Zulässigkeit der Ausbeutung von Bioressourcen durch Großkonzerne und den moralischen Grenzen wissenschaftlichen Handelns wurden damit aufgeworfen.

Mikroorganismen sind aufgrund ihrer unvergleichlichen physiologischen Vielfalt und ihrer potentiellen industriellen Nutzbarkeit von besonderer Bedeutung in der Diskussion zur Biodiversität (Hunter-Cevera, 1998). In Kontrast zu ihrem Stellenwert steht jedoch die Tatsache, daß nur ein Bruchteil der Mikroorganismen mit klassischen mikrobiologischen Methoden kultiviert werden kann (Fry, 2000; Stackebrandt und Embley, 2000), auch wenn in letzter Zeit, beispielsweise durch die Abkehr von der Petrischale hin zur aufwendigen Simulation natürlicher Lebensbedingungen, bemerkenswerte Fortschritte erzielt werden konnten (Kaeberlein *et al.*, 2002).

Uneinigkeit herrscht über die Ursachen dieses Phänomens. Mögliche Begründungen reichen von der Ansicht, es handele sich bei der großen Zahl nicht kultivierbarer Organismen letztendlich um nahe Angehörige schon kultivierter Arten, die lediglich in einen Zustand der Nichtkultivierbarkeit übergehen, über ein breites Spektrum von Möglichkeiten bis zur Meinung, nichtkultivierbare Mikroorganismen repräsentierten größtenteils völlig unbekannte Entwicklungslinien, die phylogenetisch nur entfernt verwandt sind mit der vergleichsweise kleinen Zahl bisher beschriebener mikrobieller Arten (Rondon *et al.*, 1999). Schon 1987, einige Jahre vor der Ära der rRNA-Genbanken, mutmaßte C. Woese „that many eubacterial phyla remain to be described, representing species yet to be discovered“.

Für das Zutreffen letzterer Theorie spricht das mit großer Geschwindigkeit wachsende Wissen über bakterielle Taxa, die erst mit molekularen Methoden (Knight, 2000) untersucht werden konnten. Von besonderer Bedeutung sind dabei 16S-rRNA-Genbanken, die die Analyse mikrobieller Ökosysteme unter besonderer Berücksichtigung nichtkultivierbarer Mikroorganismen revolutionierten (Giovannoni *et al.*, 1990), auch wenn ein breites Spektrum von Einflüssen die Ergebnisse drastisch verzerren kann (Stackebrandt *et al.*, 1999; v. Wintzingerode *et al.*, 1997). Organismen, von denen lediglich rRNA-Sequenzen bekannt sind, werden auch als „Riboclones“ bezeichnet (Holmes *et al.*, 2000).

Wie viel Bedarf an Untersuchungen zur bakteriellen Diversität noch besteht, zeigen Analysen mikrobieller Lebensgemeinschaften in thermalen Quellen des Yellowstone National Park. Sie förderten eine Vielzahl neuer, in ihrem phylogenetischen Status erst vorläufig charakterisierter bakterieller Gruppen zu Tage. Diese Gruppen werden nach ihrem systematischen Rang als Phyla angesehen, einer Hierarchie, die immerhin den klassischen „Reichen“ wie Tieren und Pflanzen innerhalb der Eukarya entspricht (Woese *et al.*, 1990). Organismen aus Phyla ohne bisher kultivierte Vertreter wurden als *candidate divisions* (Hugenholtz *et al.*, 1998a) bezeichnet und außer in heißen Quellen auch in verseuchtem Grundwasser und Kläranlagen gefunden (Dojka *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 1998b). Ein Vergleich jeweils aktueller auf 16S-rRNA-Sequenzinformationen basierender phylogenetischer Bäume der Domäne *Bacteria* aus den Jahren 1987 und 2000 zeigt ein Anwachsen der Zahl bekannter Großgruppen auf das Dreifache, von 12 auf 36 (DeLong und Pace, 2001). Nicht nur in den Candidate Divisions ist die Entdeckung zahlreicher bisher unbekannter Organismen zu erwarten. Von anderen ubiquitär verbreiteten Phyla liegen zwar einige kultivierbare Arten vor, doch Sequenzen, die auf nichtkultivierte Organismen hindeuten, überwiegen bei weitem. Zu dieser Gruppe zählen die neu eingerichteten Phyla¹ Chloroflexi, Verrucomicrobia und die Acidobacteria.

2 Das Phylum Acidobacteria

Das Phylum Acidobacteria ist in 16S-rRNA-Genbanken aus verschiedensten Habitaten auf der ganzen Erde vertreten. Das Mißverhältnis von kultivierbaren zu lediglich als Klonsequenzen repräsentierten Vertretern ist in diesem Phylum extrem: Lediglich drei in Reinkultur vorliegenden Arten, *Holophaga foetida* (Bak *et al.*, 1992; Liesack *et al.*, 1994), *Acidobacterium capsulatum* (Hiraishi *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1991) und *Geothrix fermentans* (Coates *et al.*, 1999; Lonergan *et al.*, 1996)

¹ Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Rel. 2.0 (<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>)

stehen Hunderte von 16S-rRNA-Sequenzen gegenüber. Entsprechende Sequenzen konnten bislang in *allen* auf Genbanken basierenden Analysen von Bodenproben gefunden werden. So gut wie jedes denkbare Habitat - darunter Thermalquellen, grundwasserführende Schichten, Torfmoor, Sedimente von Binnengewässern, eine Wasserprobe aus dem Atlantik aus 1000 m Tiefe u.a. - enthält Sequenzen dieser Gruppe (Barns *et al.*, 1999; Hugenholtz *et al.*, 1998a; Kuske *et al.*, 1997). Zwar läßt lediglich die Präsenz von Sequenzen keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die wirkliche Häufigkeit und Bedeutung dieser Organismen in ihren Ökosystemen zu. Die DNA kann frei vorliegen, Zellen bestimmter Gruppen können in DNA-Extraktionsverfahren leichter zu lysieren sein als andere oder besonders viele *rrn*-Operone pro Genom enthalten. RT-PCR-gestützte Quantifikationen aktiver Ribosomen von Acidobacteria in Umweltproben deuten allerdings auf eine große Zahl und hohe metabolische Aktivität von Organismen dieser Gruppe zumindest im untersuchten Lebensraum, Grasland der Landwirtschaftlichen Forschungsstation Drentse A in den Niederlanden, hin (Felske *et al.*, 2000).

Obwohl Acidobacteria ubiquitär verbreitet zu sein scheinen, sind Kultivierungserfolge für diese Organismen selten. Durch sondengestützte Anreicherung konnten Angehörige der Unterklasse a des Phylums zumindest in Gesellschaft von Organismen aus der *Beijerinckia*-Gruppe der Alphaproteobacteria kultiviert werden (Spring *et al.*, 2000). In letzter Zeit gelang von landwirtschaftlich genutzten Böden in Victoria die Kultivierung zweier Isolate, die zur Subdivision 1 des Phylums (sensu Hugenholtz *et al.*, 1998a) gehören (Janssen *et al.*, 2002) und die Isolierung von Angehörigen des Phylums von Exemplaren der Roten Schlauchpflanze (*Sarracenia purpurea*; Rainey, persönliche Mitteilung).

Die Tatsache, daß die phylogenetische Diversität der Gruppe in etwa der der gesamten Proteobacteria entspricht, läßt eine hohe metabolische Vielseitigkeit innerhalb des Phylums Acidobacteria vermuten (Ludwig *et al.*, 1997).

H. foetida verfügt über den Phloroglucinol-Abbauweg zur Demethylierung aromatischer Verbindungen (Kreft und Schink, 1993). *G. fermentans* leistet mit der dissimilatorischen Reduktion von Eisen(III) einen elementaren Beitrag zum bedeutenden Prozeß der anaeroben Oxidation organischer Stoffe zu CO₂ (Coates *et al.*, 1999).

DGGE-gestützte Klonierungsstudien zur mikrobiellen Besiedlung eines mit Petroleumverbindungen hochbelasteten Wasserlaufs im Gaza-Streifen deuten darauf hin, daß Acidobacteria auch in diesem komplexen Ökosystem vorkommen (Abed *et al.*, 2002).

An den unabhängig von geographischer und taxonomischer Herkunft der Wirtstiere erstaunlich uniformen mikrobiellen Gemeinschaften in Schwämmen, die aufgrund ihrer potentiellen Rolle in der Bildung von Sekundärmetaboliten zunehmendes wissenschaftliches Interesse finden, sind Acidobacteria aus verschiedenen

Untergruppen des Phylums nach Ergebnissen aus 16S-rRNA-gestützten Studien beteiligt (Hentschel *et al.*, 2002).

In subterrestrischen Habitaten wurden Angehörige der Gruppe in mikrobiellen Konsortien gefunden, die möglicherweise für die Bleichung von Höhlengemälden von Bedeutung sind. 16S-rRNA-Sequenzanalysen von Proben paläolithischer Felszeichnungen aus den Höhlen Altamira (Kantabrien) und Tito Bustillo (Asturien) zeigten, daß 24 bzw. 29 Prozent der identifizierten Mikroorganismen zum Phylum Acidobacteria gehörten (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002a; b).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Spektrum verschiedener Habitats auf die Anwesenheit von Angehörigen des Acidobacteria-Phylums untersucht.

Dafür wurden erst durch Amplifikation mit spezifischen Primern und anschließende Klonierungen gezielt ribosomale Sequenzen von Angehörigen der Gruppe isoliert und mit auf der Grundlage dieser Sequenzen hergestellten Oligo- und Polynukleotidsonden die entsprechenden Organismen detektiert. Häufig ließ die Beschaffenheit des Probenmaterials einen *in situ*-Nachweis allerdings nicht zu (vgl. auch Hahn und Zeyer, 1994).

Neben Bodenproben, in denen das Vorliegen der Gruppe vorausgesetzt werden konnte, wurden Belebtschlamm aus einer eingehend charakterisierten Tierkörperbeseitigungsanlage (Juretschko *et al.*, 2002), Sedimentproben vom Grund eines japanischen Tempelteichs und vom Oberlauf der Partnach in 1360 m Höhe untersucht.

Ein wesentlich extremerer Standort waren die Schöngänge unter der Alpspitze, wo in einer auf 1900 m über NN genommenen Probe Sequenzen von Repräsentanten verschiedener Untergruppen des Acidobacteria-Phylums gefunden werden konnten. Die Bedingungen an der Probenahmestelle sind von hohen Temperaturschwankungen und der in dieser Höhe beträchtlichen UV-Strahlung gekennzeichnet (Laurion *et al.*, 2000; Sommaruga und Psenner, 1997).

Die Untersuchung von Angehörigen des Phylums Acidobacteria in einer Höhle war angesichts der erwähnten Bedeutung von Angehörigen dieses Phylums ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Mikroorganismen können einen bedeutenden Einfluß in geologischen Systemen ausüben (Newman und Banfield, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Lower Kane Cave, Wyoming, ist - repräsentativ für die Entstehung von Höhlensystemen unter potentiell mikrobiellem Einfluß (Vlasceanu *et al.*, 2000) - eingehend charakterisiert worden und über eine Länge von 325 m kartiert (Engel *et al.*, 2000). Sie liegt im Karstgebiet des Bighorn Basins 130 km östlich des Yellowstone National Park und wird auf über 180 m Länge von einem stark sulfidhaltigen Wasserlauf durchflossen, der aus Quellen in den Little Sheep Mountains und Solequellen nahegelegener Petroleumfelder gespeist wird. Drei schwefelhaltige Thermalquellen (Fissure Spring, Upper Spring, Lower Spring) mit

einer Temperatur von durchschnittlich 21°C ergießen sich in den Wasserlauf, der bei Tiefen zwischen weniger als 50 cm bis 2 m eine auffällig strukturierte Kolonisierung durch Mikroorganismen aufweist. Diese Organismen fördern neben abiotischen Faktoren die Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Schwefelsäure und sind damit direkt an der Speläogenese beteiligt, ein Mechanismus, der auch für die Entstehung der berühmten Carlsbad Caverns in New Mexico oder der Cueva de Villa Luz in Mexiko diskutiert wird (Hose *et al.*; 2000; Northup und Lavoie, 2001). Innerhalb des Wasserlaufs sind die bakteriellen Lebensgemeinschaften in mikrobiellen Matten organisiert, von denen drei Arten unterschieden werden können: Weiße filamentöse Matten nahe schwefelhaltiger Zuflüsse in Bereichen mit höherer Fließgeschwindigkeit und hohen Sulfidkonzentrationen; dünne, gelartige schwarze Beläge am Grund des Wasserlaufs in trägeren Bereichen sowie dicke rote bzw. orange Matten in langsam fließendem Wasser, die auch auf der Oberfläche aufschwimmen können (Engel *et al.*, 2000). Auf Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) gestützte Untersuchungen lassen vermuten, daß die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in weißen filamentösen Matten von Epsilonproteobacteria dominiert werden (Engel *et al.*, in Vorbereitung).

3 Polynukleotidsonden als Werkzeuge der molekularen Ökologie

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (DeLong *et al.*, 1989) wurde in den letzten Jahren neben der Analyse klonierter Sequenzen aus der Umwelt zu einer der bedeutendsten Methoden in der molekularen Ökologie. Größtenteils werden dabei Oligonukleotidsonden mit einer Länge von ca. 18 Nukleotiden eingesetzt; ribosomale RNA ist dabei das ideale Zielmolekül (Amann, 1995). Oligonukleotidsonden können *in silico* entwickelt und für die erwünschte Zielgruppe auf jeder taxonomischen Hierarchieebene maßgeschneidert werden (Amann und Ludwig, 2000) und sind in der Regel an einem Terminus mit einem Reportermolekül bestückt. Wird – beispielsweise zum Zweck der Signalverstärkung – eine höhere Markierungsdichte als nur ein Reportermolekül pro Sonde benötigt, kann mit mehrfach markierten Polynukleotidsonden, die ein Vielfaches der Länge von Oligonukleotidsonden aufweisen, eine hohe Multiplizität von signalgebenden Molekülen erreicht werden. Je stringenter die Bedingungen allerdings sind, unter denen die Sonden eingesetzt werden, desto stärker relativiert sich der Vorsprung in der Signalintensität von mehrfach zu einfach markierten Sondenmolekülen (Trebesius *et al.*, 1994).

Radioaktiv markierte Transkriptsonden kamen schon in den achtziger Jahren für Koloniehybridisierungen auf Nitrocellulosefiltern zur Anwendung (Chityothin *et al.*, 1987). Wurden sie fluoreszenzmarkiert in Hybridisierungen ganzer fixierter Bakterienzellen eingesetzt, so zeigten sie die bemerkenswerte Eigenschaft, an der

Zellperipherie konzentriert aufzutreten, wodurch das Zellinnere wesentlich dunkler erschien (Trebesius *et al.*, 1994). Dieses Phänomen wird als Halo, engl. Heiligenschein, bezeichnet. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Annahme, daß die Sonden Netzwerke bilden, die zum Teil aus der Zelle, deren Wand durch die vorangegangene Fixierung zwar stabilisiert, aber auch permeabilisiert wurde, herausragen. Damit wäre theoretisch ein molekulares Angeln der Zelle durch Immobilisierung der einerseits am Ribosom fixierten, andererseits in die Zellumgebung reichenden Polynukleotidsonden möglich. Experimentell konnte bestätigt werden, daß ein spezifisches sondengestütztes Zellfischen zur Anreicherung von Zielzellen aus künstlichen Mischungen nutzbar war (Stoffels *et al.*, 1999). Dies legte nahe, Polynukleotidsonden zur Untersuchung unkultivierbarer Organismen zu verwenden, von denen nur klonierte Sequenzen bekannt sind: Durch den Einsatz auf der Grundlage klonierter DNA konstruierter fluoreszenzmarkierter Polynukleotidsonden wäre *in situ* der spezifische Nachweis der entsprechenden Bakterien möglich; durch Zellfischen mit diesen Sonden könnten sie gezielt aus dem umgebenden Habitat entnommen und ihre DNA untersucht werden.

Bisher wurden Polynukleotidsonden - üblicherweise *in vitro* mit der T3-RNA-Polymerase erzeugte Transkripte - u.a. für die Detektion von planktonischen Mikroorganismen (DeLong *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 2002), magnetotaktischen Bakterien (Spring *et al.*, 1998), Epixenosomen auf der Oberfläche von *Euplotidium arenarium* (Petroni *et al.*, 2000) und die Ermittlung des Anteils von Archaeen an der Gesamtzahl von Mikroorganismen in der Tiefsee (Karner *et al.*, 2001) eingesetzt.

4 Die Domäne III der 23S-rRNA als Zielregion für Polynukleotidsonden

Da die Bildung von Halos das Vorliegen längerer nicht hybridisierter Sondenabschnitte voraussetzt und überdies die Tertiärstruktur der ribosomalen RNA die vollständige Bindung eines mehrere hundert Nukleotide langen Sondenmoleküls an seine Zielregion sterisch nicht zulässt, kann nur ein Teil des Polynukleotids wirklich binden. Über die exakten Targets von Polynukleotidsonden herrschte zwar Unklarheit. Erstrebenswert sind im Sinne einer hohen Spezifität aber Zielregionen von großer Variabilität. Die hypervariable Region V6 auf der 16S-rRNA wurde als Target für Polynukleotidsonden in Dot-Blot-Hybridisierungen verwendet (Heuer *et al.*, 1999), erstreckt sich jedoch nur über 63 Nukleotide. Größere Abschnitte sind auf der 23S-rRNA zu finden. So ist die Domäne I von hoher Variabilität geprägt, allerdings von konservierteren Abschnitten durchsetzt. Eine hochvariable Region von mehreren hundert Nukleotiden Länge befindet sich innerhalb der Domäne III. Charakteristische

strukturelle Besonderheiten machen diesen Abschnitt der 23S-rRNA zu einem geeigneten Ziel für Polynukleotidsonden (Roller *et al.*, 1992).

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf die 23S-rRNA, die mit der Domäne III nicht nur ein ideales Target für Polynukleotidsonden, sondern auch eine Vielzahl von Zielregionen für Oligonukleotidsonden bietet. Überdies besitzt das 23S-rRNA-Gen aufgrund seiner größeren Länge den beinahe doppelten Informationsgehalt im Vergleich zum 16S-rRNA-Gen (de Rijk *et al.*, 1995). Gleichwohl diente es bisher selten als Grundlage für phylogenetische Untersuchungen, da die Datensätze zur 23S-rDNA wesentlich weniger umfangreich sind als zur 16S-rDNA. Detailliertere Untersuchungen auf Isu-rRNA-Ebene liegen beispielsweise zur Phylogenie der Enterokokken (Behr *et al.*, 2000) und - basierend auf Partiaalsequenzen - der Ciliaten (Baroin-Tourancheau *et al.*, 1992) vor.

5 Die Gattung *Acinetobacter* als Modelltaxon zur Evaluation der Spezifität von DNA-Polynukleotidsonden

Aufgrund ihrer erheblichen Bedeutung und der überschaubaren Zahl beschriebener Arten - sieben zum Zeitpunkt der Versuche - bot sich die Gattung *Acinetobacter* als Gruppe von Modellorganismen zur Untersuchung der Spezifität von Domäne III-gerichteten Polynukleotidsonden auf intragenerischer Ebene an.

Die Gattung *Acinetobacter* beinhaltet mehrere bedeutende nosokomiale Pathogene (Bergogne-Bérézin und Towner, 1996; Gerner-Smidt und Frederiksen, 1993; Seifert *et al.*, 1997), von denen einige Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika aufweisen (Tjernberg und Ursing, 1989). Angehörige dieser Gattung sind ubiquitär in Boden und Wasser (Baumann, 1968; Juni, 1972) verbreitet. Sie wurden aufgrund der hohen Anzahl von Isolaten aus Abwasserreinigungsanlagen ausgiebig untersucht (Beacham *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 2001; Rossetti *et al.*, 1997; Seviour *et al.*, 1997; Wiedmann-al-Ahmad *et al.*, 1994), obwohl ihre tatsächlichen Bedeutung für die Phosphatentfernung (EPBR, Enhanced Biological Phosphorus Removal) in Frage steht (Mino, 2000; Mino *et al.*, 1998; Tandoi *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1994b). Als *Acinetobacter* spp. identifizierte Organismen besitzen industrielle Bedeutung durch ihre Fähigkeit, Mineralöl abzubauen, und als Produzenten von Bioemulgatoren (Di Cello *et al.*, 1997; Vaneechoutte *et al.*, 1999); andere vorläufig identifizierte Isolate besiedeln Standorte wie hydrothermale Kamine in der Tiefsee als Teil der Alvinelliden-assoziierten Mikroflora (Jeanthon, 2000). Auch eine Rolle von *Acinetobacter* in der Auslösung der Bovinen Spongiformen Enzephalitis (BSE) wird im Rahmen einer Auffassung von BSE als Autoimmunkrankheit, die im Gegensatz zur etablierten Prionen-Theorie (Prusiner, 1998) steht, diskutiert (Ebringer *et al.*, 1997; Ebringer *et al.*, 1998; Tiwana *et al.*, 1999).

Bezüglich der Taxonomie der Gattung herrschte seit Jahrzehnten Verwirrung (Dijkshoorn und Van der Toorn, 1992). Zwar konnte die Gattung *Acinetobacter* als Gruppe ausschließlich Oxidase-negativer Stämme durch Transformationstests umrissen werden (Juni, 1972), wies jedoch eine hohe biochemische und genetische Heterogenität auf (Johnson *et al.*, 1970). In ihr zusammengefaßte Organismen waren unter verschiedenen Gattungs- und Artnamen beschrieben worden (Henriksen, 1973).

Bouvet und Grimont (1986), Tjernberg und Ursing (1989) und Bouvet und Jeanjean (1989) untersuchten die Gattung mittels DNA-DNA-Hybridisierung, die ein unschätzbares Hilfsmittel zur Definition von Arten darstellt (Grimont, 1988) und als Methode der Wahl in der molekularen Taxonomie gilt.

Seitdem herrscht weitgehend Einigkeit darüber, daß die Gattung *Acinetobacter* mindestens 18 Untergruppen - häufig als DNA-Gruppen oder Genomospezies bezeichnet - umfaßt (Dijkshorn *et al.*, 1998), von denen bis zum September 2001 sieben als gültige Arten beschrieben waren: *A. calcoaceticus* (DNA-Gruppe 1), *A. baumannii* (2), *A. haemolyticus* (4), *A. junii* (5), *A. johnsonii* (7), *A. Iwoffii* (8) und *A. radioresistens* (12).

Weitere Studien zur Bestimmung intragenerischer Verwandtschaftsverhältnisse lieferten Ergebnisse, die diejenigen aus den erwähnten DNA-DNA-Hybridisierungsstudien stützten, darunter phylogenetische Analysen auf Grundlage von Gensequenzen für die Untereinheit B der DNA-Gyrase (Yamamoto *et al.*, 1999; Yamamoto und Harayama, 1996), die numerische Klassifikation auf der Grundlage biochemischer Eigenschaften (Kämpfer *et al.*, 1993) und eine Kombination verschiedener phäno- und genotypischer Charakterisierungsmethoden (Seifert *et al.*, 1997). Andere Arbeiten deckten sich nicht damit (Vaneechoutte *et al.*, 1995). Letzteres war insbesondere der Fall bei Studien, die auf der Phylogenie von 16S-rRNA-Genen beruhten (Ibrahim *et al.*, 1997; Rainey *et al.*, 1994) und nicht nur keine Übereinstimmung mit DNA-DNA-Hybridisierungen, sondern auch keine Deckung mit anderen phylogenetischen Untersuchungen wie Analysen auf der Grundlage von Aminoglycosid-6'-N-Acetyltransferase-Gensequenzen (Rudant *et al.*, 1999) zeigten. Als in der vorliegenden Arbeit erzielte Hybridisierungsergebnisse auf Basis von 23S-rRNA gerichteten Sonden auf starke Abweichungen von einer auf 16S-rRNA-Sequenzdaten basierenden Phylogenie hindeuteten, wurden vergleichende Sequenzanalysen der 23S-rRNA-Gene von *Acinetobacter*-Typstämmen erforderlich. In diese Untersuchungen wurden auch zwei neu beschriebene Arten aus der Gattung *Acinetobacter*, *A. schindleri* und *A. ursingii* (Nemec *et al.*, 2001), einbezogen.

B Material und Methoden

1 Umweltproben

Tabelle B.1: Probenahmestellen für DNA-Isolierung und Fixierung

Standort	Ökosystem
Weihenstephan, Freising, D	Landwirtschaftlich genutzte Böden, 5 cm Tiefe
Alpspitze, Wettersteingebirge, D	Stehendes Gewässer, Sediment
Partnach, Wettersteingebirge, D	Fließgewässer, Sediment
Shintoschrein, Nara, JP	Stehendes Gewässer
Tierkörperverwertungsanlage, Kraftisried, D	Belebtschlamm
Lower Kane Cave, Wyoming, USA	Bakterielle Matten, Karsthöhle

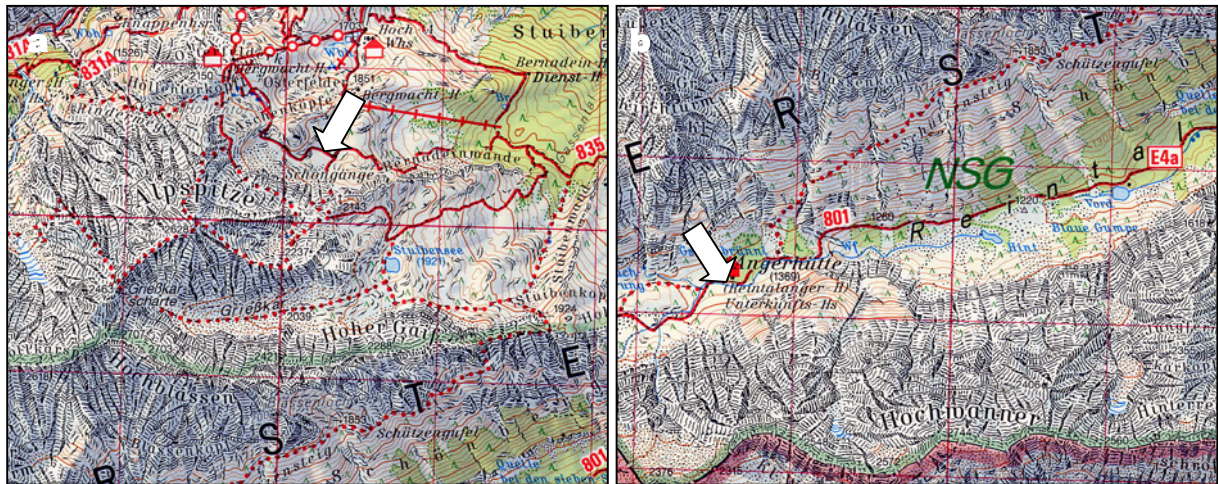


Abbildung B.1: Probenahmestellen im Wettersteingebirge (Topographische Karte 1:50000, Bayerisches Landesvermessungsamt München). a: Probenahmestelle für Genbank Z (1900 m ü. NN). b: Probenahmestelle für Genbank ZB (1360 m ü. NN).

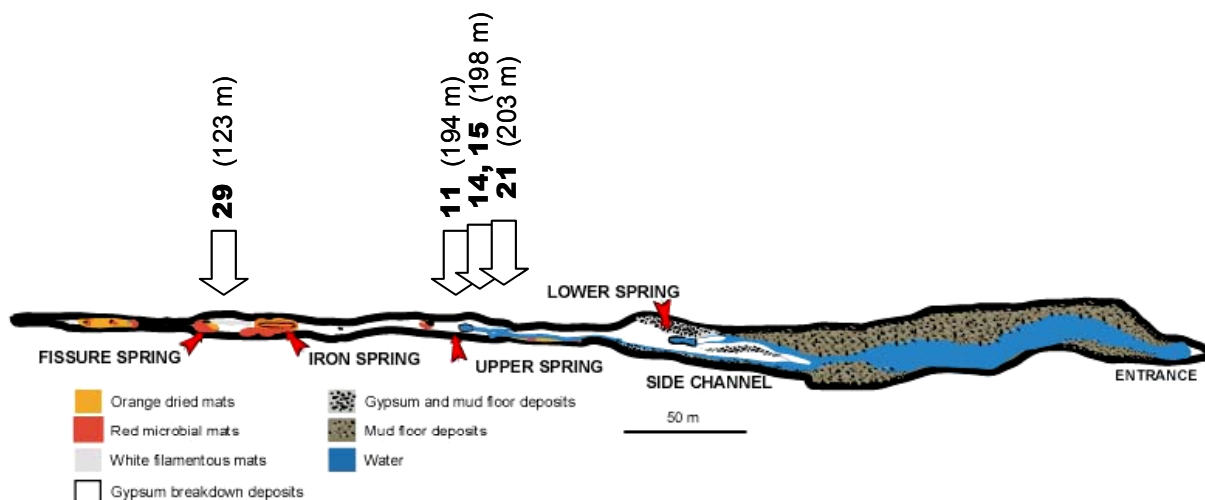


Abbildung B.2: Probenahmestellen in der Lower Kane Cave.

(<http://www.geo.utexas.edu/chemhydro/Annette/Kane/cavedesc.htm>; mod.)

2 Mikroorganismen

Tabelle B.2: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Stammnummer	Medium	T[°C]	Anzucht
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	DSM 11244 ^T	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	ATCC 17906 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	ATCC 17909 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter junii</i>	ATCC 17908 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 15309 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	ATCC 43998 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter schindleri</i>	NIPH 1034 ^T	R2A	30	aerob
<i>Acinetobacter ursingii</i>	NIPH 137 ^T	R2A	30	aerob
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 ^T	LB	37	aerob
<i>Geothrix fermentans</i>	DSM 14018 ^T	-	-	-
<i>Neisseria canis</i>	ATCC 14687 ^T	BHI	37	aerob

T Typstamm

ATCC American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

NIPH National Institute of Public Health, Prag, CZ

3 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung

3.1 Nährmedien

LB-Medium pH 7,2

Trypton (Casein-Hydrolysat)	15 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	9 g	
Agar	15 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

Caso-Agar pH 7,3 (Medium 220 lt. Medienliste der Deutschen Gesellschaft für Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, Braunschweig, D)

Pepton (Casein-Hydrolysat)	15 g
Pepton (Sojamehl)	5 g

NaCl	5 g	
Agar	15 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

R2A-Medium pH 7,2 (Reasoner und Geldreich, 1985)

Hefeextrakt	0,5 g	
Pepton (Casein-Hydrolysat)	0,5 g	
Casamino Acids (Difco)	0,5 g	
Glucose	0,5 g	
Lösliche Stärke	0,5 g	
K ₂ HPO ₄	0,3 g	
Na ₄ P ₂ O ₇	0,3 g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	50 mg	
Agar	15 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Wesel, D)

BHI, getrocknet	37 g	
Agar	15 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

Medien wurden 20 min bei 121°C und 1013 hPa autoklaviert.

3.2 Zellanzucht und Stammhaltung

Verwendete Mikroorganismen wurden unter den in Tab. 1 aufgeführten Bedingungen angezogen. Die Aufzucht erfolgte auf agarhaltigen Nährböden bzw. als Flüssigkultur in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Noctua K15/500, Mössingen, D). Die Stämme wurden auf festen Medien lediglich wenige Wochen bei 4°C gelagert. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte durch Verdünnungsausstriche und Teilsequenzierung der 16S-rDNA. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen (1:1 Glycerin und bewachsenes Nährmedium) hergestellt und bei -80°C gelagert.

4 Isolierung von Nukleinsäuren

Als Lösungsmittel diente im folgenden, soweit nicht anders vermerkt, H₂O_{reinst} (MilliQ, Millipore, Eschborn, D). Mit * gekennzeichnete Lösungen wurden autoklaviert.

4.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNA nach Wisotzkey *et al.* (1990, mod.)

Lösungen

Saline-EDTA-Lösung*	0,15 M NaCl 0,01 M EDTA; pH 8,0
Standard-Saline-Citrat (1x SSC)*	0,15 M NaCl 0,015 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0
LysozymbLösung	10 mg/ml Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 1xSSC
RNase A-Lösung	10 mg/ml RNase A (Merck, Darmstadt, D) in 2xSSC; 10 min auf 100°C erhitzt (zur Inaktivierung von DNasen)
Proteinase K-Lösung	10 mg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim, D)
SDS-Lösung	25% (w/v) Natriumdodecylsulfat
Natriumacetatlösung*	5 M Natriumacetat; pH 5,5
Chisom	Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)
Ethanol	absolut

Zellernte und -lyse aus Flüssigmedium

- Zentrifugation von 2 ml üN-Kultur 5 min bei 14000 x g und 4°C
- Aufnahme des Niederschlags in 1 ml Saline-EDTA-Lösung, erneute Zentrifugation
- Resuspension des Pellets in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
- Zugabe von 20 µl LysozymbLösung und Inkubation für 30 min bei 37°C
- Zugabe von 5 µl RNase A-Lösung und Inkubation für 30 min bei 37°C
- Zugabe von 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 60 min bei 37°C
- Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65°C (Inaktivierung von DNasen)

Zellernte und -lyse von der Platte

Diese Variation des modifizierten Wisotzkey-Protokolls ermöglicht eine noch zügigere Isolierung kleiner Mengen hochmolekularer, chromosomaler DNA.

- Resuspension von üN auf Platte gewachsenen Kolonien in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
- Zugabe von 20 µl Lysozym- sowie 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 45 min bei 37°C
- Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 60°C

Reinigung der DNA

- Zugabe von 180 µl Natriumacetatlösung und 745 µl Chisom, Schütteln
- Zentrifugation für 5 min bei 14000 x g und RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe von 2 Vol Ethanol und Fällern der DNA für 30 min bei -20°C
- Zentrifugation für 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Verwerfen des Überstandes
- Waschen mit 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Verwerfen des Überstandes und Eintrocknen des Pellets
- Aufnahme in 100 µl H₂O_{reinst}; Lagerung bei -20°C

4.2 Isolierung von DNA aus Umweltproben

Die DNA-Isolierung aus Umweltproben erfolgte mittels des Macherey-Nagel NucleoSpin Food Kits (Macherey-Nagel, Düren, D) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Verwendung von 0,2 g Probenmaterial pro Ansatz ermöglichte eine Ausbeute von bis zu 5 µg hochmolekularer DNA.

4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels des MiniPrep Plasmid Kits (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers aus transformierten Zellen gewonnen.

5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Absorptionsmaxima einzelner Nukleotide in der DNA liegen bei pH 7 zwischen 253 und 271 nm. Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde nach Clark und Switzer (1977) photometrisch bestimmt. Aliquots von Nukleinsäurelösungen wurden in Quarzküvetten überführt und in einem Spektralphotometer (LKB Ultrospec Plus, Pharmacia, Freiburg, D, bzw. Lambda 20, Perkin Elmer, Rodgau, D) bei 260 nm vermessen.

Als Grundlage zur Berechnung der vorliegenden DNA-Konzentrationen aus den erhaltenen Adsorptionswerten dienen folgende Näherungswerte²:

Doppelsträngige (ds) DNA:	1 OD _{260 nm} entspricht 50 ng/μl
Einzelsträngige (ss) DNA:	1 OD _{260 nm} entspricht 33 ng/μl
Einzelsträngige (ss) RNA:	1 OD _{260 nm} entspricht 40 ng/μl.

Verunreinigungen der DNA, beispielsweise durch RNA oder Proteine, können durch die Bestimmung der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm und Bildung der Quotienten $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ sowie $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$ festgestellt werden. Der für die Weiterbearbeitung der DNA nötige Reinheitsgrad ist bei folgenden Werten gewährleistet (Marmur, 1961):

$$E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}} > 1,9 \text{ sowie } E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}} > 2,2.$$

Die Berechnung der Konzentration von einzelsträngigen Oligonukleotiden erfolgt durch die Werte aus Tab. B.2 in Verbindung mit folgender Formel:

$$c = (V_{\text{Mess}} \cdot \text{OD}_{260\text{nm}}) / (V_{\text{Probe}} \cdot \varepsilon \cdot d)$$

c:	Konzentration des Oligonukleotids [mM]
V_{Mess} :	Meßvolumen [ml]
V_{Probe} :	Probenvolumen [ml]
d:	Schichtdicke [cm]
ε :	Oligonukleotidspezifischer Extinktionskoeffizient [cm ² /mol] berechnet aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleotide (vgl. Tab. B.2) des Oligonukleotids

Tabelle B.3: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der Desoxynukleotide¹.

Nukleotid	ε bei 260 nm [cm ² /μmol]	Molekulargewicht [g/mol]
dAMP	15,20	312,2
dCMP	7,05	288,2
dGMP	12,01	328,2
dTMP	8,40	303,2

² <http://www.eppendorf.com/katalog2000/german/deutschkap12.pdf>

6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Bestimmung von Größe, Reinheit oder, näherungsweise, Konzentration von Nukleinsäuren (chromosomale DNA, Plasmide, DNA-Amplifikate und RNA-Transkripte) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen. Durch Wanderung im elektrischen Feld werden Nukleinsäuren im Agarosegel nach ihrer Masse und Konformation – linear, offen zirkulär oder superhelikal – aufgetrennt.

Visualisiert werden können Nukleinsäuren unter UV-Licht (302 nm) durch Anlagerung von SYBRGreen oder Interkalation von Ethidiumbromid.

Zur Bestimmung von Größe und Menge der aufgetragenen Nukleinsäure erfolgt ein Vergleich mit einem mitgeführten Längenstandard bekannter Menge. Da das Mengenverhältnis von SYBRGreen zu DNA allerdings das Laufverhalten der Nukleinsäuren im Gel beeinflussen kann, wurde im Zweifelsfall zur Größenabschätzung erst nach der Elektrophorese gefärbt.

Lösungen

100x TAE	4,0 M Tris 2,0 M Eisessig 0,2 M EDTA; pH 8,0
Agarosegel	1-2% Agarose (Gibco/BRL, Eggenstein, D) in 1x TAE aufschmelzen
Auftragspuffer I	10 mM EDTA 5% (w/v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, D) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 0,10% SYBRGreen (FMC BioProducts, Rockland, ME)
Auftragspuffer II	10 mM EDTA 5% (w/v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, D) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
Standard	1 µg 1 kb-Standard (Gibco/BRL, Eggenstein, D)
Apparatur	Horizontal-Gelelektrophoreseapparatur Typ H3: 11x14cm, 100 ml Gelvolumen (Gibco/BRL, Eggenstein,D)
Geldokumentation	UV-Transilluminator, λ : 302 nm (Bachofer, Reutlingen, D) Cybertech CS1 Image Documentation System (Cybertech, Berlin, D)

Elektrophorese mit SYBRGreen im Auftragspuffer

- Probe bzw. Standard mit 1 vol Auftragspuffer I mischen, auf Agarosegel auftragen
- Elektrophorese in 1x TAE bei 80-160 mA (konstante Stromstärke)
- Dokumentation auf Transilluminator

Elektrophorese ohne SYBRGreen im Auftragspuffer

- Probe bzw. Standard mit 1 vol Auftragspuffer II mischen, auf Agarosegel auftragen
- Elektrophorese in 1x TAE bei 80-160 mA (konstante Stromstärke)
- Gel 20 min in Ethidiumbromidlösung färben, anschließend mit Wasser spülen
- Dokumentation auf Transilluminator

7 *In vitro*-Amplifikation mittels PCR (Poymerase-Kettenreaktion)

7.1 Oligonukleotide

Die folgenden Tabellen führen Oligonukleotidprimer auf, die nicht im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden. Bezugsquelle war MWG-Biotech AG (Ebersberg, D).

Die Dissoziationstemperatur T_d wurde nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_d[^\circ\text{C}] = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G).$$

A, C, G, T : Anzahl der entsprechenden Nukleotide

Tabelle B.4: 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidprimer.

Bezeichnung ³	Sequenz ⁴	Position ⁵	T_d [°C]	GC [%]
616F	5' -AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3'	8	58	45
630R	5' -CAK AAA GGA GGT GAT CC-3'	1529	50	47
ROG102F	5' -CGG GTA TCG ATC CCT GCC-3'	835	61	67

Tabelle B.5: 23S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidprimer.

Bezeichnung	Sequenz	Position	T_d [°C]	GC [%]
118F	5' -CCG AAT GGG GRA ACC C-3'	115	53	66
303F	5' -CGC TCA ACG GAT AA-3'	2419	42	50
313F	5' -AGT AGC GGC G-3'	242	34	70
985R	5' -CCG GTC CTC TCG TAC T-3'	2654	52	63
1037R	5' -CGA CAA GGA ATT TCG CTA C-3'	1930	52	44

³ F: Primer bindet an + bzw. codierenden Strang.
R: Primer bindet an – bzw. nichtcodierenden Strang.

⁴ **Basensymbole** (IUB/UWGCG; Nomenclature Committee 1985):

M = A oder C	Y = C oder T	W = A oder T	N = A oder C oder G oder T
R = A oder G	S = C oder G	K = G oder T	
V = A oder C oder G	D = A oder G oder T		
H = A oder C oder T	B = C oder G oder T		

⁵ Brosius *et al.*, 1981

Tabelle B.6: Modifizierte 23S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidprimer.

Bezeichnung	Sequenz	Position	T _d [°C]	GC [%]
317RT3	5'-ata ggt att aac cct cac taa <u>agg gac</u> CWG TGT CSG TTT HBG TAC ⁶ -3'	1602	58	46
1900FN	5'-aaa agc ggc cgc MAD GCG TAG NCG AWG G ⁷ -3'	1366	46/88	63

7.2 Durchführung

Für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen DNA-Amplifikationen wurde das *TaKaRa r-Taq*-System für Amplifikationsprodukte von unter 1000 Nukleotiden und das *TaKaRa Ex-Taq*-System für Amplifikationsprodukte von mehr als 1000 Nukleotiden (beide TaKaRa Shuzo Co., Otsu, JP) mit einem Thermocycler des Typs Primus 96 (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D) eingesetzt.

Standard-Reaktionsansatz

10x Reaktionspuffer	10 µl
dNTP-Mischung (je 2.5 mM)	8 µl
Vorwärtsprimer	0,5 µl
Rückwärtsprimer	0,5 µl
Polymerase (5U/µl)	0.3 µl
Matrizen-DNA	1-100 ng
H ₂ O _{reinst}	ad 100 µl

Um fälschlicherweise positive Ergebnisse als Folge von Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jeder Amplifikation ein Reaktionsansatz ohne DNA als Negativkontrolle mitgeführt.

Als Anhaltspunkt für die in einer Reaktion erforderliche Annealingtemperatur wurde der Mittelwert aus den Dissoziationstemperaturen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer genommen; gegebenenfalls wurde die jeweils optimale Annealingtemperatur empirisch ermittelt.

⁶ Unterstrichen: Promotor der T₃-RNA-Polymerase; fett: Start der *in vitro*-Transkription.

⁷ Fett: Erkennungsstelle der *NotI*-Restriktionsendonuklease.

Standard-Reaktionsschritte

1. Schritt (1x)	Initiale Denaturierung	94°C	4 min
	Denaturierung	94°C	30 sec
2. Schritt (30x)	Annealing	x°C	30 sec
	Elongation	72°C	y min
3. Schritt (1x)	Terminale Elongation	72°C	10 min

Im Verlauf jedes Zyklus wurde die Dauer der Elongationsperiode um 5 sec gesteigert, um nachlassende Aktivität der DNA-Polymerase zu kompensieren.

7.3 Random and limited PCR (RL-PCR)

Die vielfältigen Möglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion stoßen an ihre Grenzen, wenn die Amplifikation von DNA-Abschnitten gewünscht wird, deren flankierende Regionen nicht bekannt sind. Liegen keine Informationen über die Umgebung der zu vervielfältigenden Sequenz vor, ist die Anwendung passender Primer unmöglich.

Dieses Problem stellt sich vor allem bei der Sequenzierung terminaler Regionen von rRNA-Genen, wenn die Organisation der Operons im Genom des betreffenden Organismus nicht bekannt ist und Versuche mit universellen Primern – beispielsweise mit einem 5S-rRNA-gerichteten Primer den 3'-Terminus des 23S-rRNA-Gens für eine Sequenzierung zu amplifizieren – scheiterten.

Die *random and limited PCR* (RL-PCR, Richter und Ludwig, bisher unveröffentlicht) überwindet diese Schwierigkeiten: In einem ansonsten konventionellen Amplifikationsansatz wird lediglich *ein* Primer eingesetzt, dessen Zielsequenz sich in einem bekannten Abschnitt der zu amplifizierenden DNA befindet. Im Verlauf eines zunächst konventionellen PCR-Programms erfolgt unter sehr stringenten Bedingungen die Synthese einzelsträngiger Fragmente, da kein gegenläufiger Primer im Ansatz vorliegt. Sie enden an beliebigen Stellen. Dieses erste Stadium des RL-PCR-Programmes endet nach 30 Zyklen. Zu diesem Zeitpunkt liegen die einzelsträngigen Amplifikate schon in etwa dreißigfachem Überschuß gegenüber der Matrize vor. Abgeschlossen wird dieser Vorgang durch einen einmaligen Zyklus, in dem die Annealingtemperatur deutlich unter die für den verwendeten Primer spezifische gesenkt wird.

Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit befinden sich auf dem Genom im Elongationsbereich Regionen, die Ähnlichkeiten mit der Primerzielsequenz besitzen. Unter den relaxierten Bedingungen dieses Einzelschritts bindet der Primer unspezifisch auch an derartige Sequenzen auf den einzelsträngigen Fragmenten. Im Verlauf der nachfolgenden Elongation werden diese Fragmente zu Doppelsträngen

vervollständigt. In einem anschließenden Schritt von 25 Zyklen wird die Annealingtemperatur wieder angehoben.

Auch für die RL-PCR wurde das *TaKaRa Ex Taq*-System (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, JP) in einem Standard-Reaktionsansatz mit einem Thermocycler des Typs Primus 96 (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D) verwendet.

Reaktionsschritte für RL-Amplifikationen mit TaKaRa-*Ex Taq*-Polymerase und Primer 303 (vgl. Tab. B.5)

1. Schritt (1x)	Initiale Denaturierung	94°C	4 min
	Denaturierung	94°C	30 sec
2. Schritt (30x)	Annealing	48°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
	Denaturierung	94°C	30 sec
3. Schritt für unspezifisches Primer-Annealing (1x)	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
	Denaturierung	94°C	30 sec
4. Schritt (25x)	Annealing	44°C	30 sec
	Elongation	72°C	2 min
	Terminale Elongation	72°C	10 min

8 Reinigung von PCR-Produkten

Nach der *in vitro*-Amplifikation wurden Amplifikationsprodukte mit einer Länge von mehr als 500 Nukleotiden mit dem Quickstep PCR Purification Kit V.5 (Edge BioSystems, Gaithersburg, Md.) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Waren die Amplifikate kürzer oder enthielten sie markierte dNTPs, wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) eingesetzt.

9 Klonierung von Nukleinsäurefragmenten

Nukleinsäurefragmente aus komplexen DNA-Extraktionen aus der Umwelt wurden durch Klonierung mit dem TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) vereinzelt.

10 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte mittels linearer Amplifikationssequenzierung (*Cycle Sequencing*) unter Verwendung IR-markierter Primer. Sequenzierreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase™ Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) oder dem SequiTherm Excel™ II DNA Sequencing Kit-LC (66 cm, Epicentre, Madison, WI) durchgeführt. Als Farbstoffe dienten IRDye700 und IRDye800 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D). Im Anschluß wurden die erhaltenen Fragmente im Polyacrylamidgel in einem LI-COR Global IR² DNA Sequencer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D) aufgetrennt und mittels Laser online detektiert. Die Auswertung der Sequenziergele erfolgte mit e-Seq DNA Sequencing and Analysis Software (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D).

Tabelle B.7: 16S-rRNA-gerichtete Sequenzierprimer.

Bezeichnung	Sequenz	Position	T _d [°C]	GC [%]
97k	5'-CTG CTG CCT CCC GTA-3'	343	53	67
609RIII1	5'-ACT ACC VGG GTA TCT AA-3'	785	49	45

Tabelle B.8: 23S-rRNA-gerichtete Sequenzierprimer.

Bezeichnung	Sequenz	Position	T _d [°C]	GC [%]
328Fm97	5'-TCC TAA GGT AGC GAA ATT CCT TG-3'	1923	59	44
987Ry97	5'-CTT AGA TGC NTT CAG-3'	2746	44	43
992Fmod	5'-AGT ACC GYG AGG RAA-3'	457	48	53
992Rmod	5'-TTY CCT CRC GGT ACT-3'	457	48	53
1019Fmod	5'-TAG CTG GTT CTC YBC GAA-3'	803	54	51
1019Ry97	5'-TTC GRR GAG AAC CAG CTA-3'	803	54	50
1020Rmod	5'-KCT GGG YTS TTY CCC T-3'	976	53	59
1025Fy97	5'-GGT AGG RGA GCD TTC	1187	50	59
1036F	5'-TTG RYM CYT CGA TGT CG-3'	2492	53	53
1037Rm97	5'-CTT ACC CGA CAA GGA ATT TCG-3'	1934	58	48
1910F	5'-GCG GCC GTA ACT ATA A	1905	49	50

Tabelle B.9: Vektorgerichtete Sequenzierprimer (pCR[®]2.1-TOPO-Vektor, Invitrogen, Carlsbad, Ca.).

Bezeichnung	Sequenz	Position ⁸	T _d [°C]	GC [%]
M13F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	391	53	53
M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	205	50	47

⁸ Bezogen auf die Vektorsequenz, vgl. Anleitung zum TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, Ca.

Standard-Reaktionsschritte

1. Schritt (1x)	Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Schritt (25x)	Denaturierung	94°C	30 sec
	Annealing	45°C	30 sec
3. Schritt (1x)	Terminale Elongation	72°C	10 min

11 Auswertung von Sequenzdaten und Konstruktion von Oligonukletidsonden**11.1 Vergleichende Anordnung von Sequenzen (Alignment)**

Die Ermittlung phylogenetischer Verhältnisse erfordert das Einordnen der Sequenzen in ein Alignment, in dem sich homologe Positionen entsprechen. In variablen Sequenzbereichen des Alignments dienen Sekundärstrukturanalysen oder kleinere Gruppen mit konservierter Basenabfolge als Orientierung bei der Bestimmung homologer Positionen. Die Einordnung von Sequenzen in ein bestehendes Alignment erfolgte mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes (Ludwig und Strunk, 1996).

11.2 Rekonstruktion von Stammbäumen

Meist erfolgt die Darstellung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse in Form von Dendrogrammen. Mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes lassen sich durch Erstellen und Anwenden von Filtern die zur Stammbaumrekonstruktion benötigten Positionen des Alignments auswählen und Stammbäume nach dem Maximum Parsimony-Verfahren konstruieren. Die Topologie der Bäume wurde mit dem Maximum Likelihood- und dem Neighbour Joining-Verfahren (Saitou und Nei, 1987) überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Matrices paarweiser Distanzwerte, die als Grundlage von Stammbaumrekonstruktionen nach dem Neighbour Joining-Verfahren dienen, wurden ebenfalls mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes unter Berücksichtigung des Verfahrens nach Jukes und Cantor (1969) erstellt. Referenzsequenzen wurden den Datenbanken (De Rijk *et al.*, 2000; Maidak *et al.*, 1999) entnommen.

Teilsequenzen wurden in das Alignment der vollständigen Sequenzen an den entsprechenden Positionen eingefügt. Das ARB-Softwarepaket ermöglicht das Verrechnen dieser Teilsequenzen mit dem gesamten Datensatz nach dem Parsimony-Verfahren. Dabei werden sie an den Stellen in einen schon bestehenden Baum integriert, an denen sich ihre nächstverwandten Sequenzen befinden. Der Baum selbst wird nicht neu aufgebaut.

Die ermittelten Sequenzen wurden durch die Erstellung von Bäumen für einzelne Teilbereiche der 16- und 23S-rRNA-Gene auf das Vorliegen von Chimären untersucht.

11.3 Sondenkonstruktion

Gegen ribosomale RNA gerichtete Oligonukleotidsonden wurden ebenfalls mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes und jeweils aktueller Sequenzdatenbanken konstruiert. Die momentan zur Verfügung stehenden Datensätze umfassen ungefähr 30.000 Sequenzen im 16S- und ungefähr 5.000 Sequenzen im 23S-rRNA-Datensatz.

12 Konstruktion von Polynukleotidsonden

12.1 Konstruktion von RNA-Polynukleotidsonden

Das angewendete Verfahren der Herstellung von RNA-Polynukleotidsonden bedient sich der RNS-Polymerase des Phagen T3. Von einem DNA-Abschnitt fertigt das Enzym unter Verwendung markierter Nukleotide in vitro RNA-Transkripte an, die direkt als Sonden eingesetzt werden können. Voraussetzung ist, daß das Matrizenmolekül am Startpunkt der Transkription eine Promotor-Region für die T3-Polymerase trägt. Der T3-Promotor kann an den reversen Amplifikationsprimer gekoppelt werden.

Stehen dem Enzym neben unmarkierten auch fluoreszenzmarkierte Nukleotide zur Verfügung, bezieht es diese ebenfalls in die Synthese der Transkripte mit ein, wobei die Ausbeute an Transkripten mit steigendem Anteil markierter Nukleotide sinkt. Gleichzeitig steigt die Markierungseffizienz, d.h. es werden mehr Reportermoleküle eingebaut (Trebesius *et al.*, 1994).

Lösungen

NTP-Mischung	100 mM ATP (Roche, Mannheim, D) 100 mM CTP (Roche, Mannheim, D) 100 mM GTP (Roche, Mannheim, D) 35 mM UTP (Roche, Mannheim, D) 65 mM Fluorescein-16-UTP (Roche, Mannheim, D)
EDTA-Lösung	0,2 M EDTA; pH 8,0
Ammoniumacetat-Lösung	10 M NH ₄ -Acetat
TE-Puffer	10 M Tris-HCl; pH 7,2 1 mM EDTA

Reaktionsansatz

NTP-Mischung	3 µl
Transkriptionspuffer 10x (Roche, Mannheim, D)	3 µl
T3-RNA-Polymerase (Roche, Mannheim, D)	3 µl
RNase-Inhibitor (Roche, Mannheim, D)	0,5 µl
Matrizen-DNA	50-300 ng
H ₂ O _{reinst}	ad 30 µl

Transkription

- Inkubation des Ansatzes 3h bei 37°C im Wasserbad
- Abbau der Matrizen-DNA durch 3 µl DNase I (RNase-frei, Roche, Mannheim, D)
- Inkubation 15 min bei 37°C im Wasserbad
- Beendigung der DNase-Aktivität durch Zugabe von 3 µl EDTA-Lösung
- Fällung der Transkripte durch Zugabe von 16 µl Ammoniumacetat-Lösung und 156 µl EtOH_{abs.} (-20°C)
- Inkubation 2 h bei -20°C
- Zentrifugation 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Waschen des Pellets mit 150 µl EtOH 70%
- Zentrifugation 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Trocknung in der Vakuumzentrifuge (Savant Speed Vac Concentrator, Bachofer, Reutlingen, D) für 10 min
- Resuspension des Pellets in 50 µl TE-Puffer und 1 µl RNase-Inhibitor

12.2 Konstruktion von DNA-Polynukleotidsonden

Für die Verwendung in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurden DNA-Polynukleotidsonden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein (Absorptionsmaximum: 495 nm; Emissionsmaximum: 520 nm) und Cy3 (5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarboxyanin; Absorptionsmaximum: 550 nm; Emissionsmaximum: 570 nm) markiert. Die Inkorporation der an Nukleotide gebundenen Farbstoffe erfolgte durch *in vitro*-Amplifikation. Dabei kamen Fluorescein-12-dUTP (Hoffmann-La Roche, Basel, CH) bzw. FluoroLink Cy3-dCTP sowie FluoroLink Cy3-dUTP (beide Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) zum Einsatz. Durch die Verwendung zweier markierter dNTP-Spezies, Cy3-dCTP sowie Cy3-dUTP, konnte die Anzahl von Reportermolekülen pro Sonde verdoppelt werden (DeLong *et al.*, 1999). Die PCR-Reaktionsbedingungen wurden nicht weitergehend verändert.

Um in *in situ*-Hybridisierungen eine möglichst hohe Signalintensität zu erreichen, sollte die Markierungsrate in der Sondenherstellung möglichst hoch sein. Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Nukleotiden wurde im Bereich von 0,7 bis 1,5 variiert; mit zunehmendem Anteil markierter Nukleotide im Reaktionsansatz sank die Ausbeute an Sonde. Für die Herstellung von Standard-Polynukleotidsonden mit einer Länge von ca. 300 Nukleotiden wurde das r Taq-, für die Herstellung von über 1 kb langen Polynukleotidsonden (Domäne I-III-Sonden) das Ex Taq-System von TaKaRa (Shuzo, Otsu, J) eingesetzt. Die Aufreinigung der Sonden erfolgte mittels

des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden, G). Der Reinheitsgrad der Sonden war nach einer Aufreinigung durch Ethanolfällung für den späteren Einsatz in *in situ*-Hybridisierungen nicht ausreichend.

13 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

PFA-Lösung	4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS [PFA in H ₂ O _{reinst} durch Erhitzen und Zugabe von NaOH lösen, mit 3x PBS bis zu einer Endkonzentration von 1x PBS versetzen, pH auf 7,2 einstellen und sterilfiltrieren]
Objektträger (OT)	10 Aussparungen, „Amann-Typ“, (Nr. 12164201) (Marienfeld, Lauda-Königshofen, D)
Deckglas	(Marienfeld, Lauda-Königshofen, D)
Ethanol	absolut
PBS	130 mM NaCl 10 mM Na _x H _y PO ₄ (0,2 M Na ₂ HPO ₄ mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,2 eingestellt)
Citifluor AF1	(Citifluor, London, GB)
Vectashield H-1000	(Vector, Burlingame, CA)
Mikroskop	Axioplan (Zeiss, Oberkochen, D)
Filtersatz 9 (Fluorescein)	Anregung: BP 470/40 nm Strahlenteiler: FT 510 nm Emission: LP 520 nm (Zeiss, Oberkochen, D)
Filtersatz 15 (Cy3)	Anregung: BP 546/12 nm Strahlenteiler: FT 580 nm Emission: LP 590 nm (Zeiss, Oberkochen, D)
Kamera	CCD (Princeton Instruments, Trenton, NJ)
Bildanalyse	WinView32 (Princeton Instruments, Trenton, NJ)
Konfokales Laser-scanningmikroskop	Lsm 510 (Zeiss, Oberkochen, D) mit Argon-Ionen-Laser (450-514 nm) sowie zwei Helium/Neon-Lasern (543 nm und 633 nm)
Bildanalyse	Lsm 5 Image Browser (Zeiss, Oberkochen, D)

13.1 Fixierung von Probenmaterial

Um die Morphologie von Zielzellen in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu erhalten, wurde vor der Hybridisierung eine Fixierung des Probenmaterials – sowohl von Reinkulturen als auch von Umweltproben – mit Paraformaldehyd durchgeführt. Paraformaldehyd führt zu einer Quervernetzung der Proteine und stabilisiert damit die Zellwand.

- Zellsuspension mit 3 vol. 4%-PFA-Lösung mischen
- Inkubation 4 h bei 4°C
- Zentrifugation 5 min bei 14000 x g und RT
- Waschen des Niederschlags in 1x PBS
- Zentrifugation 5 min bei 14000 x g und RT
- Resuspension des Pellets in 1 vol. 1x PBS und 1 vol. Ethanol
- Lagerung bei -20°C

13.2 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden (Manz et al., 1992; mod.)

Lösungen

Oligonukleotid-Sondenlösung	5 µM	Oligonukleotidsonde, am 5'-Terminus fluoreszenzmarkiert
Hybridisierungspuffer	20 mM	Tris-HCl ; pH 8,0
	0,01 %	SDS
	900 mM	NaCl
	x%	Formamid ⁹ (je nach erforderlicher Stringenz)
Waschpuffer	20 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	0,01 %	SDS
	y mM	NaCl ⁷
	z mM	EDTA ⁷

Hybridisierung auf Objektträgern

- Fixierte Zellen auf die Felder des Objektträgers pipettieren und bei 46°C trocknen
- Aufsteigende Ethanolreihe: Objektträger zur Dehydrierung und Nachfixierung der Zellen je 3 min in 50%igen, 80%igen und 96%igen Ethanol tauchen

⁹ vgl. Tab. B.10

- Nach Trocknung des Objektträgers auf jedes Feld 9 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Sondenlösung pipettieren und vermischen
- Zellstoff mit Hybridisierungspuffer befeuchten und mit dem Objektträger in ein 50 ml-Probengefäß (Greiner, Solingen, D) überführen
- Gefäß verschließen und 120 min bei 46°C inkubieren
- Objektträger mit Waschpuffer (48°C) abspülen und in 50 ml Waschpuffer für 15 min bei 48°C inkubieren
- Mit H₂O_{dest.} spülen, abschütteln und lichtgeschützt lufttrocknen
- Lagerung des vollständig getrockneten Objektträgers bei -20°C

Hybridisierung in Lösung

- Fixierte Probe 5 min bei 14000 x g abzentrifugieren
- Aufsteigende Ethanolreihe: Niederschlag jeweils 3 min in 50%igem, 80%igem und 96%igem Ethanol waschen
- Nach vollständiger Trocknung Resuspension des Niederschlags in 0,9 Vol Hybridisierungspuffer und 0,1 Vol Sondenlösung
- Hybridisierung 2-6 h bei 46°C
- Zentrifugation 5 min bei 14000 x g
- Sehr vorsichtiges Dekantieren des Überstandes, da Niederschlag sehr locker
- Resuspension des Niederschlags in 1 Vol Waschpuffer (48°C)
- Waschen 15 min bei 48°C
- Zentrifugation 10 min bei 14000 x g
- Resuspension des Niederschlags in 30 µl H₂O_{reinst}

Tabelle B.10: Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer und zugehörige Salz- und EDTA-Konzentrationen für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen.

Hybridisierungspuffer	Waschpuffer	
x% Formamid	y mM NaCl	z mM EDTA
0	900	-
5	636	-
10	450	-
15	318	-
20	225	5
25	159	5
30	112	5
35	80	5
40	56	5
45	40	5

50	28	5
55	20	5
60	14	5
65	10	5
>70	-	5

Tabelle B.11a: Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Oligonukleotidsonden.

Sonde	Zielorganismen	Quelle
EUB338	Spezifitäten: Siehe Literatur	Amann <i>et al.</i> , 1990a
EUB338-II		Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III		Daims <i>et al.</i> , 1999
ACA23a	<i>Acinetobacter sp.</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1994

Tabelle B.11b: Sequenzen der Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	FA[%] ¹⁰
EUB338	5' -GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	_11
EUB338-II	5' -GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'	_10
EUB338-III	5' -GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3'	_10
ACA23a	5' -ATC CTC TCC CAT ACT CTA-3'	35

13.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit RNA-Polynukleotidsonden

Die Durchführung von Einzelzellhybridisierungen mit Transkriptsonden folgte dem Standardprotokoll (Trebesius *et al.*, 1994).

Wurden Poly- mit Oligonukleotidsondenhybridisierungen kombiniert, folgte die Hybridisierung niedrigerer Stringenz (in der Regel mit Oligonukleotiden) auf jene höherer Stringenz (mit Polynukleotiden).

13.4 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit DNA-Polynukleotidsonden

13.4.1 1. Variante: Analog zur RNA-Polynukleotidsonden-Hybridisierung

Die DNA-Polynukleotidsonden werden wie RNA-Polynukleotidsonden eingesetzt, wobei - entsprechend der im Gegensatz zu RNA-RNA-Hybriden wesentlich

¹⁰ im Hybridisierungspuffer

¹¹ -: kann bei jeder FA-Konzentration eingesetzt werden

niedrigeren Bindungsenergie von DNA-RNA-Hybriden - die Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer drastisch gesenkt wird.

Durchführung

- Fixierte Zellen auf die Felder des Objektträgers pipettieren und bei 46°C trocknen
- Aufsteigende Ethanolreihe: Objektträger zur Dehydrierung und Nachfixierung der Zellen je 3 min in 50%igen, 80%igen und 96%igen Ethanol tauchen
- Nach Trocknung des Objektträgers auf jedes Feld 9 µl Hybridisierungspuffer und 3 µl Sondenlösung pipettieren und vermischen
- Zellstoff mit Hybridisierungspuffer befeuchten und mit dem Objektträger in ein 50 ml-Probengefäß (Greiner, Solingen, D) überführen und Gefäß verschließen
- Denaturierung 5 - 30 min bei 80°C
- Hybridisierung 3 - 12 h bei 53°C
- Mit H₂O_{dest.} spülen, abschütteln und lichtgeschützt lufttrocknen
- Lagerung des vollständig getrockneten Objektträgers bei -20°C

13.4.2 2. Variante: Analog zur Oligonukleotidsonden-Hybridisierung

Lösungen

Polynukleotid-Sondenlösung	30-200 ng/µl	DNA-Polynukleotidsonde in TE-Puffer
Hybridisierungspuffer		Vgl. B.13.2
Waschpuffer		Vgl. B.13.2

Durchführung

- Fixierte Zellen auf die Felder des Objektträgers pipettieren und bei 46°C trocknen
- Aufsteigende Ethanolreihe: Objektträger zur Dehydrierung und Nachfixierung der Zellen je 3 min in 50%igen, 80%igen und 96%igen Ethanol tauchen
- Nach Trocknung des Objektträgers auf jedes Feld 9 µl Hybridisierungspuffer und 3 µl Sondenlösung pipettieren und vermischen
- Zellstoff mit Hybridisierungspuffer befeuchten und mit dem Objektträger in ein 50 ml-Probengefäß (Greiner, Solingen, D) überführen und Gefäß verschließen
- Denaturierung 5 - 30 min bei 80°C

- Hybridisierung 2 - 5 h bei 46°C
- Objektträger mit Waschpuffer (48°C) abspülen und in 50 ml Waschpuffer für 15 min bei 48°C inkubieren
- Mit H₂O_{dest.} spülen, abschütteln und lichtgeschützt lufttrocknen
- Lagerung des vollständig getrockneten Objektträgers bei -20°C

Wurden Hybridisierungen mit Poly- und Oligonukleotidsondenhybridisierungen kombiniert, folgte der Schritt niedrigerer Stringenz (in der Regel mit Oligonukleotiden) auf jenen höherer Stringenz (mit Polynukleotiden).

13.5 Detektion von Zielzellen

- Proben in Einbettungsmedium einbetten und Deckglas auflegen
- Dokumentation mittels Epifluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Laserscanningmikroskopie und bildgebenden Verfahren
- Lagerung hybridisierter Objektträger für weitere Fluoreszenzmikroskopie nach Abspülen des Einbettungsmediums mit H₂O_{dest.} und vollständiger Trocknung in dicht verschlossenem 50 ml-Reaktionsgefäß bei -20°C

14 Hybridisierung in Mikrotiterplatten

Zur Rückhaltung von Zielzellen in Mikrotiterplatten werden DNA-Polynukleotidsonden in den Kavitäten von PCR-fähigen Mikrotiterstrips immobilisiert. Die in Halos aus vorher unter stringenten Bedingungen hybridisierten Zielzellen herausragenden entsprechenden Polynukleotidsonden können in zwei nachgeschalteten Schritten unter weniger stringenten Bedingungen mit den immobilisierten Sonden hybridisieren, was die Rückhaltung der Zielzellen in den Kavitäten und eine auf Amplifikationstechniken gestützte weitere Untersuchung ermöglicht.

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterstrips	NucleoLink (NUNC, Roskilde, DK) TopYield (NUNC, Roskilde, DK)
Polynukleotid-Sondenlösung	100 ng/µl unmarkiertes PCR-Produkt
PBS	120 mM NaCl 10 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (0,2 M Na_2HPO_4 mit 0,2 M NaH_2PO_4 auf pH 7,2 eingestellt)
MgCl ₂ -PBS	100 mM MgCl ₂ in PBS
EDC-Lösung	10 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid in MgCl ₂ -PBS. Lösung frisch herstellen.
Polynukleotidsonden-Hybridisierungspuffer	vgl. B.13.4.1
MTP-Hybridisierungslösung	5x SSC 1% Blockingreagenz 0,1% N-Laurylsarkosin 0,02% SDS x% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
2x SSC (Standard-Saline-Citrat)	0,3 M Natriumchlorid 0,03 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0

14.1 Immobilisierung von Polynukleotidsonden

- 10 µl Polynukleotidsondenlösung 10 min bei 100°C denaturieren
- Denaturierte Polynukleotidsondenlösung mit 40 µl eisgekühlter EDC-Lösung mischen und in Kavität pipettieren
- Inkubation 60 min bei 37°C; Überstand ausklopfen

- Einbacken 60 min bei 60°C
- Aufbewahrung von mit Klebefolie verschlossenen immobilisierten Strips bei 4°C
- Vor Benützung der Strips: 2x Spülen mit PBS

14.2 Hybridisierung in Lösung

- Überführung von PFA-fixiertem Probenmaterial (vgl.B.13.1) in 1,5 ml-Reaktionsgefäß
- Zentrifugation 5 min bei 14000 x *g* und RT
- Resuspension des Pellets in 1,2 Vol Polynukleotidsonden-Hybridisierungspuffer sowie 0,4 Vol Polynukleotidsondenlösung
- Denaturierung unter Drehen 30 min bei 80°C
- Hybridisierung unter Drehen üN bei 53°C

14.3 1. Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (Zwirgmaier, persönliche Mitteilung, mod.)

- Hybridisierungsansatz mit 6,25 Vol MTP-Hybridisierungspuffer auffüllen
- Davon jeweils 50 µl in die Kavitäten A bis D eines Mikrotiterstrips pipettieren
- Hybridisierung 90 min bei 53°C

14.4 2. Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (Zwirgmaier, persönliche Mitteilung, mod.)

- Überführung der Hybridisierungsansätze aus den Kavitäten A bis D in die entsprechenden Kavitäten E bis H
- Hybridisierung 90 min bei 53°C
- Verwerfen der Überstände und 3x Waschen der Kavitäten in je 100 µl 2x SSC 10 min bei 37°C
- Detektion angereicherter Zielzellen durch PCR (vgl. B.6) mit Initialer Denaturierung 12 min bei 94°C

15 Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden auf Objektträgern PFA-fixierte Umweltproben (vgl. B.11.1) auf das Vorliegen von Zellen, deren unmittelbare Umgebung untersucht werden sollte, durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen getestet (vgl. B.11.2). Die Proben wurden anschließend mittels eines Magnetron SCD 050 Sputter Coaters (BAL-TEC, Walluf, D) mit einer ca. 5 nm starken Schicht Platin „besputtert“ (Huber *et al.*, 1998). Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalysen wurden mittels eines mit energiedispersiver Röntgenmikroanalyse ausgerüsteten S-4100 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskops (Hitachi, Tokio, JP) bei 5 (Bildaufnahme) und 20 kV (Elementanalyse) durchgeführt; die Erstellung von Spektren erfolgte mit Thermo NORAN-Software (Thermo NORAN, Middleton, WI). Diese Arbeiten wurden am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Wanner durchgeführt.

16 Isolierung von Zielzellen mittels Durchflußcytometrie

Die Durchflußcytometrie erlaubt die Vermessung einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl und ihre anschließende Sortierung. Erfasst werden kann eine Vielzahl von Parametern. Von besonderer Bedeutung sind das Vorwärtsstreulicht, aus dem auf Größe und interne Beschaffenheit einer Zelle geschlossen werden kann, und die Fluoreszenz, die in Verbindung mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, die taxonspezifische Anreicherung von Zellen ermöglicht (Fuchs, 1999).

Die Isolierung von Zielzellen aus in Lösung hybridisiertem Probenmaterial (vgl. B.11.2) erfolgte mittels eines MoFlo High Performance Cell Sorters (Cytomation, Freiburg, D). Nach der Hybridisierung des Belebtschlammes erfolgte eine Ultraschallbehandlung im Wasserbad. Danach wurde das Probenmaterial durch einen Celluloseacetatfilter (3 µm Porenweite; Sartorius, Göttingen, D) filtriert und in das Durchflußcytometer eingespeist. Die Zählereignisse wurden aufgezeichnet und in einem Dotplot-Diagramm wurde die sondenvermittelte Fluoreszenz gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Durch „gating“ konnte die zu untersuchende Zellpopulation vom Hintergrund abgegrenzt und für die Zellsortierung in Eppendorf-Reaktionsgefäße ausgewählt werden. Für die weitergehende mikroskopische Analyse wurden die isolierten Zellen auf Polycarbonatfilter (0,2 µm Porenweite, Typ GTTP, Durchmesser 25 mm; Millipore, Eschborn, D) aufgebracht und mit SYBRGreen (FMC BioProducts, Rockland, ME; 1:5000 in H₂O_{reinst} verdünnt) gegengefärbt. Diese Arbeiten wurden am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, in Zusammenarbeit mit Dr. B. Fuchs durchgeführt.

17 Isolierung von Zielzellen mittels Mikromanipulation

Die Isolierung von Zielzellen aus PFA-fixiertem Probenmaterial erfolgte an einem inversen Axiovert 25-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, D), das mit einem 5171-Mikromanipulator und einem 5246 plus-Transjektor (beide Eppendorf, Hamburg, D) ausgerüstet war. Die Dokumentation des Manipulationvorgangs erfolgte durch eine CCD-Kamera (AVT-BC-12CE; Zeiss, Oberkochen, D). In Lösung hybridisierte Proben (B.12.2) wurden auf Deckgläser aufgebracht, bei 46°C getrocknet und mit dem Antiquenching-Agens DABCO (in Glycerin) überschichtet. Zellen, die durch ihre sondenvermittelte Fluoreszenz als Zielzellen identifiziert werden konnten, wurden durch Ansaugen in eine im 45°-Winkel abgeschrägte Mikrokapillare mit einem Durchmesser von ca. 10 µm („Bactotip“) in Eppendorf-Reaktionsgefäße vereinzelt (Fröhlich und König, 1999). Diese Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, in Zusammenarbeit mit Dr. J. Fröhlich durchgeführt.

C Ergebnisse

1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit DNA-Polynukleotidsonden

1.1 Konstruktion von DNA-Polynukleotidsonden

Die Typstämme von sieben Arten der Gattung *Acinetobacter*, die für die Konstruktion von Polynukleotidsonden verwendet wurden, sind in Tabelle B.2 aufgeführt.

DNA-Polynukleotidsonden wurden durch die Amplifikation von Fragmenten des 23S-rRNA-Gens unter Verwendung der Primer 1900FN und 317RT3 (Tab. B.6) und Inkorporation Cy3- und fluoresceingekoppelter Desoxyribonukleotide erzeugt. (Abb. C.1). Die Fragmente hatten eine Länge von ungefähr 290 bp.

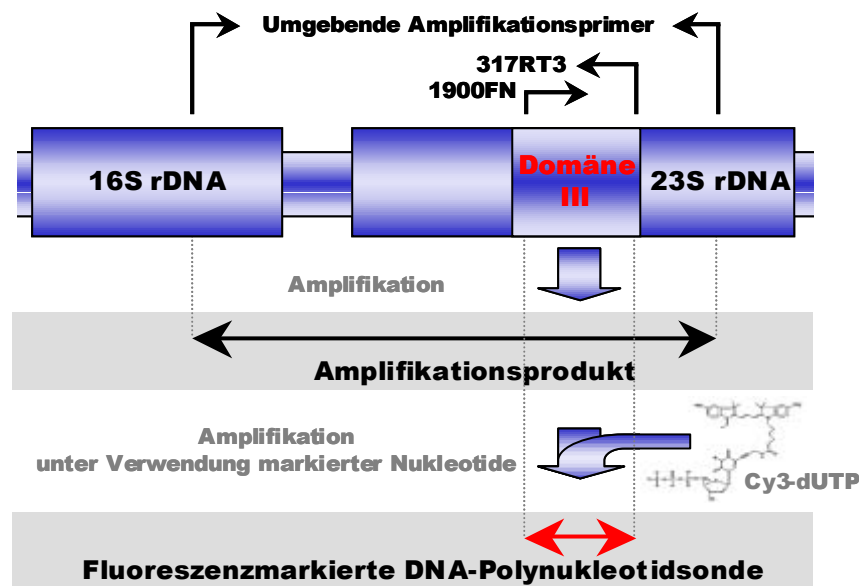


Abbildung C.1: Schematische Darstellung der Erzeugung von DNA-Polynukleotidsonden.

Ein Verhältnis markierter zu unmarkierten Desoxyribonukleotiden von 1:1 garantierte eine ausreichende Markierungsdichte für die sichere Detektion sondenmarkierter Zielzellen auch in komplexem Probenmaterial. Dieses Verhältnis wurde auch für die Erzeugung besonders langer DNA-Polynukleotidsonden angewandt (Abb. C.2).

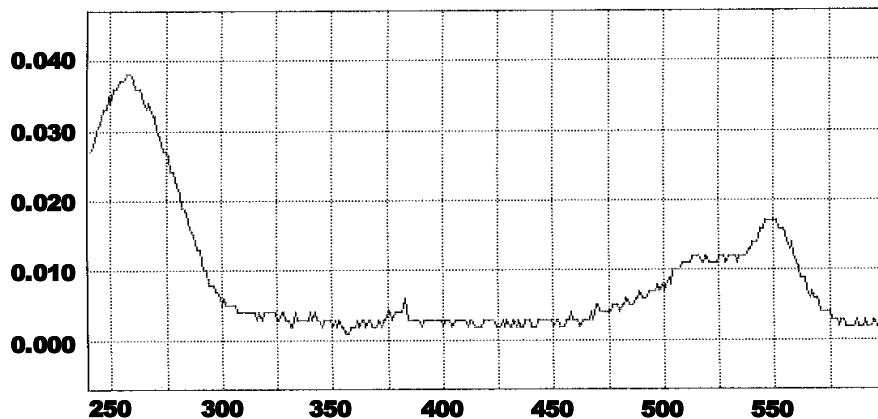


Abbildung C.2: Spektrum einer Cy3-markierten DNA-Polynukleotidsonde (ZD7DI-III; vgl. C.4.1.4). Bei einer Wellenlänge von 550 nm ist das Absorptionsmaximum von Cy3 erkennbar.

1.2 Einsatz von DNA-Polynukleotidsonden in künstlichen Bakterienmischungen

Bei ersten Versuchen zur Spezifität von DNA-Polynukleotidsonden (B.13.4.1) wurden die Arten *Escherichia coli*, *Neisseria canis* und *Acinetobacter calcoaceticus* eingesetzt, deren Differenzierung auch mit gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten Transkriptsonden möglich ist (Stoffels *et al.*, 1999).

Zum Einsatz in Hybridisierungen mit DNA-Polynukleotidsonden kamen Hybridisierungspuffer, die Formamidkonzentrationen von 95% - wie in Hybridisierungen mit Transkriptsonden angewandt (Trebesius *et al.*, 1994) -, 80%, 65%, 50% und 35% enthielten.

Bei Konzentrationen von 65%, 80% und 95% Formamid im Hybridisierungspuffer wurden keine Hybridisierungssignale erhalten. Bei Konzentrationen von 35% und 50% Formamid im Hybridisierungspuffer hingegen waren spezifische Hybridisierungen der jeweiligen Arten mit den entsprechenden Sonden möglich, wenn die Hybridisierung auf einen Inkubationsschritt bei 80°C folgte, in dessen Verlauf die doppelsträngig vorliegenden Sondenmoleküle denaturiert wurden.

Die Hybridisierungssignale waren schwächer als Signale, die in entsprechenden Versuchen mit Transkriptsonden erzielt worden waren. Analog zu Hybridisierungen mit RNA-Polynukleotidsonden war die Fluoreszenz in der Peripherie der Zielzellen wesentlich stärker als im Zellinneren. Im Gegensatz zu Halos mit Transkriptsonden waren Halos mit DNA-Polynukleotidsonden breiter und erschienen körniger.

Insgesamt waren die Signale mit Cy3-markierten DNA-Polynukleotidsonden stärker als solche mit entsprechenden Fluorescein-markierten Sonden. Auch war das Signal-Rausch-Verhältnis bei Cy3-markierten Sonden wesentlich günstiger.

2. Untersuchungen zu gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten DNA-Polynukleotidsonden am Beispiel der Gattung *Acinetobacter*

2.1 Evaluation der Spezifität von gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten DNA-Polynukleotidsonden

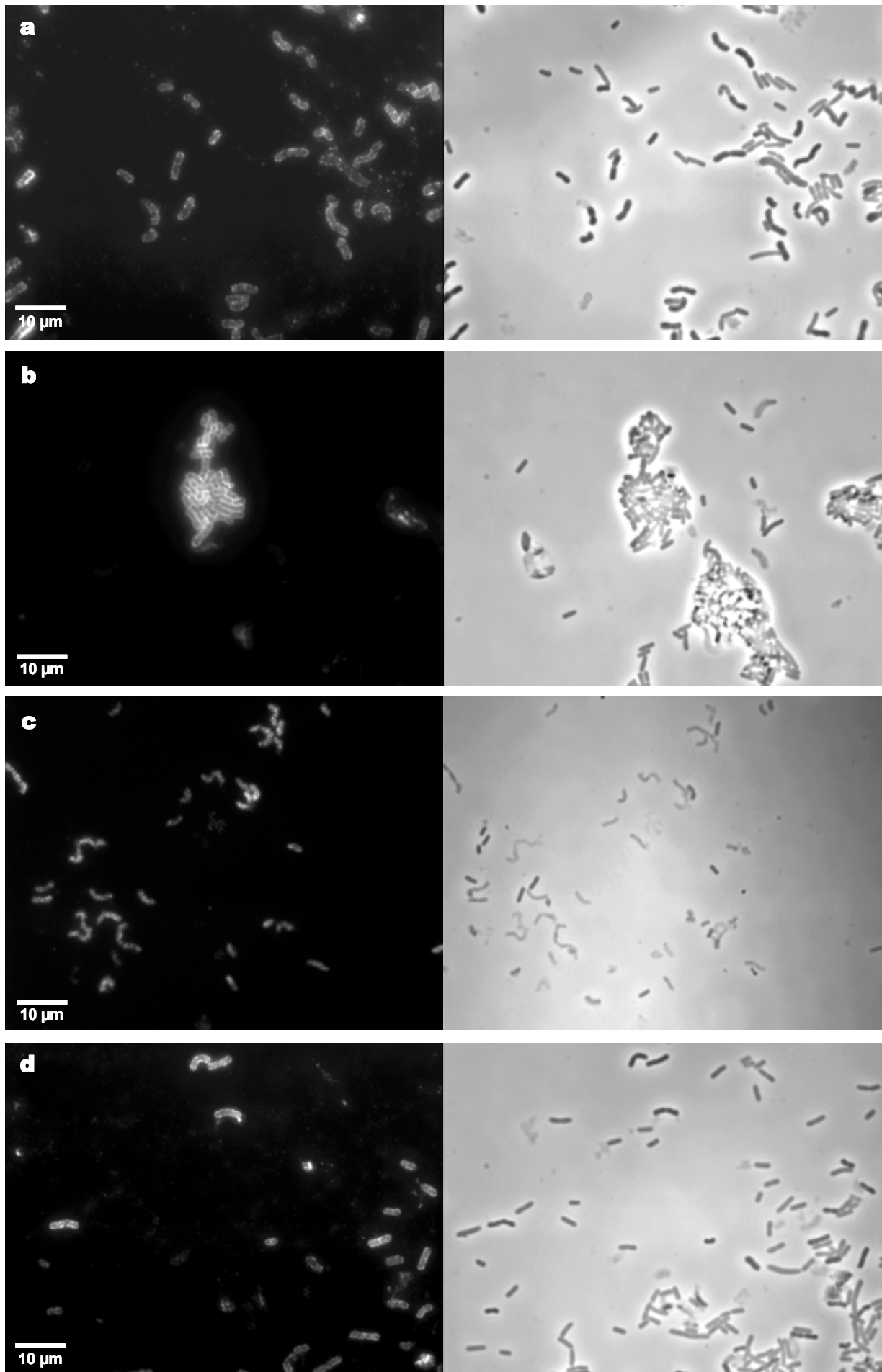
Um die Spezifität von Domäne III-gerichteten Polynukleotidsonden auf intragenerischer Ebene zu untersuchen, wurde ein Satz von DNA-Polynukleotidsonden von Typstämmen aller sieben zum Versuchszeitpunkt beschriebenen Arten der Gattung *Acinetobacter* erzeugt (B.12.2).

Um zu testen, ob und unter welchen Bedingungen die Sonden für artspezifische Hybridisierungen eingesetzt werden können, wurden PFA-fixierte Zellen jedes Typstammes der gültig beschriebenen Arten mit Cy3-markierten DNA-Polynukleotidsonden gegen Teile der Domäne III der 23S-rRNA-Gene der jeweiligen Arten hybridisiert (B.13.4.1). Die Versuche wurden bei einer Konzentration von 55% Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt. Dies entspricht einer effektiven Konzentration von 42% Formamid in der Hybridisierungslösung. Da bei einem Denaturierungsschritt von 30 min immobilisierte Zellen einiger *Acinetobacter*-Arten sich wieder von der Oberfläche des Objektträgers ablösen konnten, wurde in den Versuchsreihen die Denaturierungszeit auf 5 min gesenkt. Auf diese Weise konnte der Verlust immobilisierter Zellen deutlich reduziert werden, ohne daß eine Vorbehandlung der Objektträger mit Gelatine (Amann, 1995) notwendig war.

Bei allen Hybridisierungen wurden PFA-fixierte *E.coli*-Zellen als Negativkontrollen mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle C.1 aufgeführt. Wie in Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden zu erwarten (Trebesius *et al.*, 1994) wiesen die Zielzellen Halos auf. Das Zellinnere hingegen erschien deutlich dunkler (Abb. C.3).

Die Polynukleotidsonde ABADIII, ein aus *A. baumannii*-DNA erzeugtes Cy3-markiertes Amplifikationsprodukt, band ausschließlich an *A. baumannii*-Zellen. Entsprechend hybridisierte die Sonde ACADIII, erzeugt aus *A. calcoaceticus*-DNA, ausschließlich mit Zellen der Art *A. calcoaceticus*.

Die Sonde AHADIII, erzeugt aus *A. haemolyticus*-DNA, hybridisierte außer mit *A. haemolyticus*-Zellen auch mit Zellen der Arten *A. junii* und *A. radioresistens*. Die Sonde AJODIII, erzeugt aus *A. johnsonii*-DNA, hybridisierte außer mit *A. johnsonii*-Zellen auch mit *A. lwoffii*-Zellen. Die Sonde AJUDIII, erzeugt aus *A. junii*-DNA, hybridisierte außer mit *A. junii*-Zellen auch mit Zellen der Arten *A. haemolyticus* und *A. radioresistens*. Die Sonde ALWDIII, erzeugt aus *A. lwoffii*-DNA, hybridisierte außer mit *A. lwoffii*-Zellen auch mit *A. johnsonii*-Zellen.



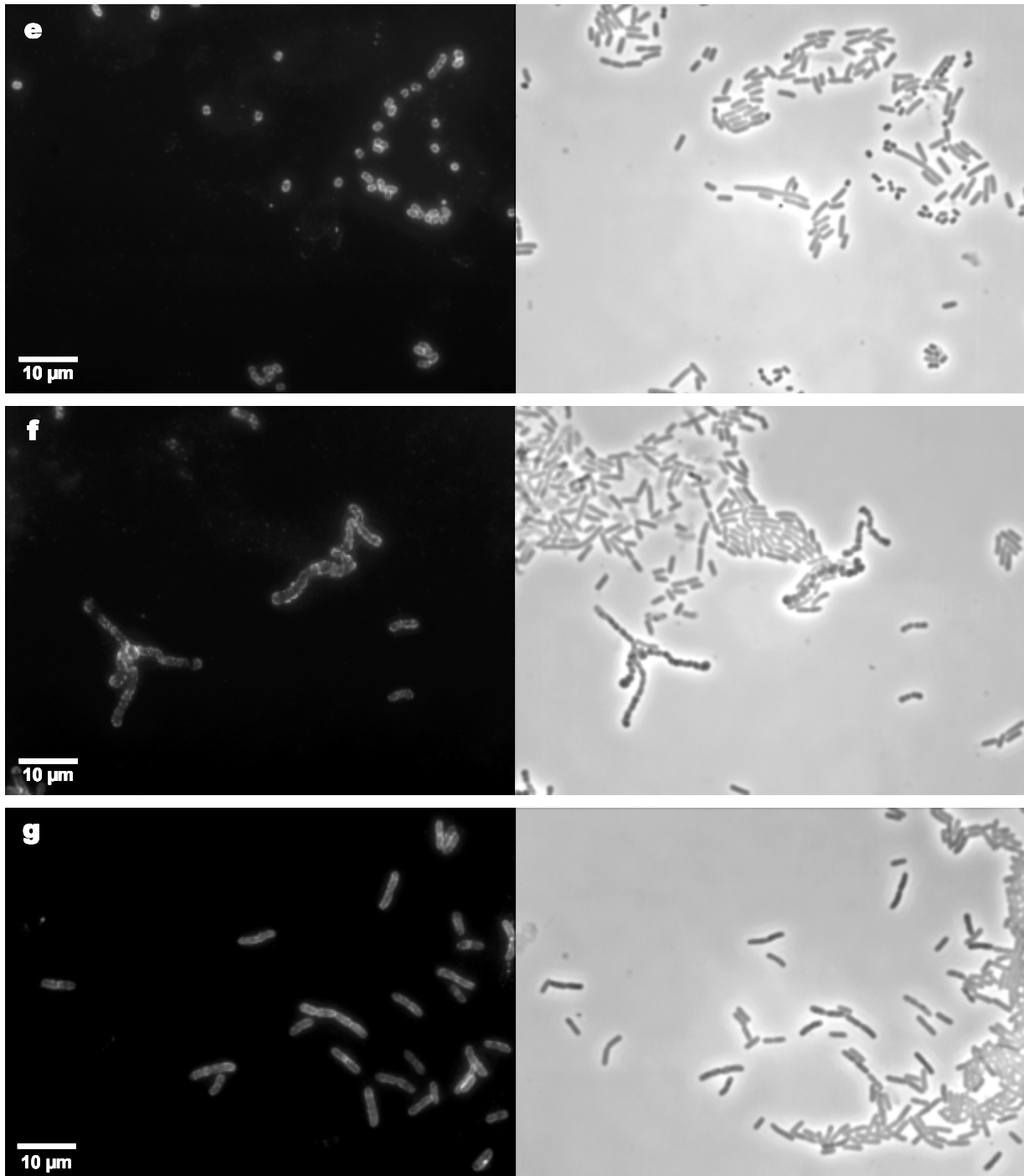


Abbildung C.3: Hybridisierung von in R2A-Medium angezogenen und in der logarithmischen Phase geernteten Typstämmen der Gattung *Acinetobacter* mit entsprechenden Cy3-markierten DNA-Polynukleotidsonden in künstlichen Mischungen mit *E.coli*. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15. Rechts: Phasenkontrast.

a: Hybridisierung von *A. baumannii* mit Sonde ABADIII. **b:** Hybridisierung von *A. calcoaceticus* mit Sonde ACADIII. **c:** Hybridisierung von *A. haemolyticus* mit Sonde AHADIII. **d:** Hybridisierung von *A. johnsonii* mit Sonde AJODIII. **e:** Hybridisierung von *A. junii* mit Sonde AJUDIII. **f:** Hybridisierung von *A. Iwoffii* mit Sonde ALWDIII. **g:** Hybridisierung von *A. radioresistens* mit Sonde ARADIII.

Die Sonde ARADIII, erzeugt aus *A. radioresistens*-DNA, hybridisierte nicht nur mit *A. radioresistens*-Zellen, sondern auch mit Zellen der Arten *A. haemolyticus* und *A. junii*. Somit waren für die Arten *A. baumannii* und *A. calcoaceticus* artspezifische *in situ*-Hybridisierungen mit DNA-Polynukleotidsonden bei einer Stringenz von 42% Formamid im Hybridisierungspuffer möglich. Die fünf verbleibenden Arten hingegen bildeten zwei Gruppen – eine umfaßte die Arten *A. lwoffii* und *A. johnsonii*, die andere die Arten *A. haemolyticus*, *A. junii* und *A. radioresistens* – die von einander gut unterscheidbar waren. Eine Auflösung der Arten innerhalb dieser beiden Gruppen konnte jedoch nicht erreicht werden: Wurde die Stringenz der Hybridisierungen gesteigert, nahm die Signalstärke so stark ab, daß eine Auswertung der Hybridisierungen unmöglich wurde.

Tabelle C.1: Bei *in situ*-Hybridisierungen mit Cy3-markierten DNA-Polynukleotidsonden erhaltene Signale von Arten der Gattung *Acinetobacter* (42% Formamid in der Hybridisierungslösung).

Sonde	ABADIII	ACADIII	AHADIII	AJODIII	AJUDIII	ALWDIII	ARADIII
Organismus							
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. calcoaceticus</i> ATCC 23055 ^T	-	+	-	-	-	-	-
<i>A. haemolyticus</i> ATCC 17906 ^T	-	-	+	-	+	-	+
<i>A. johnsonii</i> ATCC 17909 ^T	-	-	-	+	-	+	-
<i>A. junii</i> ATCC 17908 ^T	-	-	+	-	+	-	+
<i>A. lwoffii</i> ATCC 15309 ^T	-	-	-	+	-	+	-
<i>A. radioresistens</i> ATCC 43998 ^T	-	-	+	-	+	-	+

2.2 Vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA-Gene von Angehörigen der Gattung *Acinetobacter*

Analysiert wurden die vollständigen 23S-rRNA-Sequenzen (*E. coli*-Positionen 1-2904, Brosius *et al.*, 1981) der Typstämme sämtlicher gültig beschriebenen Arten der Gattung *Acinetobacter*. Berücksichtigt wurden dabei auch die September 2001 neu beschriebenen Arten *A. schindleri* LUH 5832^T und *A. ursingii* LUH 3792^T (Nemec *et al.*, 2001).

Die Ähnlichkeitswerte über die gesamte Länge des 23S-rRNA-Gens reichten von 95.6% (*A. baumannii* zu *A. schindleri*) bis 99.1% (*A. haemolyticus* zu *A. junii*, vgl. Tab. C.2).

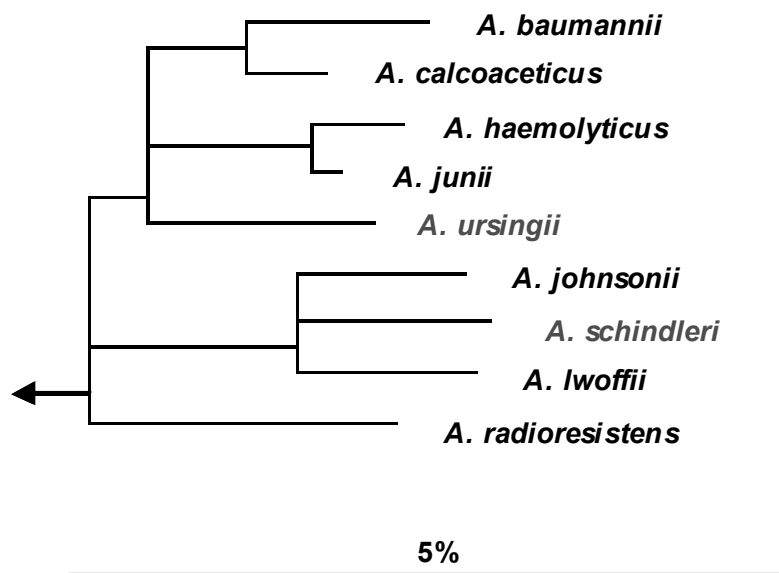


Abbildung C.4: 23S-rRNA-Stammbaum von Typstämmen der Gattung *Acinetobacter*. Bei Mehrfachverzweigungen war eine Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse nicht möglich.

Wurde ein Konsensus-Baum, gemittelt aus Dendrogrammen, die unter Verwendung der Distance Matrix-, Maximum Parsimony- und Maximum Likelihood-Verfahren (Ludwig *et al.*, 1998) erstellt worden waren, zugrundegelegt, zerfiel die Gattung in drei Entwicklungslinien (Abb. C.4):

- Die zwei Paare *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* (Genomospezies 1 und 2 sensu Bouvet und Grimont, 1986) und *A. haemolyticus*-*A. junii* bilden mit *A. ursingii* eine Gruppe.
- Von ihnen deutlich getrennt befindet sich ein Cluster, das aus den drei Arten *A. johnsonii* (Genomospezies 7), *A. lwoffii* (Genomospezies 8) und *A. schindleri* besteht.
- *A. radioresistens* (Genomospezies 12) ist mit keiner der anderen Gruppen assoziiert.

Tabelle C.2: Binäre Ähnlichkeitswerte von 16S- und 23S-rRNA-Gensequenzen von Typstämmen der Gattung *Acinetobacter*.

Organismus	Aba	Aca	Aha	Ajo	Aju	Alw	Ara	Asc	Aur
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T (Aba)	100	96.2	97.1	96.7	98.2	96.2	97.0	96.6	96.4
<i>A. calcoaceticus</i> ATCC 23055 ^T (Aca)	98.4	100	97.4	97.3	96.2	96.0	95.4	97.3	95.2
<i>A. haemolyticus</i> ATCC 17906 ^T (Aha)	97.1	97.6	100	98.7	96.7	97.4	95.9	97.9	96.5
<i>A. johnsonii</i> ATCC 17909 ^T (Ajo)	95.7	96.2	96.0	100	97.5	97.8	96.3	97.9	96.8
<i>A. junii</i> ATCC 17908 ^T (Aju)	97.1	98.0	99.1	96.4	100	96.4	97.1	96.2	96.6
<i>A. lwoffii</i> ATCC 15309 ^T (Alw)	96.3	96.3	95.6	97.8	96.1	100	96.9	96.3	96.0
<i>A. radioresistens</i> ATCC 43998 ^T (Ara)	96.7	96.4	96.3	95.7	96.1	96.1	100	95.8	95.7
<i>A. schindleri</i> NIPH 1034 ^T (Asc)	95.6	96.0	95.8	98.0	96.3	97.4	96.0	100	95.1
<i>A. ursingii</i> NIPH 137 ^T (Aur)	96.9	97.4	97.4	95.7	97.7	95.9	96.6	96.0	100

2.3 *In situ*-Hybridisierung von Umweltproben mit fluoreszenzmarkierten DNA-Polynukleotidsonden

Um die Verwendung von DNA-Polynukleotidsonden in *in situ*-Hybridisierungen komplexen Probenmaterials zu testen, wurden fixierte *A. calcoaceticus*-Zellen PFA-fixiertem Belebtschlamm aus dem Reaktor SBBR1 (Ingolstadt, D) beigemischt. Hybridisierungen mit der DNA-Polynukleotidsonde ACADIII-Cy3 für *A. calcoaceticus* lieferten spezifische Signale, die klar vom Hintergrund differenziert werden konnten. Mit der gegen *A. baumannii* gerichteten DNA-Polynukleotidsonde ABADIII-Cy3 konnten in nativem Probematerial aus dem Belebtschlammbecken 1 (BSB1) der Kläranlage Großlappen (München, D) klare Signale von Einzelzellen erhalten werden. Zum größten Teil lagen die Zielzellen in Ketten von Kokken vor, von denen einige in ihrem Erscheinungsbild dem sog. Eikelboom-Typ 1863 entsprachen (Eikelboom, 1975; Jenkins *et al.*, 1993). Die Morphologien der Zielzellen reichten, mit zunehmender Kettenlänge, von relativ großen Kokken (Durchmesser ungefähr 1 µm; Abb. C.5.a) über kleinere Kokken (Durchmesser ungefähr 0,5 µm) und Kurzstäbchen zu Stäbchen mit einer Länge von ungefähr 1,3 µm, die langgezogene, arabeske Filamente bildeten (Abb. C.5.b). Kokken, Kurzstäbchen und Stäbchen konnten in demselben Filament nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die unterschiedlichen Morphotypen nah verwandt sind und zur selben Art gehören. Um die Hybridisierungsergebnisse mit der Polynukleotidsonde ABADIII zu bestätigen, wurde mit Hilfe des Programmpaketes ARB die Oligonukleotidsonden ABA537-Cy3 sowie ABA1212-Cy3 entwickelt (B.11.3), die gegen die 23S-rRNA von *A. baumannii* gerichtet sind. Sie wurde Cy3-markiert auf die selben Belebtschlammproben wie die DNA-Polynukleotidsonde ABADIII angewendet und detektierten Zielzellen, deren morphologisches Spektrum exakt dem der Sonde ABADIII entsprach. Hybridisierungen mit ABA537 bzw. -1212 wurden bei einer Stringenz von 20 bzw. 40% Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt.

Tabelle C.3: Für *A. baumannii* spezifische Oligonukleotidsonden.

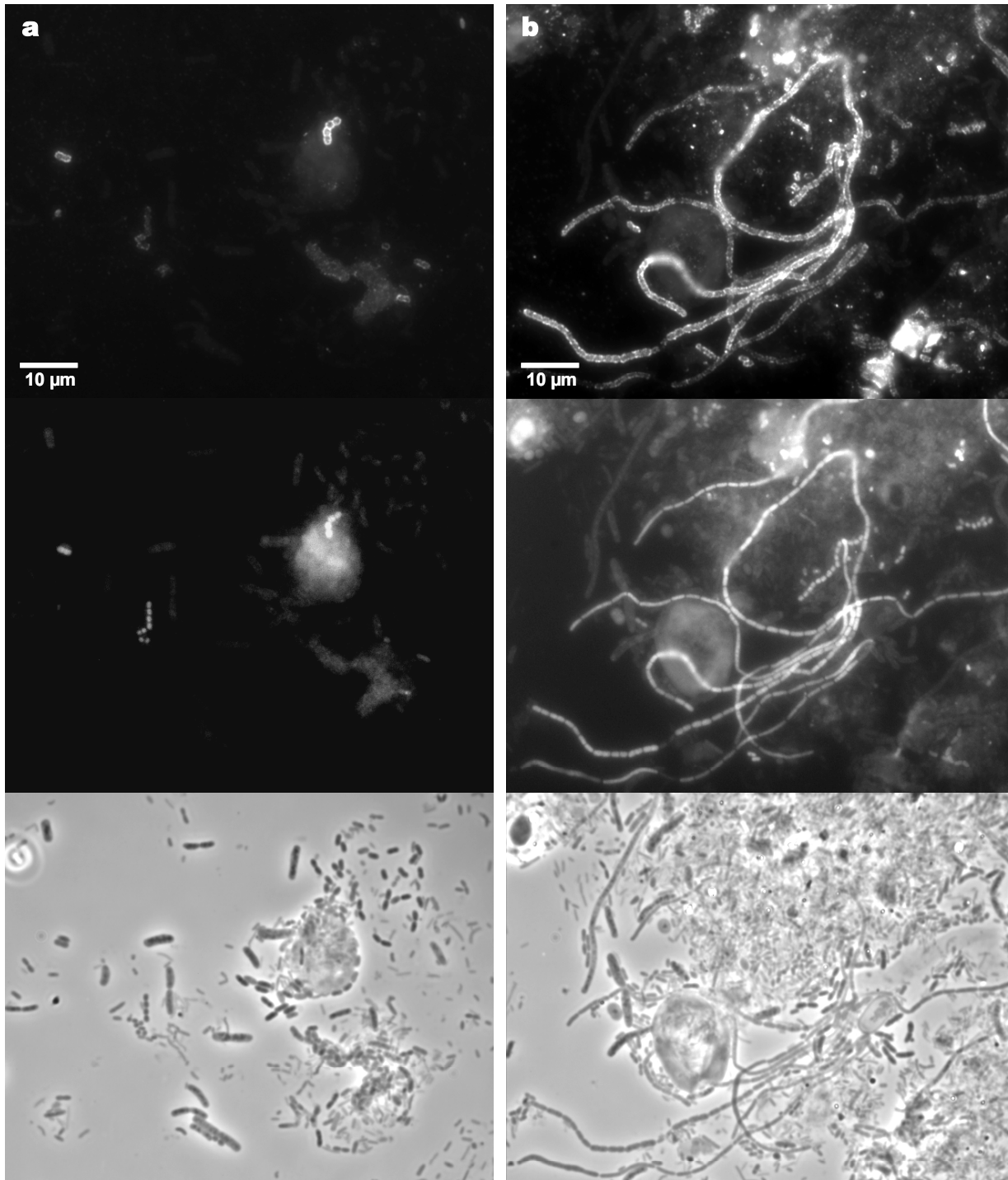
Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos. ¹²	
ABA 537	5' -CAC ACC ACA AAG GTG CTC-3'	56	56	537	23S-rDNA
ABA1212	5' -GCT TCT CAA CAC ACC TTC-3'	54	50	1212	23S-rDNA

Überprüft wurden die Ergebnisse der Poly- und Oligonukleotidsondenhybridisierungen durch die - gegen die Helix 23a der 16S-rRNA von Angehörigen der Gattung *Acinetobacter* gerichtete - Fluorescein-markierte Oligonukleotidsonde ACA23a (vgl. Tab. B.11). Die Hybridisierungen mit dieser

¹² Brosius *et al.*, 1981

Sonde wurden bei 35 bis 40% Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt. Mit der kombinierten Anwendung von gattung- und artspezifischen Sonden wurde ein hierarchischer Ansatz verfolgt.

Wie erwartet, konnten Zielzellen der Sonden ABADIII und ABA1212 auch mit der Sonde ACA23a nachgewiesen werden, wohingegen nur ein Bruchteil der Zellen, mit denen diese Sonde hybridisierte, auch Signale mit ABADIII und ABA1212 gaben.



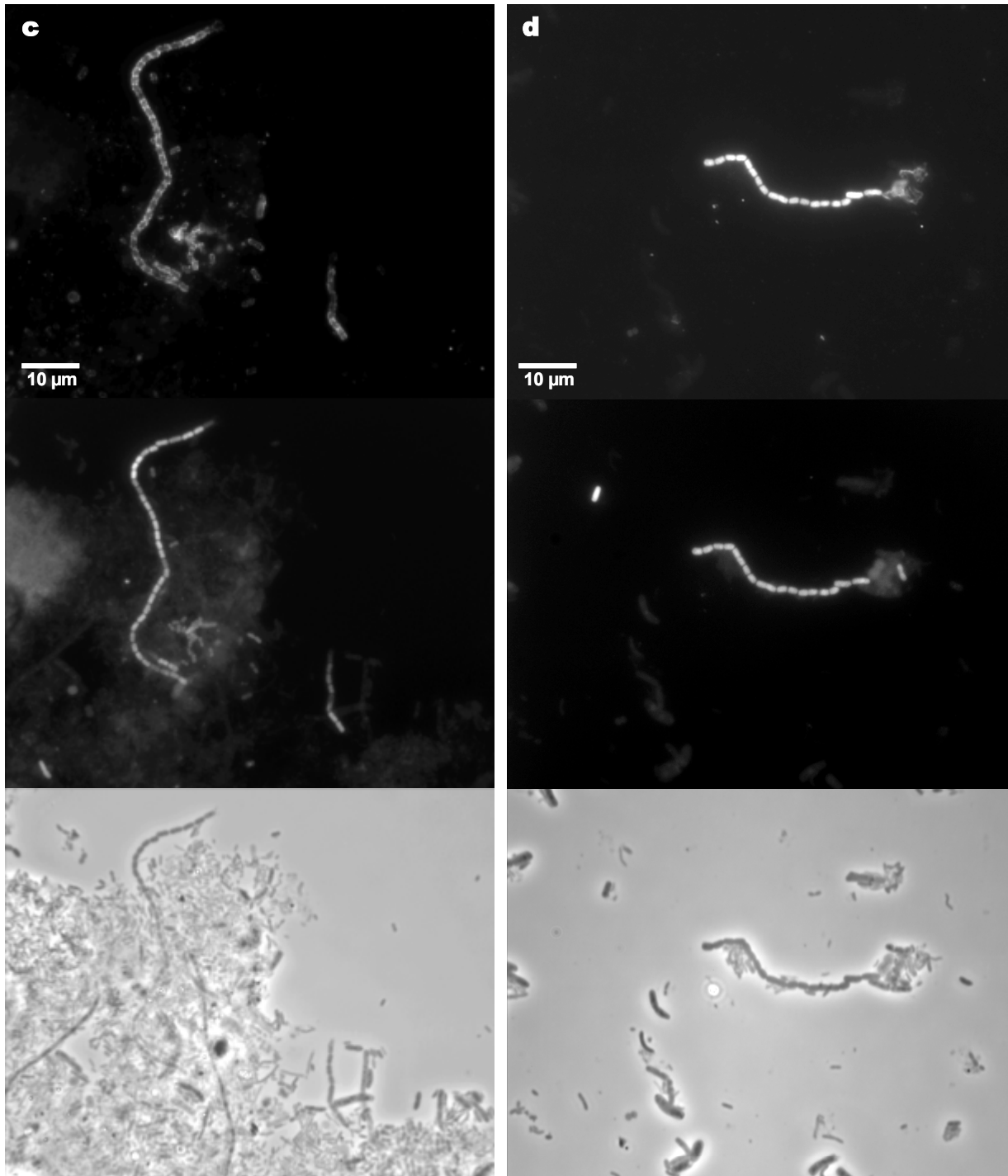


Abbildung C.5: Doppelhybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm aus BSB1 der Kläranlage Großlappen, München, mit gegen *A. baumannii* gerichteten Sonden ABADIII-Cy3 (a-c) bzw. ABA1212-Cy3 (d) und der für die Gattung *Acinetobacter* spezifischen Sonde ACA23a-Fluos. Oben: Epifluoreszenz, Filtersatz 15. Mitte: Epifluoreszenz, Filtersatz 9. Unten: Phasenkontrast.

2.4 Rückhaltung von Zielzellen durch DNA-Polynukleotidsonden-Hybridisierung in Mikrotiterplatten

Mikrotiterstreifen der Typen NucleoLink und TopYield (Nalge Nunc International, Roskilde, DK) wurde hinsichtlich ihrer Eignung für sondengestütztes Zellfischen getestet. Pro Kavität wurde je 1 µg der unmarkierten DNA-Polynukleotidsonde ABADIII, erzeugt durch Amplifikation von *Acinetobacter baumannii*-DNA unter Verwendung der Primer 1900FN und 317RT3 (vgl. C.1.1), immobilisiert (B.14.1). PFA-fixierte *Acinetobacter baumannii*-Zellen wurden abzentrifugiert, in einer Hybridisierungslösung mit einer effektiven Formamidkonzentration von 37,5%, die 2 µg der unmarkierten DNA-Polynukleotidsonde ABADIII enthielt, aufgenommen und nach einem Denaturierungsschritt hybridisiert (B.14.2). Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend mit MTP-Hybridisierungspuffer (20% Formamid) versetzt und in die jeweils ersten vier Kavitäten von mit der Sonde ABADIII beschichteten NucleoLink- bzw. TopYield-Strips überführt (B.14.3). Damit wurde sowohl für die Untersuchung der NucleoLink- als auch der TopYield-Streifen ein Vierfachansatz verfolgt. Die erste Hybridisierung ermöglicht eine Bindung überschüssiger Sondenmoleküle. Eine nachgeschaltete Hybridisierung wurde in den jeweils zweiten vier Kavitäten jedes Streifens durchgeführt (B.14.4). So ist sichergestellt, daß, sollte eine Sättigung der Kavität mit ungebundenen Sonden in der ersten Hybridisierung auftreten, die Bindung zellgebundener Sonden stattfinden kann (Zwirgmaier, persönl. Mitteilung). Die Detektion in den Streifen rückgehaltener Zielzellen erfolgte durch PCR mit dem für *A. baumannii* spezifischen Primer ABA1212F in Verbindung mit dem universalen *Bacteria*-Primer 1037R detektiert. Im NucleoLink-Streifen wurden Amplifikationsprodukte in der erwarteten Länge in den Kavitäten A bis H erhalten, im TopYield-Streifen in den Kavitäten A bis D (Abb. C.6).

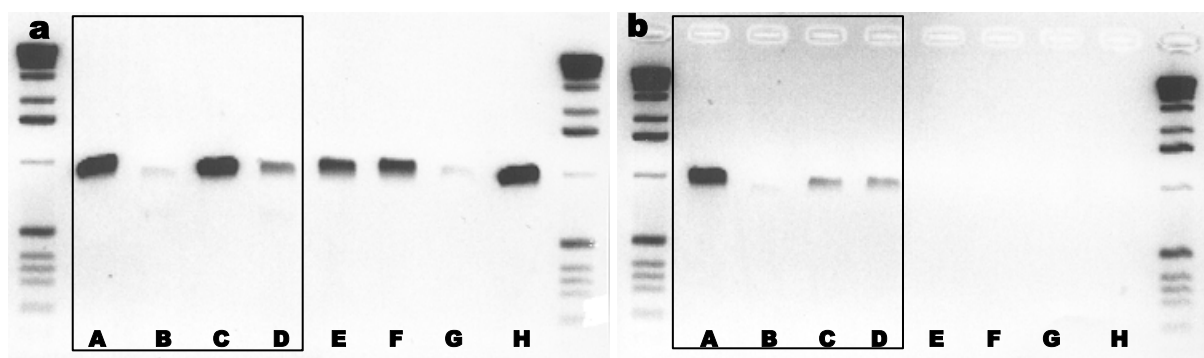


Abbildung C.6: Vergleich der Rückhaltung von *A. baumannii*-Zellen in Mikrotiterplatten vom Typ NucleoLink (a) und Top Yield (b). Detektion durch Amplifikation mit Primern ABA1212F und 1037R (B.7). Standard 1kb, Färbung mit SYBRgreen im Auftragspuffer.

Die Rückhaltung erfolgte also in NucleoLink-Strips im Verlauf beider Hybridisierungen in der Mikrotiterplatte, in TopYield-Strips hingegen lediglich während der ersten Hybridisierung in der Mikrotiterplatte.

Wurden PFA-fixierte Bodenproben einer Weihenstephaner Wiese mit fixierten *A. baumannii*-Zellen versetzt (*spiking*) und in NucleoLink-Strips hybridisiert, konnte in einem von vier Parallelansätzen eine Amplifikation erzielt werden. Die Anreicherung erfolgte in der zweiten Hybridisierung in der Mikrotiterplatte.

3. Untersuchungen zu bislang unkultivierten Acidobacteria durch vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA

3.1 Erstellung von Genbanken

Um Sequenzen ribosomaler RNA-Gene – insbesondere des 23S-rRNA-Gens – bislang unkultivierbarer Organismen aus Umweltproben (B.1) zu vereinzeln, wurden DNA-Extraktionen unter Verwendung taxonspezifischer Primer amplifiziert und die Produkte kloniert (B.9).

Für die Amplifikation von rRNA-Gen-Fragmenten von Angehörigen des gesamten Phylums Acidobacteria wurde der Primer HOL189F auf der Basis der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden 23S-rRNA-Sequenzen von Klonen des Phylums aus Boden- und Seesedimentproben (Zimmermann, 1999) sowie der Art *Holophaga foetida* (Zimmermann, 1999) mit Hilfe des Softwarepaketes ARB konstruiert und evaluiert (B.11.3).

Um Umweltproben auf das Vorhandensein von Organismen aus Candidate Divisions zu untersuchen, wurden 11 gegen die 16S-rRNA gerichtete PCR-Primer (Tab. C.4a; b), spezifisch für Repräsentanten der Linien OP5, 8, 9 und 11 (Hugenholtz *et al.*, 1998a; b), TM7 (Hugenholtz *et al.*, 2001) und WS6 (Dojka *et al.*, 2000), konstruiert. Die bei höchstmöglicher Annealingtemperatur mit diesen Primern in Kombination mit dem *Eubacteria*-Universalprimer 1037R (Tab. B.5) erhaltenen Amplifikate aus Umweltproben wurden kloniert. Anstelle von Sequenzen, die durch vergleichende Sequenzanalyse den Candidate Divisions zugeordnet werden konnten, wurden neben zahlreichen Sequenzen aus anderen bakteriellen Taxa neun Sequenzen von Acidobacteria erhalten, die neben ungefähr 2000 5'-terminalen Nukleotiden der 23S-rRNA auch mehrere hundert Nukleotide der 16S-rRNA enthielten und damit die Korrelation von 16- und 23S-Sequenzdaten ermöglichten.

Tabelle C.4a: Taxonspezifische Amplifikationsprimer.

Primer	Spezifität	<i>E. coli</i> -Pos. ¹³	
		189	23S-rDNA
HOL189F	Phylum Acidobacteria	189	23S-rDNA
WS6-569F	Candidate division WS6	569	16S-rDNA
OP5-626F	Candidate division OP5	626	16S-rDNA
OP11-1095F	Candidate division OP11	1095	16S-rDNA

¹³ Brosius *et al.*, 1981

Tabelle C.4b: Sequenzen der taxonspezifischen Amplifikationsprimer.

Primer	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]
HOL189F	5' -GGA AGT GAA CCA TCT CAG-3'	54	50
WS6-569F	5' -GTA AAG AGA TGC GTA GGC-3'	54	50
OP5-626F	5' -GAG CTT GCA TCC AAG ACT-3'	54	50
OP11-1095F	5' -GGG GAA ACG AGC GTA ACC-3'	58	61

Den taxonspezifischen Amplifikationen für die Genbanken M, N, Z, ZB sowie ZC (Tab. C.5) gingen Amplifikationen unter Verwendung der *Eubacteria*-Universalprimer 616F und 985R (M, N, ZF, ZG) bzw. 1037R (Z, ZB, ZC, ZE) voraus.

Tabelle C.5: Übersicht über Klone aus dem Phylum Acidobacteria, die für Stammbaumberechnung und Sondenkonstruktion herangezogen wurden (vgl. Abb. B.1, 2).

Klon	Habitat	Primer	
H14	Abgeerntetes Feld, Weihenstephan	OP11-1095F	1037R
H20	Abgeerntetes Feld, Weihenstephan	OP11-1095F	1037R
M4	Abgeerntetes Feld, Weihenstephan	OP5-626F	1037R
N1	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
N2	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
N3	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
N5	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
N7	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
N8	Roggenfeld, Weihenstephan	WS6-569F	1037R
Z1	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z2	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z3	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z4	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z5	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z6	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
Z8	Alpspitze, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB1	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB2	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB3	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB4	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB5	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB6	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZB8	Oberes Reintal, Wetterstein	HOL189F	1037R
ZC1	Shintoshrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZC2	Shintoshrein, Nara, JP	HOL189F	1037R

ZC3	Shintoschrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZC4	Shintoschrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZC5	Shintoschrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZC6	Shintoschrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZC8	Shintoschrein, Nara, JP	HOL189F	1037R
ZD1	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD2	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD3	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD4	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD5	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD7	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD8	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD9	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD11	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD13	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD14	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD15	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD17	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD18	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD19	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD20	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZD21	Belebtschlamm, Kraftisried	HOL189F	1037R
ZE1	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE2	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE3	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE4	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE5	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE6	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE7	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE8	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE9	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE10	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE11	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZE12	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZEY1	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY2	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY3	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY4	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R

ZEY5	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY6	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY8	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY9	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY11	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZEY13	Sampling Site 21, Lower Kane Cave, WY, USA	616F	ALP544R
ZF3	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZF6	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZG3	Sampling Site 29, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZG5	Sampling Site 29, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZG6	Sampling Site 29, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZH4	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZH6	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZH8	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZH10	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R
ZH11	Sampling Site 11, Lower Kane Cave, WY, USA	HOL189F	1037R

3.2 Analyse von 23S-rRNA-Sequenzdaten

Für die vergleichende Analyse von Acidobacteria-Sequenzen wurden die 79 im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Teilsequenzen, die Sequenzen der drei gültig beschriebenen Arten *Holophaga foetida*, *Acidobacterium capsulatum* und *Geothrix fermentans* sowie 19 Sequenzen aus der Untergruppe a des Phylums (Zimmermann, 1999) berücksichtigt.

Für Organismen, die in den Genbanken H, M, und N repräsentiert sind, liegen neben den 23S- auch die entsprechenden 16S-rRNA-Sequenzen als Referenz vor. Für die bis auf ZE3 identischen in Genbank ZE repräsentierten Organismen wurden 16S-rRNA-Referenzsequenzen durch PCR mit dem für diese Gruppe spezifischen Rückwärtsprimer ALP544R sowie dem universalen *Bacteria*-Vorwärtsprimer 616F und anschließende Klonierung erzeugt (Genbank ZEY).

Tabelle C.6: Für Organismen der ZE9-Gruppe spezifischer Amplifikationsprimer.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos. ¹⁴	
ALP544R	5' -CCA CCG GAT TGC TCC ATG-3'	58	61	544	23S-rDNA

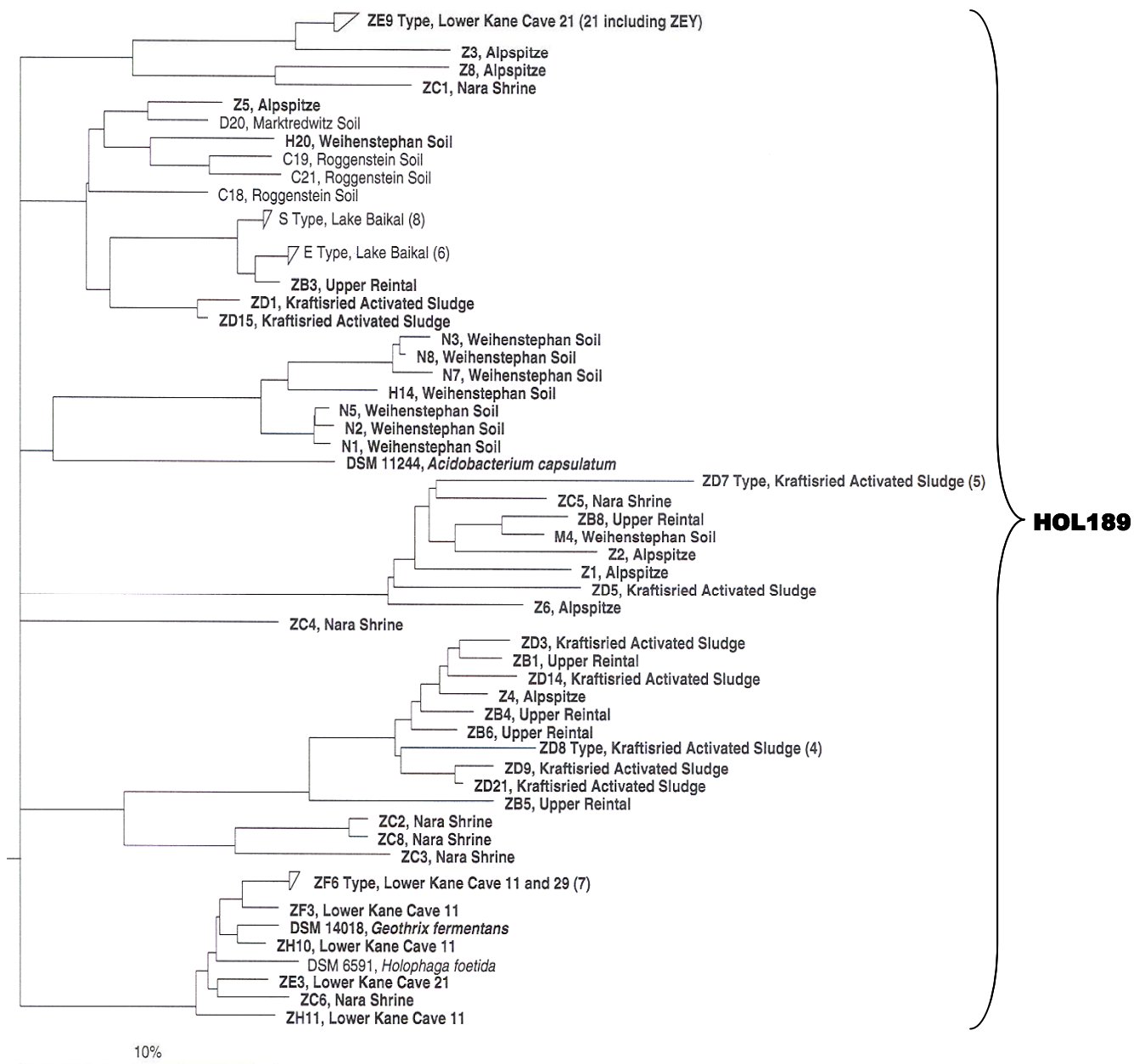
Da außer für die Art *Holophaga foetida* keine vollständigen 23S-rRNA-Sequenzdaten von Acidobacteria vorlagen, war die Sequenzierung der 23S-rRNA-Gene von

¹⁴ Brosius *et al.*, 1981

Acidobacterium capsulatum DSM 11244^T und *Geothrix fermentans* DSM 14018^T erforderlich. Dafür wurden Teile des rRNA-Operons unter Verwendung der Primer 616F und 985R amplifiziert und unter Verwendung der Standard-Sequenzierprimer (vgl. Tab. B.8) sequenziert.

Für die Amplifikation der 3'-terminalen Abschnitte jenseits *E.coli*-Pos. 2669 der beiden Organismen wurde eine RL-PCR (B.7.3) durchgeführt. Dabei wurden Fragmente, die jeweils einer diskreten Bande mit einer Länge von ungefähr 600 (*A. capsulatum*) bzw. 700 Nukleotiden (*G. fermentans*) entsprechen, erhalten und zur Sequenzierung eingesetzt.

A



B

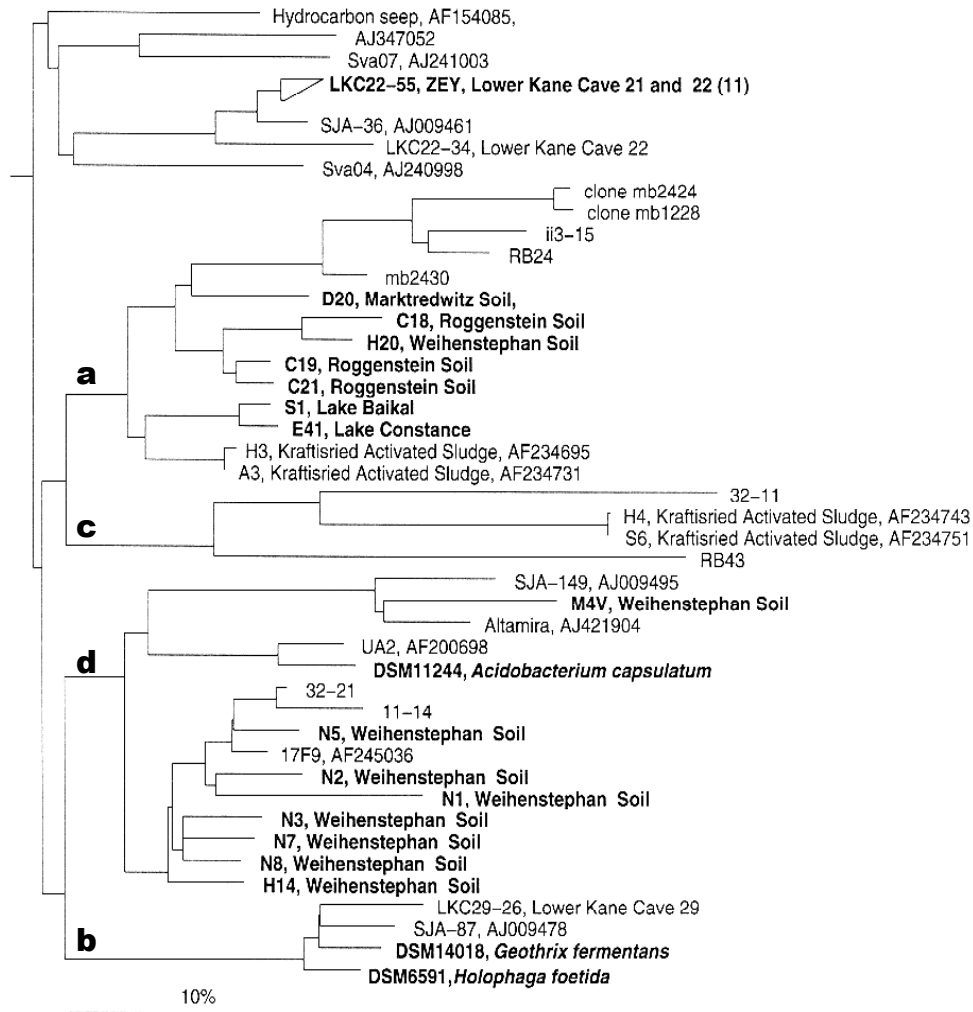


Abbildung C.7: Stammbaum auf der Grundlage von 23S-rRNA- (A) und 16S-rRNA-Sequenzen (B) von Organismen aus dem Phylum Acidobacteria. Bei Mehrfachverzweigungen war eine Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse nicht möglich. 23S-rRNA-Sequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

4 Untersuchungen zu bislang unkultivierten Acidobacteria durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Um Angehörige des Phylums Acidobacteria *in situ* zu detektieren, wurden die Oligonukleotide HOL1400 (Zimmermann, 1999) und HOL189 (vgl. Tab. C.3a; b) revers-komplementär als fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs sonden eingesetzt. Die Zielsequenz von HOL1400 am 3'-Terminus der 16S-rRNA überschneidet sich mit der des Oligonukleotids S^{*}-HoAc-1402-a-A-18 (Juretschko *et al.*, 2002).

Tabelle C.7: Für Acidobacteria spezifische Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos. ¹⁵	
HOL1400	5'-TTC GTG ATG TGA CGG GC-3'	54	59	1400	16S-rDNA
HOL189	5'-CTG AGA TGG TTC ACT TCC-3'	54	50	188	23S-rDNA

Für eine weitere phylogenetische Eingrenzung der Zielorganismen wurde auf Grundlage der Sequenzdaten aus den entsprechenden Genbanken Oligonukleotidsonden mit Zielsequenzen höherer Variabilität konstruiert.

Sowohl in fixierten Belebtschlammproben aus der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried als auch in Proben aus weißen mikrobiellen Matten der Lower Kane Cave, Wyoming, USA, konnten bei einer Konzentration von 20% Formamid im Hybridisierungspuffer mit den Cy3-markierten Sonden HOL189 und HOL1400 Signale von Zielzellen erhalten werden. Untersucht wurden auch PFA-fixierte Umweltproben von Habitaten, aus denen die Genbanken H, M, N, Z, ZB und ZC (Tab. C.5) erstellt worden waren. Ein hoher Anteil kristalliner Partikel, die starke Autofluoreszenz aufwiesen, störte allerdings in der Epifluoreszenzmikroskopie so stark, daß eine Detektion von Zielzellen nicht mehr möglich war (vgl. auch Hahn und Zeyer, 1994).

¹⁵ Brosius *et al.*, 1981

4.1 Untersuchung von Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried

4.1.1 *In situ*-Hybridisierung mit für das Phylum Acidobacteria spezifischen Oligonukleotidsonden

Mit HOL189-Cy3 und HOL1400-Cy3 Signal gebende Zellen lagen fast ausschließlich in sphärischen Kolonien von einigen hundert bis vielen tausend Einzelzellen vor. Der Koloniedurchmesser reichte von ungefähr 15 bis 50 μm . Die Kolonien schienen häufig an der Peripherie oder an exponierten Ausbuchtungen größerer Belebtschlammteilchen aufzutreten.

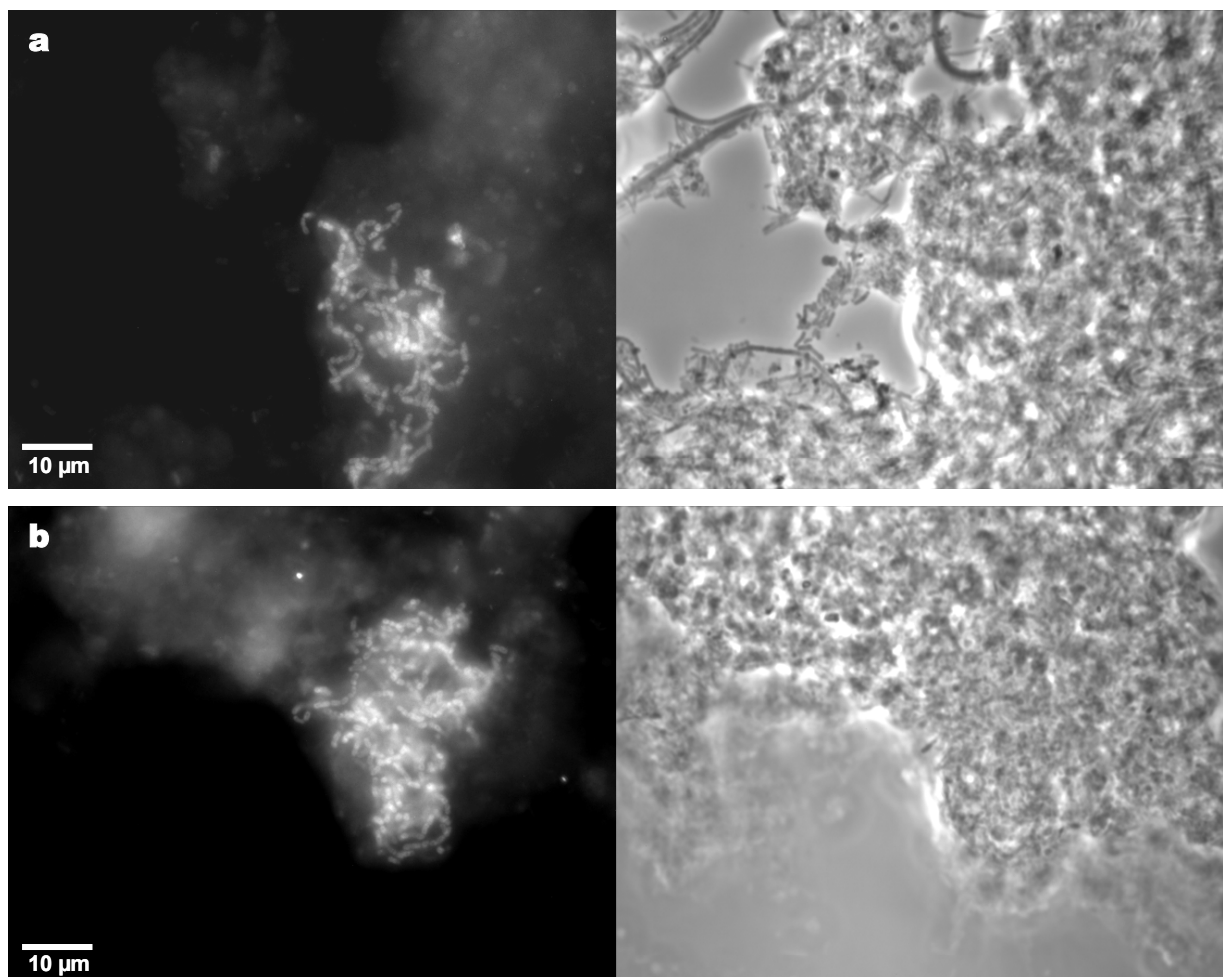


Abbildung C.8: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried mit Cy3-markierten Oligonukleotidsonden HOL189 (a) und HOL1400 (b). Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

Die Einzelzellen bildeten oft arabeske Ketten mit einer Länge von Dutzenden bis Hunderten von Zellen, die teilweise weit aus den Partikeln herausragen konnten, aber mit den in die Flocken integrierten Kolonien verbunden. Kokken und gedrungene Stäbchen konnten in derselben Kette auftreten; ihre Länge betrug ca. 1-1,8 μm . Die Morphologien der Zielzellen von HOL189 und HOL 1400 stimmten exakt überein.

Charakteristisch für die erfaßten Zellen war, daß die Fluoreszenz der Oligonukleotidsonden an der Peripherie und den Polen der Zielzellen deutlich stärker war als im Zentrum der Zellen, was ein Hinweis auf die Einlagerung von Speicherstoffen sein könnte.

Wurden die Oligonukleotide HOL189 und HOL1400, die mit Cy3-Farbstoff markiert gut detektierbare Signale erzeugten, mit Fluorescein markiert eingesetzt, waren die Signale auch bei hoher Menge an eingesetzten Sonden (400 ng) nur schwer auszumachen. Eine Dokumentation mittels einer Princeton Instruments-CCD-Kamera war nicht mehr möglich.

4.1.2 *In situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden engerer Spezifität

Um eine Zuordnung der mit HOL189 und HOL1400 detektierten Zielzellen auf phylogenetisch untergeordneter Ebene zu erreichen, wurden auf Grundlage von Sequenzdaten der durch ZD-Klone repräsentierten Organismen (Tab. C.5) Sätze von Cy3-markierten Oligonukleotidsonden gegen die Klone ZD7 und ZD8 als Vertreter der beiden häufigsten Organismengruppen in dieser Genbank erstellt.

Tabelle C.8: Für ZD7- und ZD8-Cluster spezifische Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	E. coli-Pos. ¹⁶	
ZD7-362	5' -GTA CTC AGG AAC CAC TTG-3'	54	50	362	23S-rDNA
ZD7-589	5' -CCT CGC CAC TGA GAC AAA-3'	56	56	589	23S-rDNA
ZD7-1286	5' -TTT CGG CGC GCA AGG TTC-3'	58	61	1286	23S-rDNA
ZD7-1417	5' -TCT GCG TCC CCG CAT CGG-3'	62	72	1417	23S-rDNA
ZD8-398	5' -TGG TCC CGG CAA ATT CAT-3'	54	50	398	23S-rDNA
ZD8-756	5' -AGG CAC AGG TCA TCC AAA-3'	54	50	756	23S-rDNA
ZD8-844	5' -ACC ACC ACA ATG ATA AAT-3'	48	33	844	23S-rDNA
ZD8-932	5' -GTC TGA CTC CTG CAC AGT-3'	56	56	932	23S-rDNA
ZD8-1032	5' -GTC AGT GCT TCC CCA CTT-3'	56	57	1032	23S-rDNA

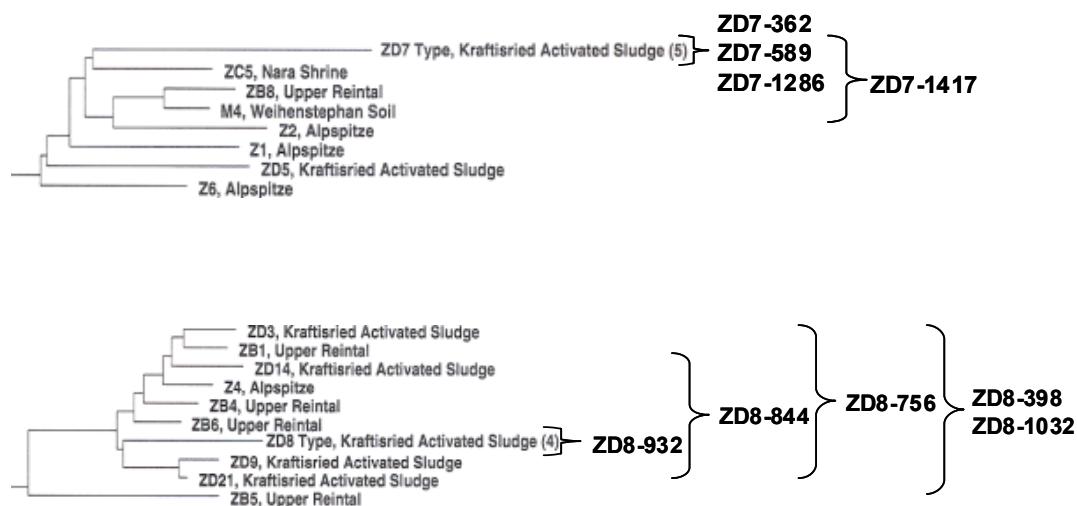


Abbildung C.9: Zielorganismen von ZD7- und ZD8-Sonden (vgl. Abb. C.7).

¹⁶ Brosius *et al.*, 1981

Die Sonden wurden bei Konzentrationen von 0, 10, 20, 30 und 40% Formamid im Hybridisierungspuffer getestet. Mit den Sonden ZD7-589, -1286 und -1417 wurden bei Formamidkonzentrationen von 30 und 40% Zellen detektiert, die in Größe, Morphologie und Koloniecharakteristika exakt den Zielzellen der phylumspezifischen Sonden HOL1400 und HOL189 entsprachen.

Die Signalintensität nahm von ZD7-589 über ZD7-1286 zu ZD7-1417 hin zu, was sich mit den Helligkeitsklassen der jeweiligen Zielsequenzen (Fuchs *et al.*, 2001) deckte (ZD7-589: Brightness class V/IV; ZD7-1286: III/II; ZD7-1417: II).

Mit den für das ZD8-Cluster spezifischen Sonden wurden keine verlässlichen Signale erzielt, was darauf hindeutet, daß es sich bei den im Kraftisried-Belebtschlamm dominanten Acidobacteria um Angehörige des ZD7-Clusters handelt.

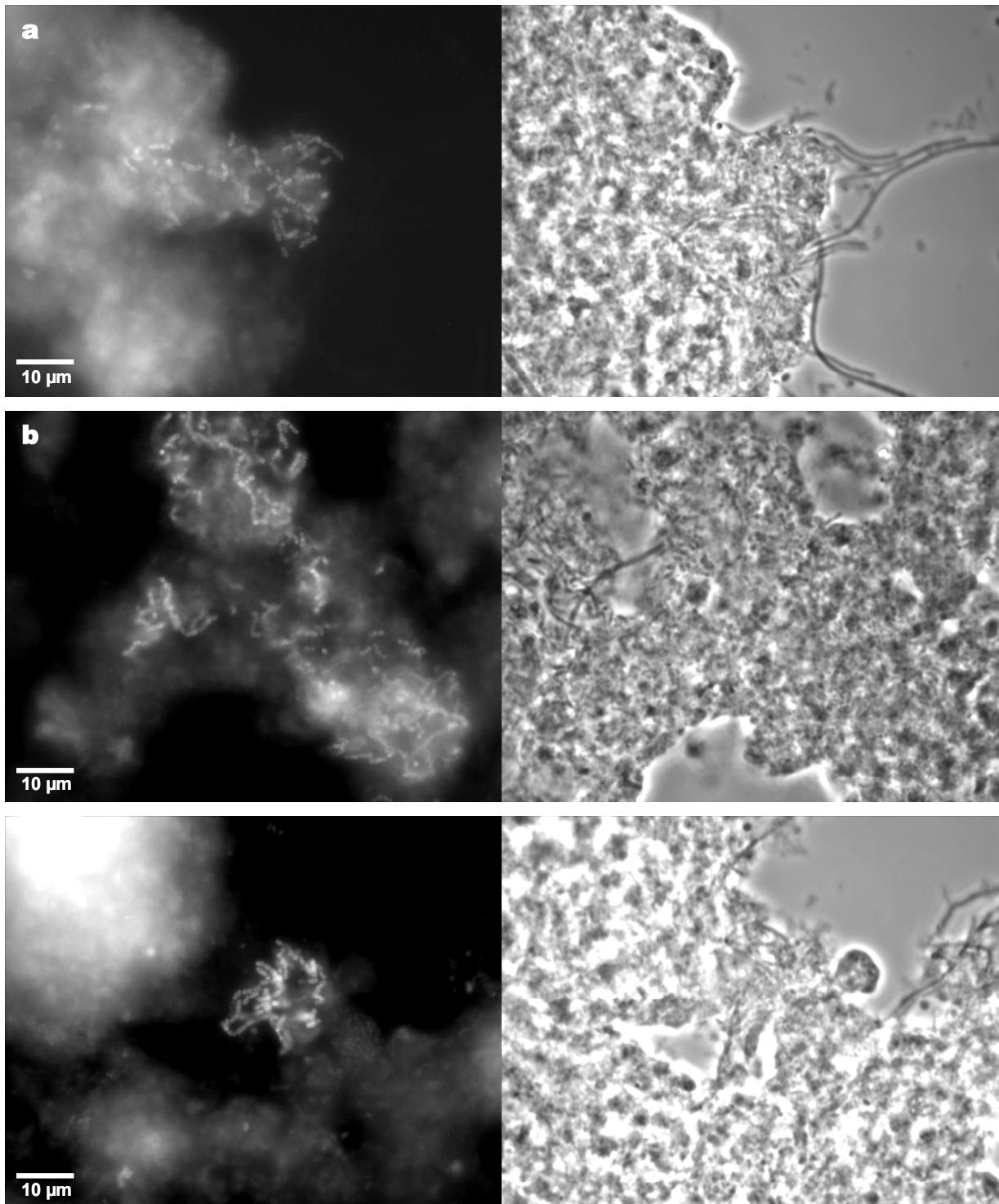


Abbildung C.10: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftsried mit Cy3-markierten Oligonukleotidsonden ZD7-589 (a), ZD7-1286 (b) und ZD7-1417. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

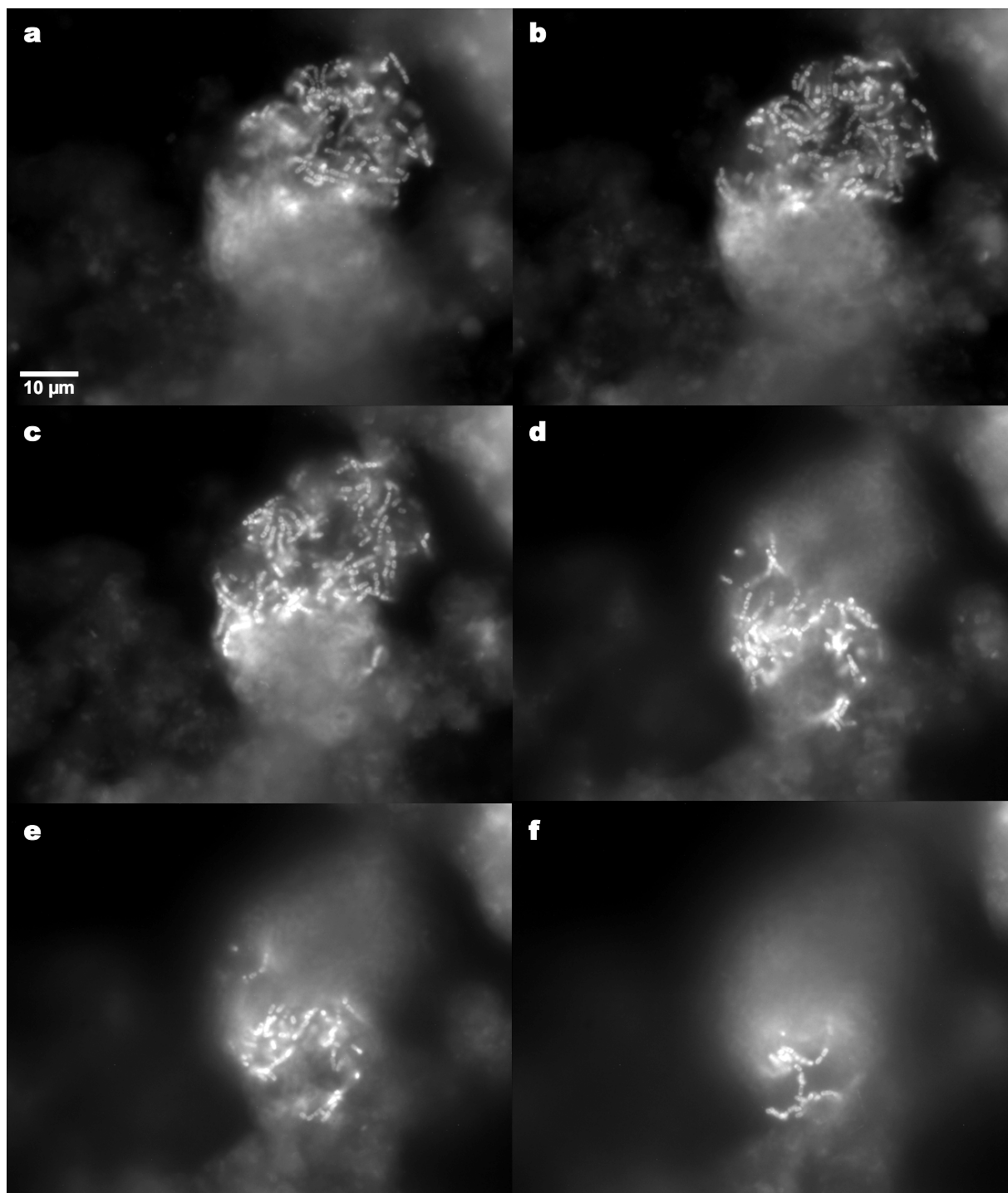


Abbildung C.11: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried mit Cy3-markierter Oligonukleotidsonde ZD7-1286. **a-f:** Schnitte durch eine Kolonie von Zielzellen. Schnittdicke ca. 10 µm.

4.1.3 *In situ*-Hybridisierung mit gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden

Cy3-markierte DNA-Polynukleotidsonden

Um zu prüfen, ob die Detektion von Organismen aus dem ZD7-Cluster auch mit Polynukleotidsonden möglich ist, wurde durch Amplifikation von ZD7-Inserts enthaltenden Plasmiden unter Inkorporation fluoreszenzmarkierter Desoxyribonukleotide die DNA-Polynukleotidsonde ZD7-DIII erzeugt (vgl. B.11.2). Durch eine Formamidreihe von 50 bis 70% FA im Hybridisierungspuffer, die einer effektiven FA-Konzentration von 38 bis 53% in der Hybridisierungslösung entspricht, konnte eine optimale effektive FA-Konzentration von 46% in der Hybridisierungslösung (60% FA im Hybridisierungspuffer) für Hybridisierungen unter den „klassischen“, für Oligonukleotide optimierten, Bedingungen ermittelt werden (B.12.4.2). Diese Variante der Polynukleotidhybridisierung bewährte sich nicht zuletzt durch den nachgeschalteten Waschschrift besser als die ursprüngliche Technik (B.12.4.1), mit der noch die Evaluierung der SONDENSPEZIFITÄT auf intragenerischem Niveau durchgeführt worden war (C.2.1), und führte zu einer Reduzierung störender Farbstoffpartikel und deutlicheren Signalen.

Die mit ZD7DIII-Cy3 erfaßten Zielzellen entsprachen in Größe, Morphologie, Kolonieforn und den Charakteristika ihrer Fluoreszenz exakt denen der hierarchisch übergeordneten Oligonukleotidsonden ZD7-1286 und HOL189 bzw. HOL1400, d.h., sie zeigten keine höhere Fluoreszenzintensität an der Zellperipherie und damit keine Halos (Abb. C.12.a, b).

Zwar wiesen Teile des Zellinneren fast keine Fluoreszenz auf, doch war dieses Verhalten auch in Hybridisierungen mit Oligonukleotidsonden festzustellen (C.4.1.1), kann damit auf die Einlagerung von Speicherstoffen zurückgeführt werden und ist kein Anzeichen für eine Halobildung. Auch war der Zellumfang in Fluoreszenzbild und Durchlicht identisch (Abb. C.12.b, c).

Auf Durchlichtaufnahmen mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop erschienen die Zellen im Phasenkontrast sehr schwach lichtbrechend, was im Sinne einer ungewöhnlich hohen Durchlässigkeit der Zellhülle auf ein Eindringen der Polynukleotidsonde auf ihrer ganzen Länge in die Zelle hindeuten könnte.

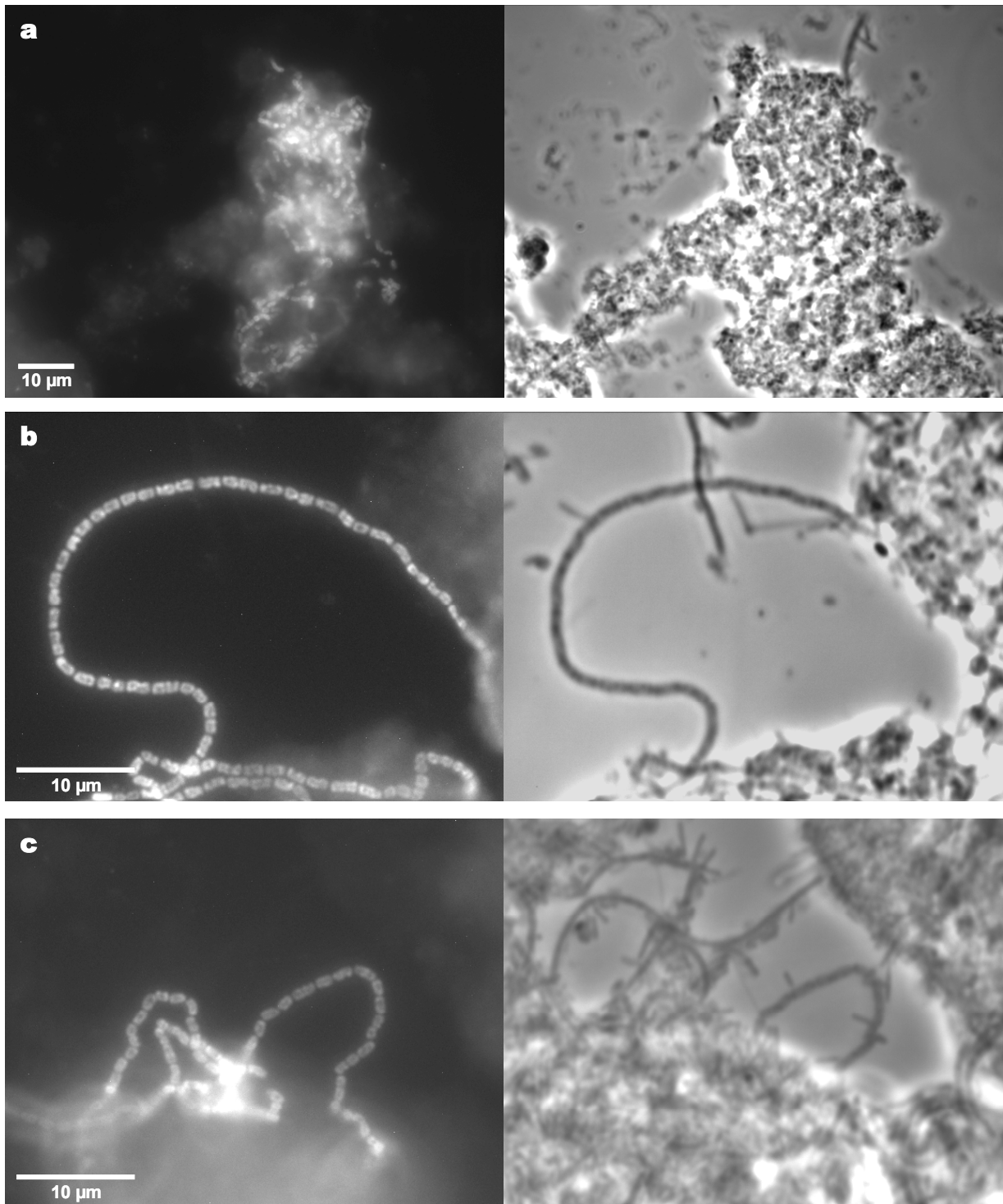


Abbildung C.12: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried mit Cy3-markierter Polynukleotidsonde ZD7DIII (**a, b**). Zum Vergleich: Hybridisierung mit Oligonukleotidsonde ZD7-1286 (**c**). Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

Um zu testen, ob dieses Phänomen auch bei *A. capsulatum*, dem neben den beiden in jüngster Zeit isolierten australischen Stämmen (Janssen *et al.*, 2002) einzigen kultivierten Vertreter aus der Untergruppe d des Phylums, auftritt, wurden

vakuumgetrocknete Zellen des Typstammes *A. capsulatum* DSM 11244^T PFA-fixiert und mit der DNA-Polynukleotidsonde ACAPDIII-Cy3, die durch Amplifikation unter Verwendung der Primer 1900FN und 317RT3 und markierter Desoxyribonukleotide hergestellt worden war, hybridisiert. Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen denen in Hybridisierungen mit der Sonde ZD7DIII-Cy3. Im Gegensatz zu den Organismen aus dem ZD7-Cluster entwickelten die im Phasenkontrast unauffälligen *A. capsulatum*-Zellen ausgeprägte Halos, die in ihrem „mürben“ Erscheinungsbild und ihrer Dicke die Charakteristika typischer DNA-Polynukleotidsonden-Halos aufwiesen (C.2.1). Die Spezifität der Hybridisierung wurde durch das Mitführen fixierter *E.coli*-Zellen als Negativkontrolle, die keine Signale gaben, überprüft.

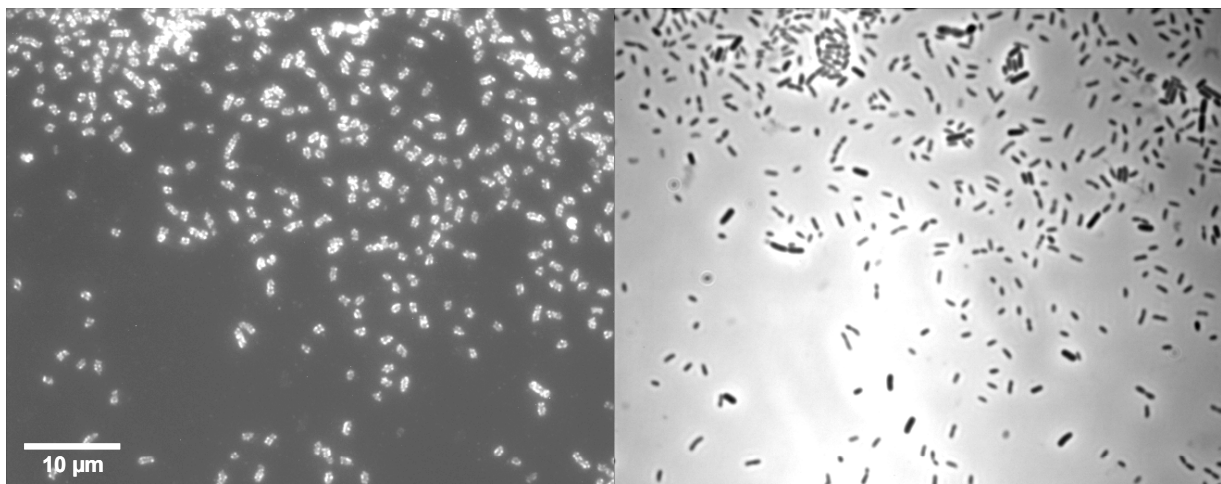


Abbildung C.13: Hybridisierung einer künstlichen Mischung von *A. capsulatum* und *E.coli* mit Cy3-markierter DNA-Polynukleotidsonde ACAPDIII Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

Um zu testen, ob unter Umständen die Beschaffenheit oder eine unzulängliche Fixierung des Probenmaterials die Entstehung von Halos behindert, wurden fixierte *A. capsulatum* DSM 11244^T-Zellen dem untersuchten Kraftisried-Belebtschlamm beigemischt (*spiking*). Die künstliche Mischung wurde mit ACAPDIII-Cy3 hybridisiert; die resultierenden Signale, breite Halos, waren sehr intensiv und ausschließlich auf die beigemischten *A. capsulatum*-Zellen beschränkt.

Um auch Populationen nativer Organismen zu testen, wurde Kraftisried-Belebtschlamm unter denselben Bedingungen wie in anderen DNA-Polynukleotidhybridisierungen mit der DNA-Polynukleotidsonde AEVDIII-Cy3, erzeugt aus *Azoarcus evansii* DSM 6898^T-Zellen, hybridisiert. Auch Zielzellen dieser Sonde entwickelten deutliche Halosignale und konnten, obwohl lediglich wenige einzelne Zellen der mikroskopierten Probe vorlagen, problemlos detektiert werden.

Fluoresceinmarkierte DNA-Polynukleotidsonden

Um Doppelhybridisierungen von Oligo- und DNA-Polynukleotidsonden durchführen zu können, wurde die Sonde ZD7DIII durch Inkorporation von Fluorescein-12-dUTP markiert (B.11.2) und wie die entsprechenden Cy3-markierten Polynukleotidsonden unter modifizierten Oligonukleotidbedingungen (B.12.4.2) eingesetzt. Die Intensität der resultierenden Signale war niedrig, aber geringfügig höher als die von fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden (C.4.1.1) im selben Probenmaterial. Die Zielzellen der Polynukleotidsonde ZD7DIII-Fluos gaben in der Doppelhybridisierung intensive Signale mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde ZD7-1286. Damit konnte die Identität der Zellen bestätigt werden.

Fluoresceinmarkierte RNA-Polynukleotidsonden

Wurden ZD7-gerichtete fluoresceinmarkierte Transkriptsonden bei der extrem niedrigen Stringenz von 35% FA im Hybridisierungspuffer zusammen mit der Oligonukleotidsonde ZD7-1417-Cy3 eingesetzt, konnten starke Oligo- und schwache Transkriptsondensignale erhalten werden, die sich deckten, wobei auch mit den RNA-Polynukleotiden kein Haloeffekt erzielt werden konnte. Wie immer in Transkriptsondenhybridisierungen in komplexem Probenmaterial war eine Bindung der Transkripte nicht nur an die Zielzellen, sondern unspezifisch an eine Vielzahl anderer Zellen, Partikel, Filamente und Scheiden im Belebtschlamm festzustellen (vgl. C.1). Bessere Hybridisierungsergebnisse mit Transkriptsonden - allerdings immer noch kein Haloeffekt - wurden erzielt, wenn die Transkriptsonden unter Oligonukleotidbedingungen (vgl. B.12.2) eingesetzt wurden und der für Oligonukleotidhybridisierungen übliche Waschschrift bei 48°C folgte. Bei einer Konzentration von 70% FA im Hybridisierungspuffer und einer Hybridisierungstemperatur von 46°C war der Anteil unspezifischer Hybridisierungssignale geringer und konnte durch eine Steigerung der Stringenz auf 80% FA und 53°C weiter gesenkt, jedoch nicht eliminiert werden.

4.1.4 *In situ*-Hybridisierung mit gegen den 5'-terminalen Teil der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden

Um zu testen, ob lediglich die Länge der Domäne III-gerichteten Polynukleotidsonden für ein Herausstehen aus den Zellen nicht ausreichte, wurde die DNA-Polynukleotidsonde ZD7DI-III-Cy3 hergestellt, die sich über Teile der Domäne I, die gesamte Domäne II und fast die gesamte Domäne III der 23S-rRNA erstreckt und damit einen großen Teil der 5'-terminalen Hälfte des Moleküls abdeckt. Erzeugt wurde die Sonde durch Amplifikation mit dem Primerpaar HOL189R/317RT3 über einen Abschnitt, der von *E.coli*-Pos. 189 bis 1620 (Brosius *et al.*, 1981) reicht

und damit, den T3-Promotor des Rückwärtsprimers inbegriffen, über 1400 Nukleotide umfasst. Erstaunlicherweise beeinträchtigten die konservierten Regionen, die in der Sondensequenz enthalten waren, die Spezifität der Hybridisierungen, die bei einer effektiven FA-Konzentration von 46% in der Hybridisierungslösung unter Oligonukleotidbedingungen durchgeführt wurden, nicht: Die Qualität der Hybridisierung entsprach der von Hybridisierungen mit der „konventionellen“ Domäne III-gerichteten Sonde ZD7DIII-Cy3, Zielzellen konnten mühelos im Zentrum auch sehr kompakter Belebtschlammflocken identifiziert werden (Abb. C.14). Halos waren jedoch auch mit dieser Sonde nicht zu erzeugen.

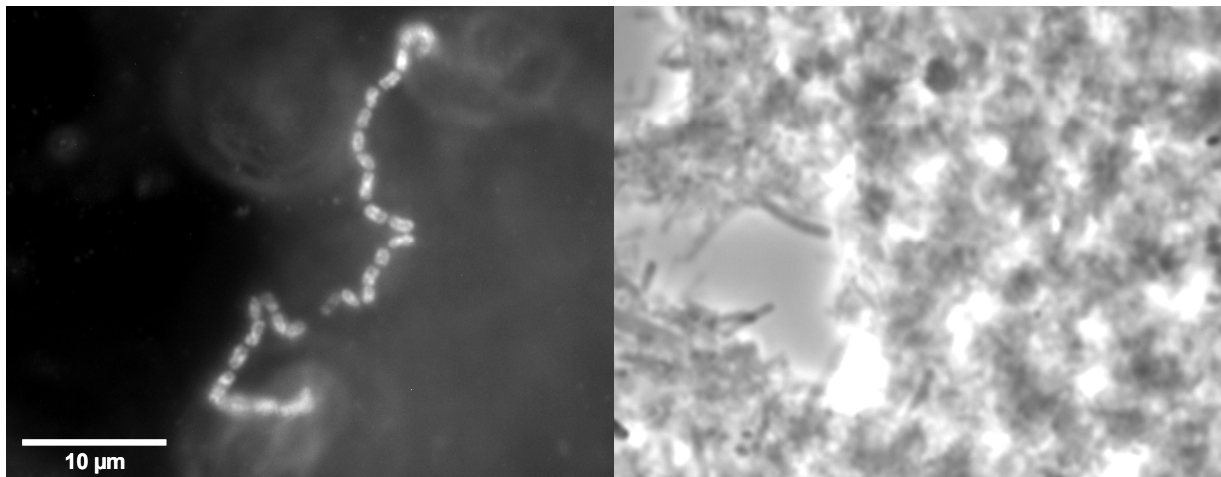


Abbildung C.14: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried mit Cy3-markierter Polynukleotidsonde ZD7DI-III. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

4.1.5 *In situ*-Hybridisierung mit Oligo-Oligonukleotidsonden

5mere von „klassischen“, 18 bp langen Oligonukleotidsonden stellen mit einer Länge von 90 bp kurze DNA-Polynukleotidsonden dar. Die Entstehung eines Halo-Netzwerkes bei Einsatz in Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen scheint damit theoretisch möglich.

Wurden die 5-mere - abgeleitet von den in Tab. C.7 und C.8 aufgeführten Sonden - (HOL189)₅-Cy3, (ZD7-589)₅-Cy3, (ZD7-1286)₅-Cy3 sowie (ZD7-1417)₅-Cy3 unter den für die entsprechenden Monomere optimierten Bedingungen (C.4.1.2) angewendet, fand in keinem Fall eine Halobildung statt. Die Signalintensität war darüber hinaus im Vergleich zum Monomer entweder reduziert [(HOL189)₅-Cy3] bzw. stark reduziert [(ZD7-588)₅-Cy3] oder es konnten keine [(ZD7-1286)₅-Cy3] bzw. keine verlässlichen Signale [(ZD7-1417)₅-Cy3] erhalten werden.

Ähnliche Versuche mit Cy3-markierten Oligo-Oligonukleotidsonden gegen *Acinetobacter* sp. führten zwar ebenfalls nicht zur Bildung von Halos, resultierten aber andererseits nicht in einer niedrigeren Signalintensität.

4.1.6 Sondengestützte Isolierung von Zielzellen des ZD7-Clusters mittels Durchflußcytometrie

Um Organismen aus dem ZD7-Cluster, die in Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden keine Halos bildeten, aus umgebendem Probenmaterial isolieren zu können, wurden fixierte Belebtschlammproben in Lösung mit der für das ZD7-Cluster spezifischen Sonde ZD7-1285-Cy3 hybridisiert (B.12.2). Im Verlauf der Hybridisierung in Lösung konnte durch die zahlreichen Zentrifugationsschritte (6 mehr als bei einer Hybridisierung auf dem Objektträger) eine deutliche Disintegration der Koloniebinnenstrukturen erzielt werden. Die Kolonien selber blieben zwar zusammen, die Ketten von Zielzellen wurden hingegen weitgehend aufgelöst, was für die Isolierung wünschenswert war.

Der hybridisierte Ansatz wurde erst 1 min im Wasserbad ultraschallbehandelt, dann durch einen Cellulosenitratfilter mit 3 µm Porenweite filtriert und anschließend mittels eines Cytomation MoFlo Durchflußcytometers einer Sortierung unterworfen. Signalgebende Zielzellen wurden in einem Dotplot-Diagramm, in dem die sondenvermittelte Fluoreszenz gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen war, als zu erfassende Fraktion definiert und ein sog. *sorting gate* eingegrenzt (Abb. C.15).

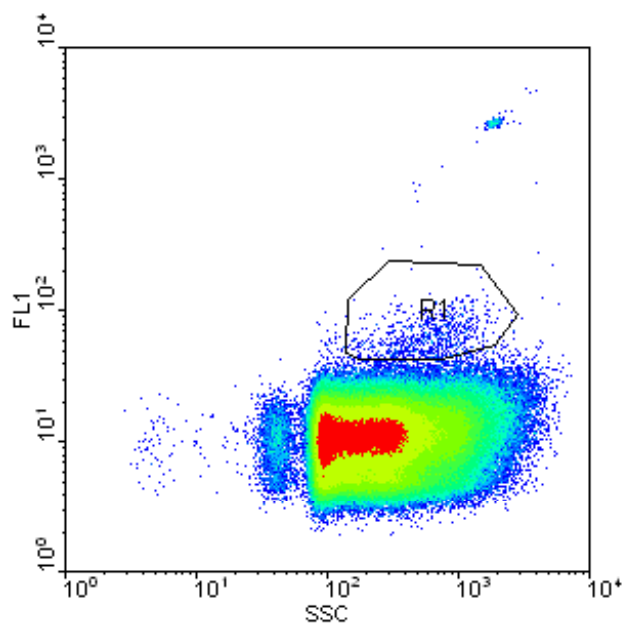


Abbildung C.15: Dotplot-Diagramm von Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried. Ordinate: Vorwärtsstreulicht, Abszisse: Sondenvermittelte Fluoreszenz. P1: Sorting gate für Zielzellen von Sonde ZD7-1285-Cy3.

Zellen, die den festgelegten Kriterien entsprachen, wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß separiert. Je Reaktionsgefäß wurden $1,1 \cdot 10^4$ bis $1,4 \cdot 10^4$ Zellen bei einer Sortierungsrate von ca. 20 s^{-1} aus insgesamt ungefähr $1 \cdot 10^7$ Zählereignissen erfasst.

Um angereicherte Zellen als Angehörige des ZD7-Clusters zu identifizieren, wurde nach vorgeschalteter Amplifikation mit der Primerkombination HOL189F/985R eine Nested PCR mit der Primerkombination 313F/1037R durchgeführt; anschließend wurden die Amplifikate direkt ohne Klonierung mit den Primern 1025Fy00 und 1019Ry97, die Sequenzbereiche von hoher Variabilität und damit hoher Aussagekraft abdecken, ansequenziert. Die Analyse der Sequenzen zeigte, daß es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Organismen des ZD7-Clusters handelte. Um den Grad der Anreicherung zu prüfen, wurden die isolierten Zellen auf einen Polycarbonatfilter übertragen und mit SYBRgreen gegengefärbt. Mit SYBRGreen fluoreszierende Zellen gaben auch Signale mit der Sonde ZD7-1285-Cy3. Die Zielzellen lagen fast ausschließlich paarweise vor.

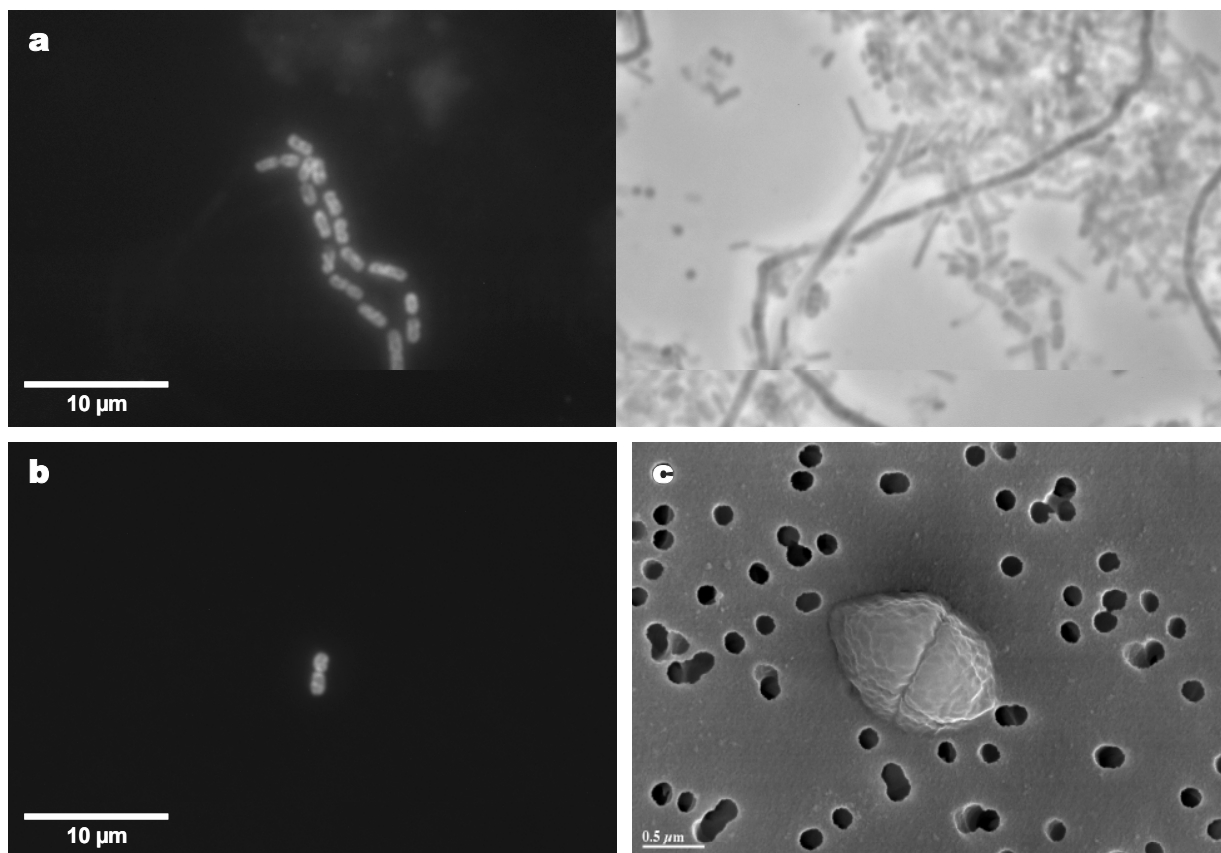


Abbildung C.16: Durchflußcytometrische Isolierung von ZD7-1285-Zielzellen aus Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried. **a:** In Lösung hybridisierte ZD7-1285-Zielzellen vor Sonifikation, Filtration und Cell Sorting. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast. **b:** Cy3-Signale von ZD7-1285-Zielzellen nach Cell Sorting auf Polycarbonatfilter. **c:** REM-Aufnahme von ZD7-1285-Zielzellen nach Cell Sorting auf Polycarbonatfilter.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Filter zeigten, daß die Doppelzellen von offensichtlich dehydratisierbaren Hüllen umgeben waren, die in verschiedenen Zuständen der Austrocknung vorgefunden werden konnten (Abb. C.17b-h). Der Durchmesser der kokkoiden, im Elektronenmikroskop zitronenförmigen

Einzelzellen lag bei ungefähr 1 μm , im Fluoreszenzbild war ein Zelldurchmesser von ungefähr 1,3 μm festzustellen.

Lediglich eine Kette von vier Zellen konnte beobachtet werden, die nach Vorbehandlung durch Sonifikation und Filtration nicht disintegriert worden war (Abb. C.17a).

Die Häufigkeit von Doppelkokken auf dem Filter stimmte in Rasterelektronen- und Epifluoreszenzmikroskopie überein. Außer den beschriebenen Doppelkokken waren elektronenmikroskopisch auf den Filtern gelegentlich Debris und längliche, spindelförmige Gebilde mit wechselnder Länge und Durchmesser feststellbar, jedoch keine eindeutig als Mikroorganismen zu identifizierenden Strukturen. Unklar war, ob es sich bei den spindelartigen Formen um Zellen handelte, die unspezifisch erfasst worden waren, oder lediglich um denaturierte Proteine oder andere nichtzelluläre Gebilde.

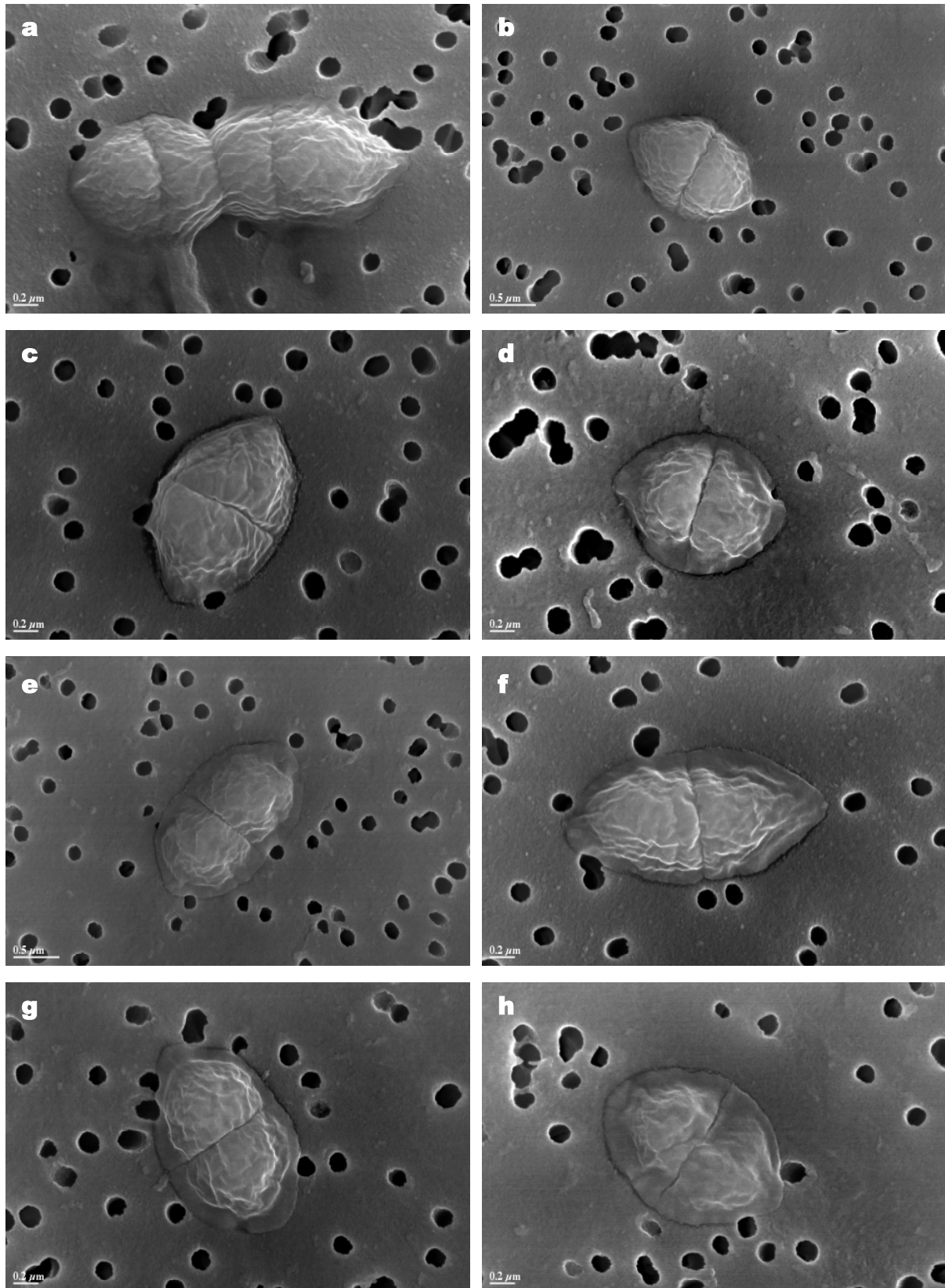


Abbildung C.17: REM-Aufnahmen durchflußcytometrisch angereicherter ZD1285-Zielzellen aus Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried auf Polycarbonatfiltern. **a:** Viererkette. **b-h:** Verschiedene Stadien der Austrocknung einer offensichtlich dehydratisierbaren Hülle um die Zielzellen.

4.2 Untersuchung von filamentösen Matten der Lower Kane Cave, WY

4.2.1 *In situ*-Hybridisierung für das Phylum Acidobacteria spezifischen Oligonukleotidsonden

Probematerial aus weißen filamentösen Matten fünf verschiedener Entnahmestellen der Lower Kane Cave wurde untersucht (C.3.2.6; vgl. Tab. D.11). Wurden Proben aus dem Höhlensystem mit den universalen Acidobacteria-Sonden HOL1400-Cy3 und HOL189-Cy3 hybridisiert, konnten ausschließlich schlanke, gestreckte, zuweilen leicht gekrümmte Stäbchen detektiert. Generell waren zwei Größenklassen unterscheidbar (Abb.C.18), im folgenden als Typ A und Typ B bezeichnet.

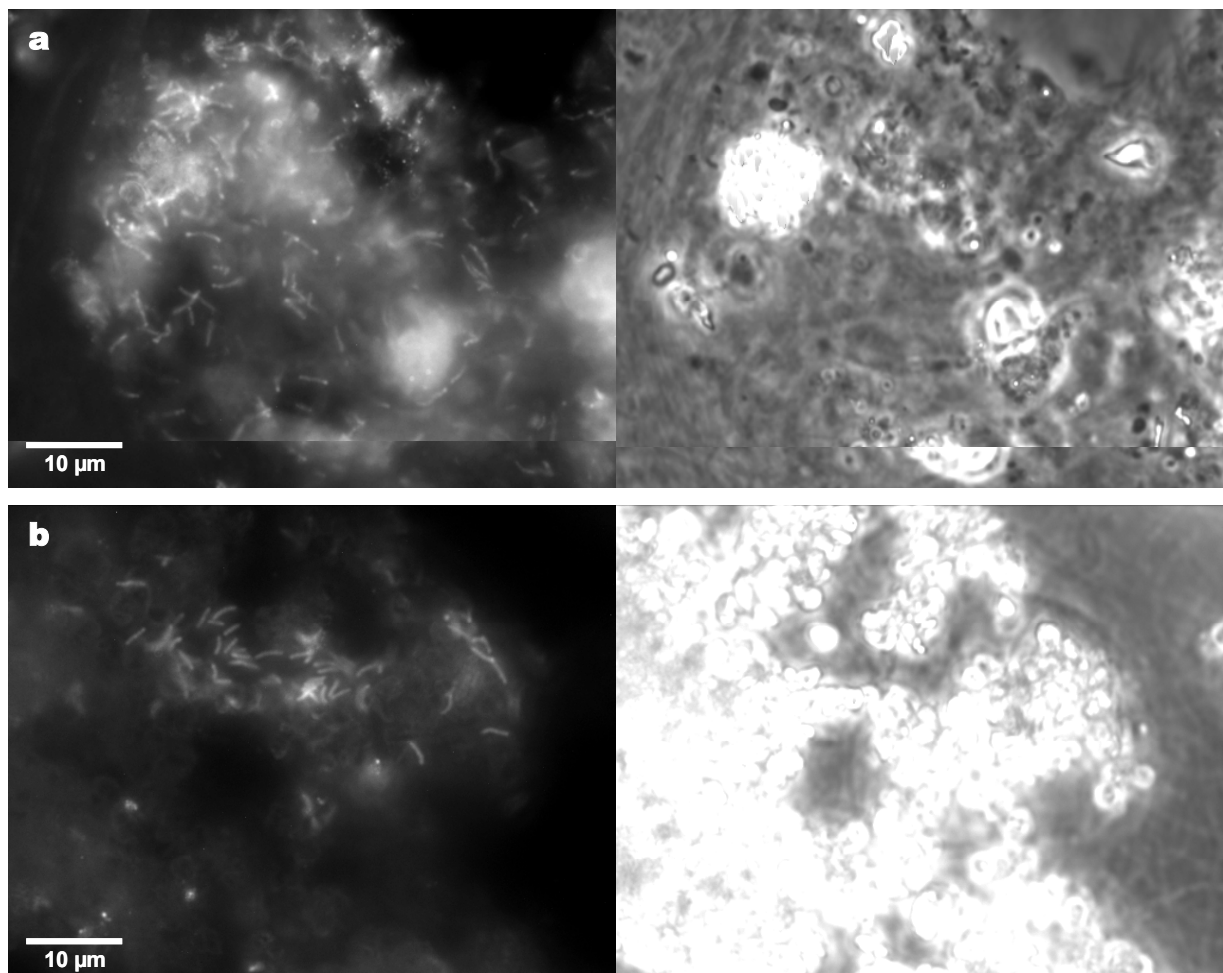


Abbildung C.18: Hybridisierung von PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestellen 29 (a) und 11 (b) mit Oligonukleotidsonde HOL189-Cy3. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast. **a:** Zielzellen des Typs A. **b:** Zielzellen des Typs B.

Ein Typ von Stäbchen erreichte eine Länge von ungefähr 8 µm bei einem Durchmesser von ungefähr 0,3 µm (Typ A). Der andere Typ erreichte bei ähnlichem

Durchmesser eine Länge von bis zu 2,5 μm (Typ B). Beide Morphotypen traten häufig in Kolonien auf und - im Gegensatz zu Organismen des ZD7-Typs - niemals in längeren Ketten. Die charakteristischen Fäden der weißen Matten waren häufig von Acidobacteria durchsetzt (Abb. C.19).

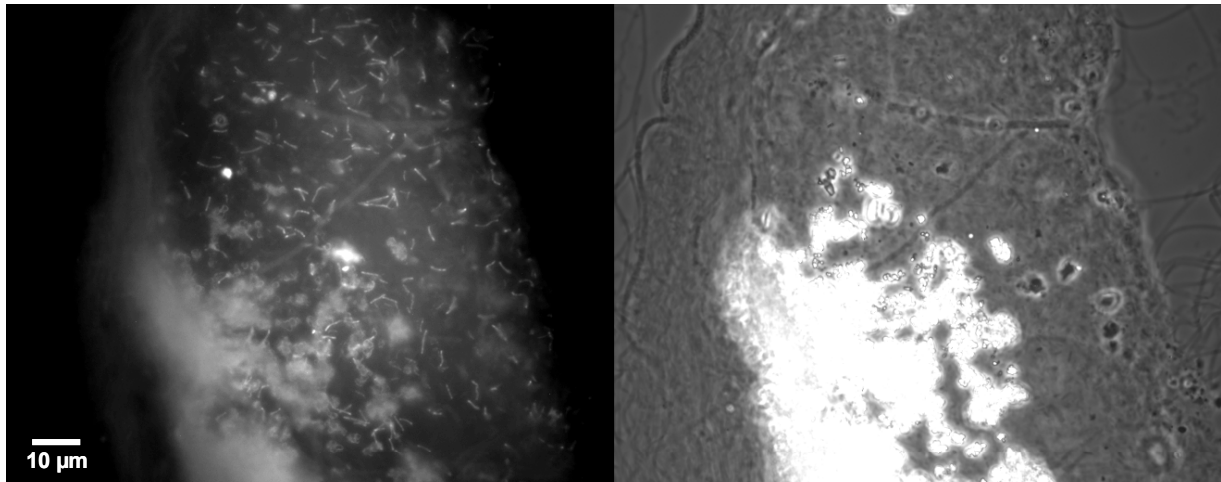


Abbildung C.19: Acidobacteria des Typs A in einem weißen Faden von Entnahmestelle 29; Hybridisierung mit Oligonukleotid HOL1400-Cy3. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

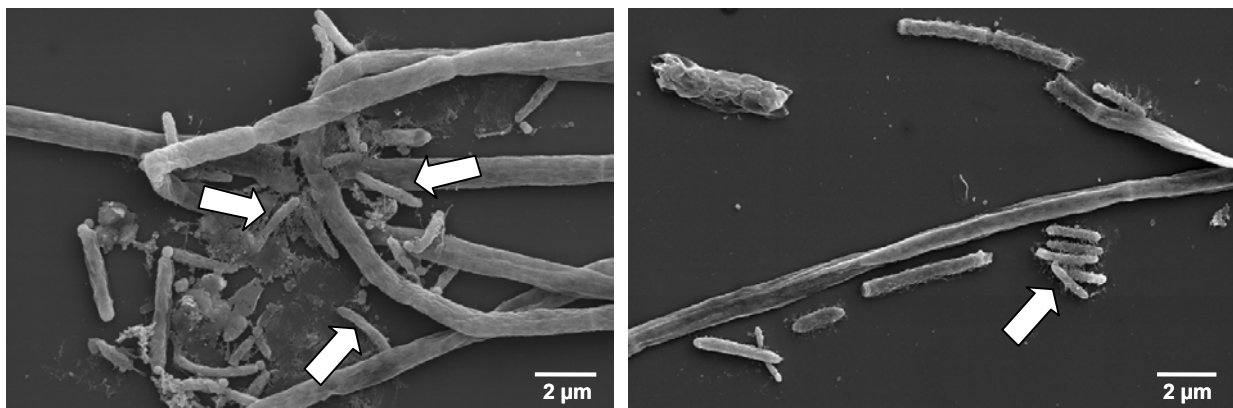


Abbildung C.20: REM-Aufnahmen von Zellen in PFA-fixiertem Material von Probe 29, die morphologisch Zielzellen des Typs B aus dem Acidobacteria-Phylum entsprechen.

Gruppen von Zellen mit der Morphologie der Zielzellen konnten rasterelektronenmikroskopisch im Probenmaterial ausgemacht werden (Abb. C.20). Häufig waren diese Gruppen innerhalb der für das Probenmaterial typischen weißen Filamente lokalisiert und auffällig oft mit anorganischen Strukturen assoziiert. Diese Partikel, häufig Kristalle, wurden in Proben 11 und 29 mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (B.15) untersucht. Bei den drei vorherrschenden Arten von Partikeln deuteten die Spektren auf elementaren Schwefel (Abb. C.21.a; C.22.b), Calcium- und Magnesiumcarbonat (Abb. C.21.b) bzw. Eisensulfid und -phosphatverbindungen (Abb. C.22.a) hin.

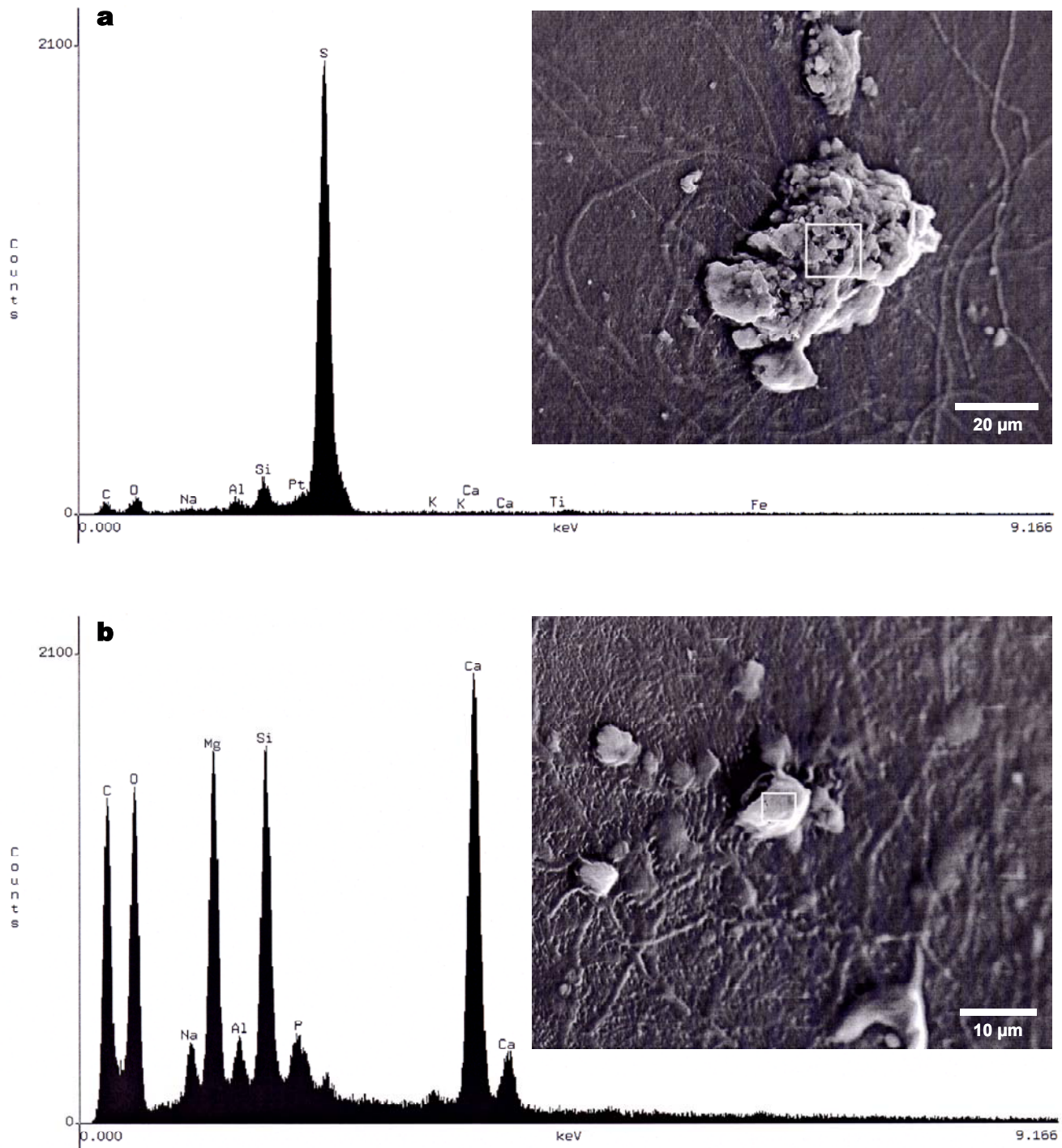


Abbildung C.21: Untersuchung charakteristischer Partikel in PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestelle 29 der Lower Kane Cave durch energiedispersive Röntgenanalyse. Weiße Boxen kennzeichnen den jeweils analysierten Bereich. **a:** Elementarer Schwefel. **b:** Calcium- bzw. Magnesiumcarbonatverbindungen. Der Silizium-Peak ist auf das Glas des Objektträgers zurückzuführen.

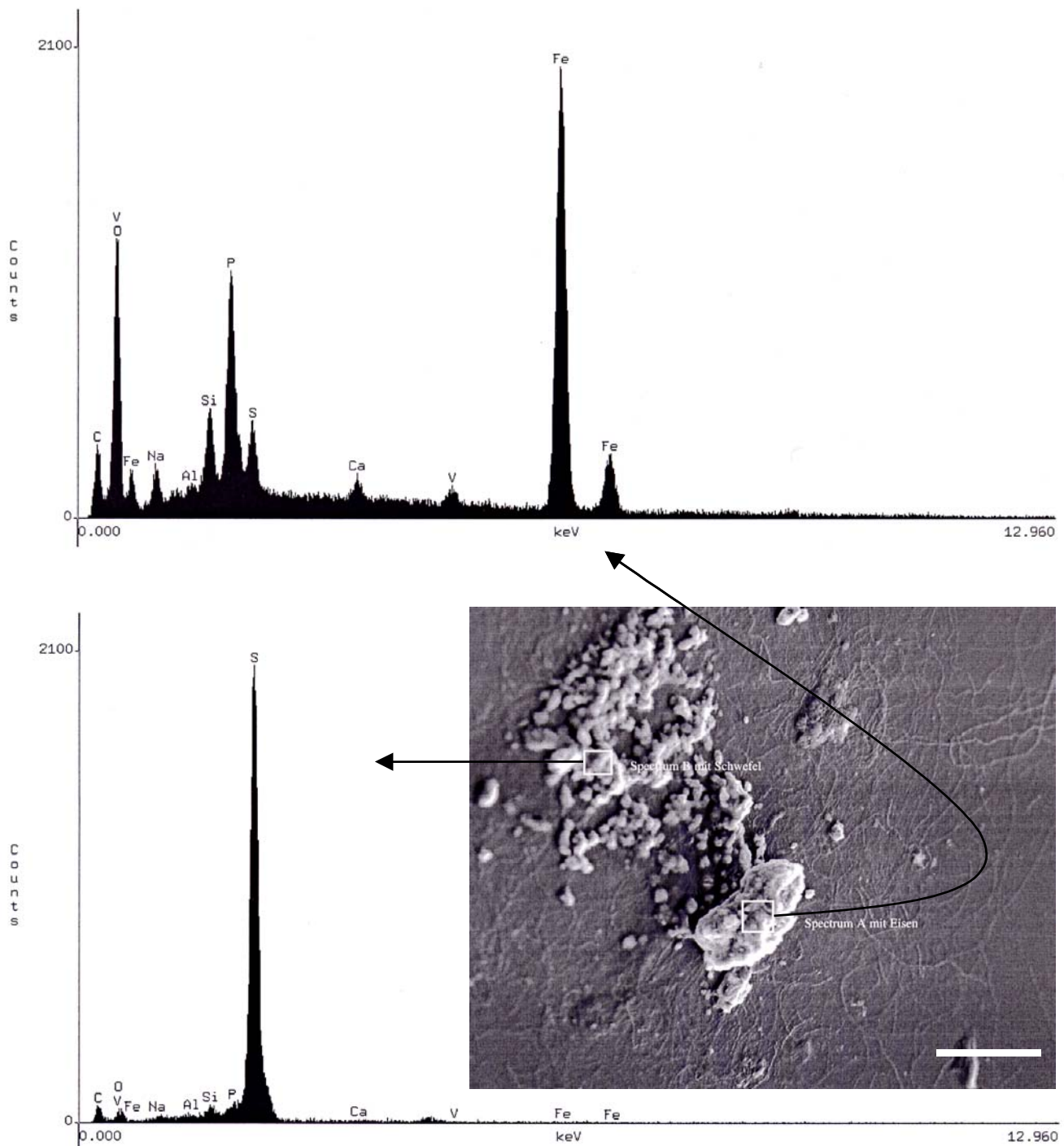


Abbildung C.22: Untersuchung benachbarter Partikel in PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestelle 29 der Lower Kane Cave durch energiedispersive Röntgenanalyse. Weiße Boxen kennzeichnen den jeweils analysierten Bereich. **a:** Eisensulfid- bzw. Eisenphosphatverbindungen. **b:** Elementarer Schwefel.

4.2.2 *In situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden engerer Spezifität

Auf Grundlage von Klonsequenzen der Genbanken ZE, ZF, ZG und ZH (vgl. Tab. C.6) wurden Oligonukleotidsonden für die Lower Kane Cave-Gruppe des Alpspitze-Clusters sowie die Untergruppe b entwickelt (Tab. C.9 und C.10) und in Probe 29, die nahe der Fissure Spring entnommen war, getestet.

Tabelle C.9: Für Organismen des Typs A spezifische Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos. ¹⁷	
ALP538	5' -GAT TGC TCC ATG GTG GTT-3'	54	50	538	23S-rDNA
ALP541	5' -CCG GAT TGC TCC ATG GTG-3'	58	61	541	23S-rDNA
ALP544	5' -CCA CCG GAT TGC TCC ATG-3'	58	61	544	23S-rDNA
ALP761	5' -CCC CTA GCC TGA GCT CAT-3'	58	61	761	23S-rDNA
ALP16I	5' -ATC CGA CTC TGC CCC ACA-3'	58	61	H 16 ¹⁸	23S-rDNA
ALP16II	5' -GGA TCT GAT CCG ACT CTG-3'	56	56	H 16	23S-rDNA

Tabelle C.10: Für Organismen des Typs B spezifische Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos.	
SGB678	5' -CAA GGA TAG ATC ATC CCG-3'	54	50	678	23S-rDNA
SGB918	5' -GAC TTC ACG GCG TGC CAT-3'	58	61	918	23S-rDNA
SGB1223	5' -GTC TCC AGC TGT CCT TAC-3'	56	56	1223	23S-rDNA
SGB1420	5' -CCT TCC TGC GTC CCT GCA-3'	60	67	1420	23S-rDNA

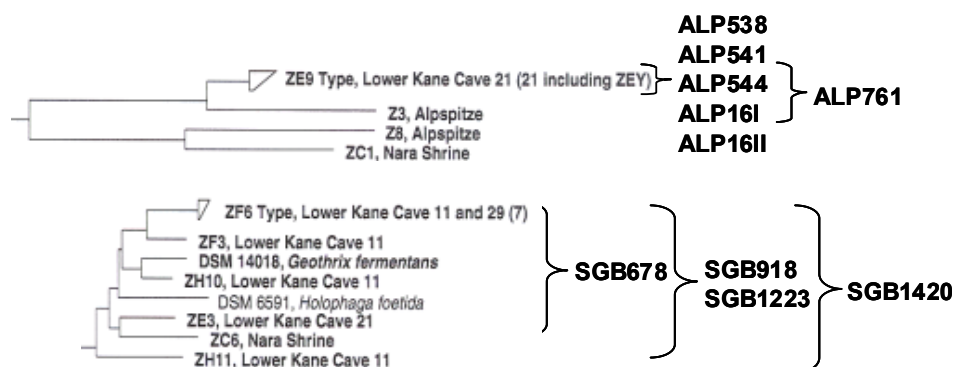


Abbildung C.23: Zielorganismen von Typ A- und TypB-Sonden (vgl. Abb. C.7).

¹⁷ Brosius *et al.*, 1981

¹⁸ H: Helix

Mit den Sonden ALP538, ALP541, und ALP544 (Abb. C.24), deren Zielregion die sehr variable Helix 25 der Domäne I ist, sowie mit ALP 761 (gegen die 3'-terminale Flanke der Helix 35 gerichtet; Abb. C.25a) konnten bei einer Stringenz von bis zu 35% Formamid im Hybridisierungspuffer morphologisch sehr einheitliche, stäbchenförmige Zielzellen mit einer Länge von bis zu 8 μm detektiert werden (Typ A), wobei langgestreckte Zellen schwer von paarweise hintereinanderliegenden Zellen zu unterscheiden waren. Die Sonde ALP16I erfaßte Zellen von Typ A, teilweise auch Typ B und dazu, allerdings mit deutlich niedrigerer Signalintensität, Zellen anderer Morphologie (Abb. C.25b). Mit ALP16II kamen lediglich bei einer Stringenz von 20% Formamid schwache Signale, die bei 35% nicht mehr wahrnehmbar waren.

Die Sonden SGB1223 (Abb. C.24, C.25a) und SGB1420 (Abb. C.25b) gegen die Untergruppe b des Phylums Acidobacteria ermöglichten bei 35% Formamid die Detektion von ebenfalls sehr einheitlichen Zellen des oben beschriebenen ersten Typs, die sich in ihrer Länge von lediglich bis ungefähr 3 μm deutlich von den Organismen des Al্পspitze-Clusters unterschieden (Typ B).

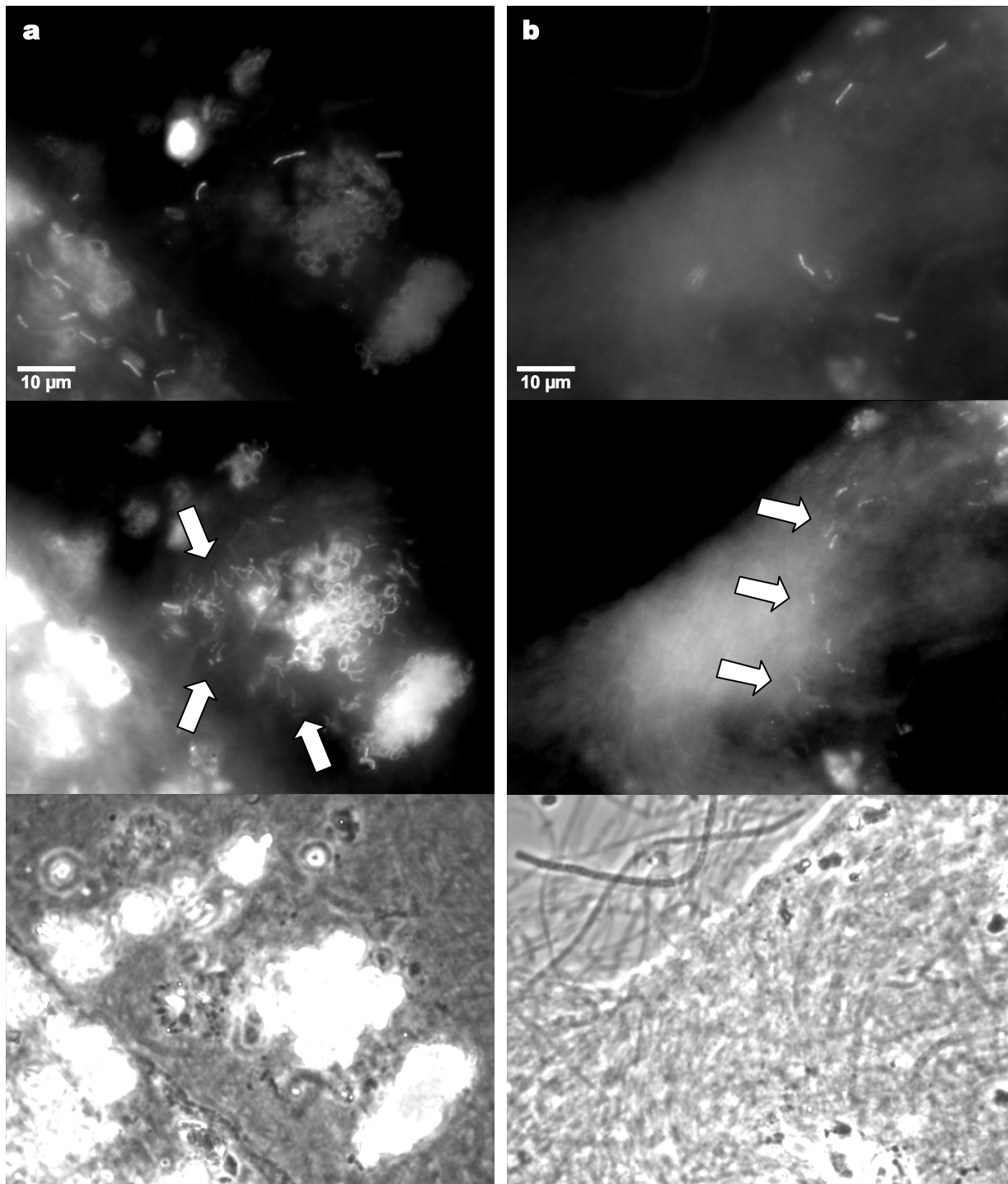


Abbildung C.24: Doppelhybridisierungen von PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestelle 29 mit Oligonukleotidsonden ALP544-Cy3 und SGB1223-Fluos. Oben: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Mitte: Epifluoreszenz, Filtersatz 9 (für Fluorescein-Signale). Unten: Phasenkontrast. Zielzellen der Sonden treten in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander auf. **a:** Zielzellen in der Nähe anorganischer Partikel. **b:** Zielzellen integriert in größeren Filamenten.

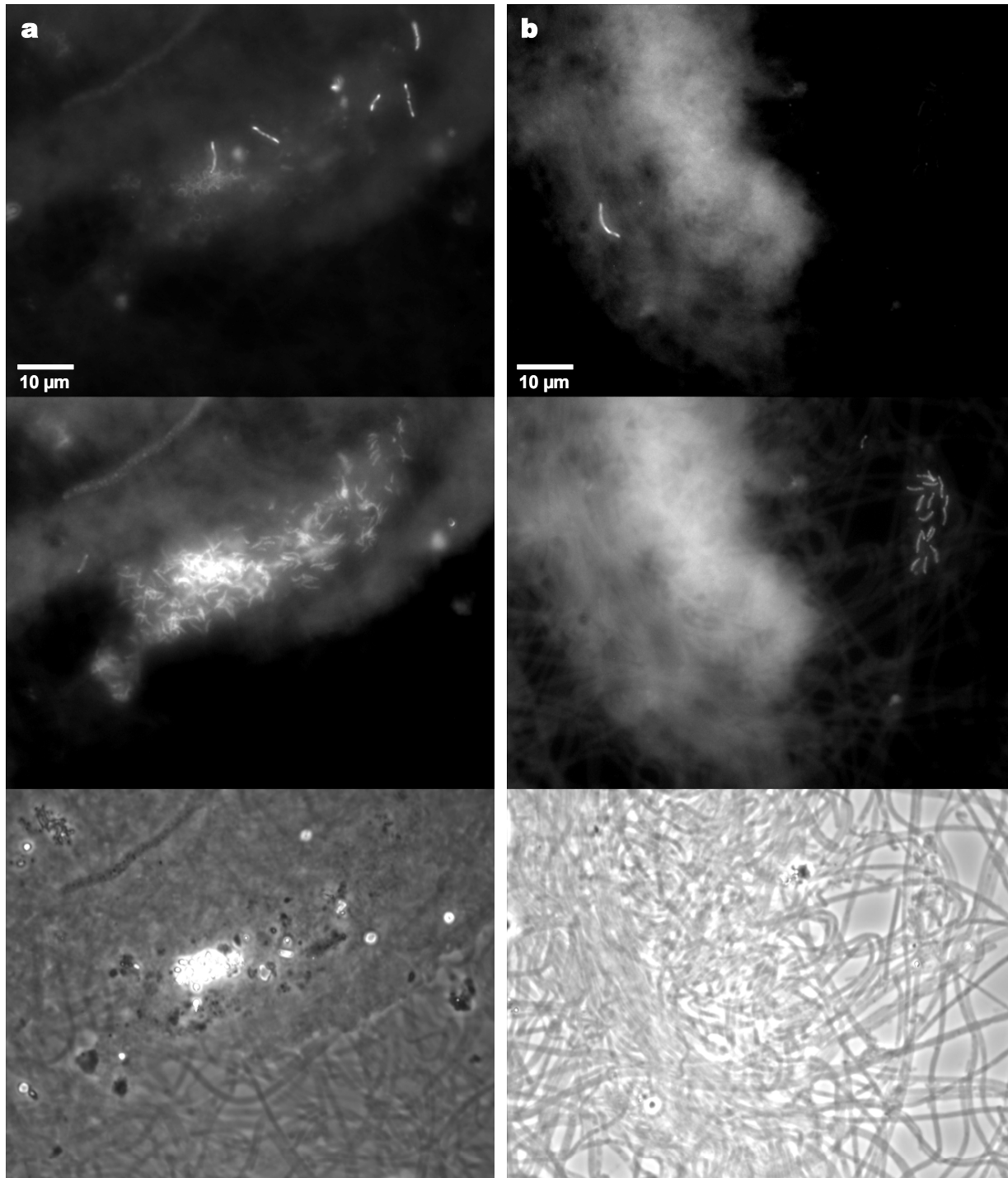


Abbildung C.25: Doppelhybridisierungen von PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestelle 29 mit Oligonukleotidsonden ALP761-Cy3 und SGB1223-Fluos (a) bzw. ALP161-Cy3 und SGB1420-Fluos (b). Oben: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Mitte: Epifluoreszenz, Filtersatz 9 (für Fluorescein-Signale). Unten: Phasenkontrast.

Mit SGB1420 wurden überdies große Filamente als Beifang detektiert, die in ihrer Signalstärke unter den Stäbchen der Untergruppe b-Typs blieben. Mit SGB678 konnten auch bei 20% Formamid keine verlässlichen Signale erhalten werden, mit SGB918 nur bei 20%; bei 35% waren die Signale nahe der Wahrnehmungsgrenze.

In Doppelhybridisierungen, in denen eine Sonde Fluorescein- und die andere Sonde Cy3-markiert eingesetzt wurden, gab es keine Überschneidungen der Signale für die Kombinationen SGB1223 mit ALP538, -541, -543 und -761 bzw. SGB1420 mit ALP538, -541, -543, -761 und 16l. Einige ALP16l-Zielzellen wurden auch von Sonde SGB1223 erfaßt, jedoch nicht vice versa.

Mit Sonden gegen beide Gruppen konnten große Kolonien mit bis zu Tausenden von Einzelzellen detektiert werden (Abb. C.26).

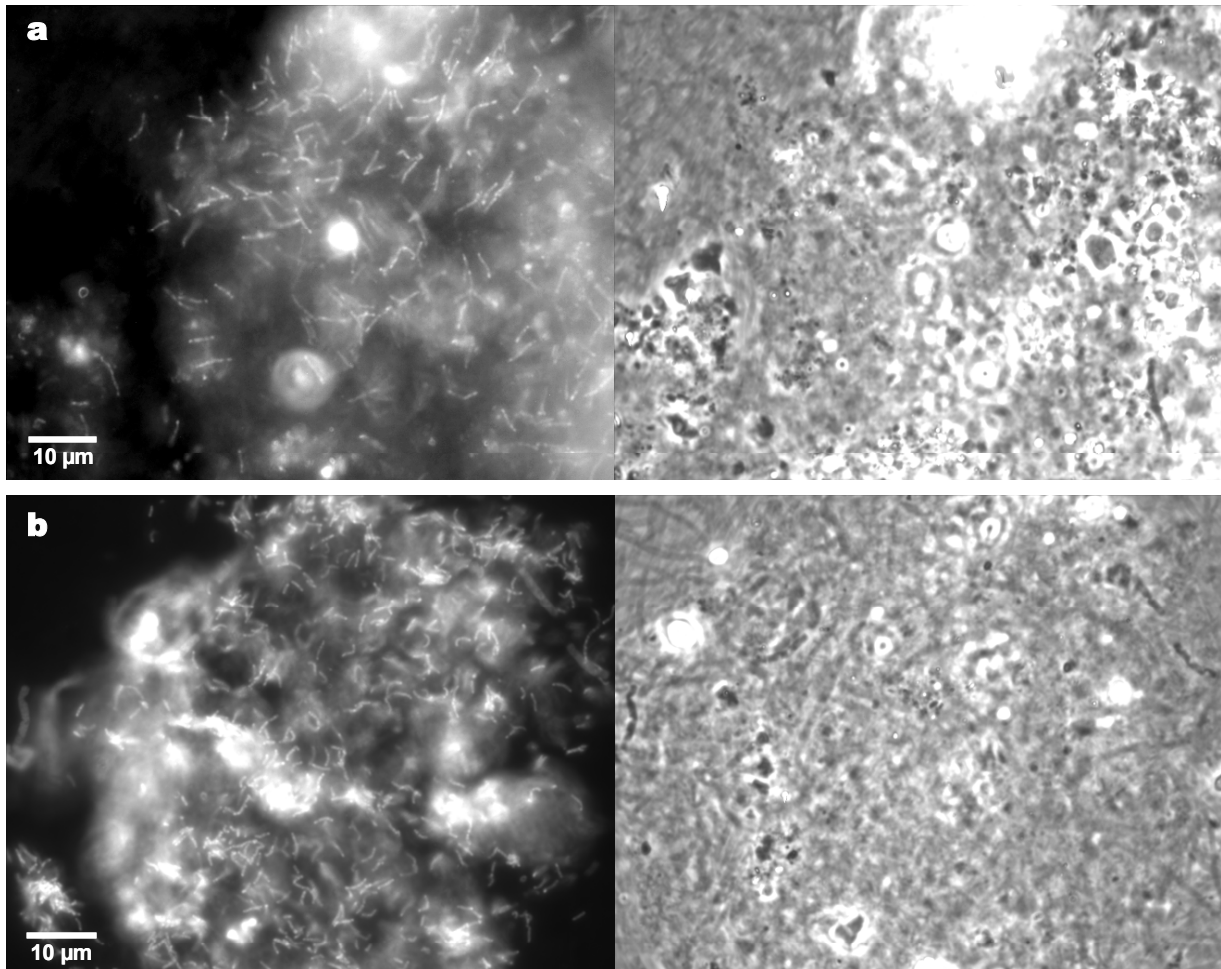


Abbildung C.26: Kolonien von Acidobacteria des Typs A und B in Probematerial von Entnahmestelle 29. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast. **a:** Hybridisierung mit Cy3-markiertem Oligonukleotid ALP16l. **b:** Hybridisierung mit Cy3-markiertem Oligonukleotid SGB1223.

4.2.3 *In situ*-Hybridisierung mit für *Geothrix fermentans* spezifischen Oligonukleotidsonden

Die Klone ZF3, ZH6 und ZH10 (Entnahmestelle nahe Fissure Spring) weisen Sequenzidentitäten von 97,0 (ZH10) bis 98,1% (ZF3) mit *Geothrix fermentans* auf. Um *G. fermentans* oder nah verwandte Organismen *in situ* im entsprechenden Probenmaterial nachweisen zu können, wurden die Oligonukleotidsonden GFER269, GFER276 und GFER2787 konstruiert.

Tabelle C.11: Für *G. fermentans* spezifische Oligonukleotidsonden.

Sonde	Sequenz	T _d [°C]	GC [%]	<i>E. coli</i> -Pos. ⁶	
GFER269	5' -CAG CTC TGG CCT GCG GCT-3'	62	72	269	23S-rDNA
GFER276	5' -TGC CAG AGG GCA GCT CTG-3'	60	67	276	23S-rDNA
GFER2787	5' -ACC ACG GGT CTC ATA GGG-3'	58	61	2787	23S-rDNA

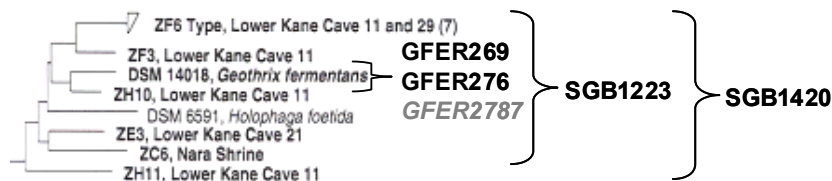


Abbildung C.27: Zielorganismen von GFER-Sonden (vgl. Abb. C.7).

Mit GFER2787-Cy3 konnten in Probe 29 schlanken Stäbchen mit einer Länge von ca. 2-2,5 µm nachgewiesen werden, die morphologisch dem Typ B entsprachen. Sie gaben auch mit SGB1223- und SGB1420-Fluos Signale, machten allerdings nur einen Bruchteil aller Zielzellen der hierarchisch übergeordneten Sonden aus (Abb. C.28).

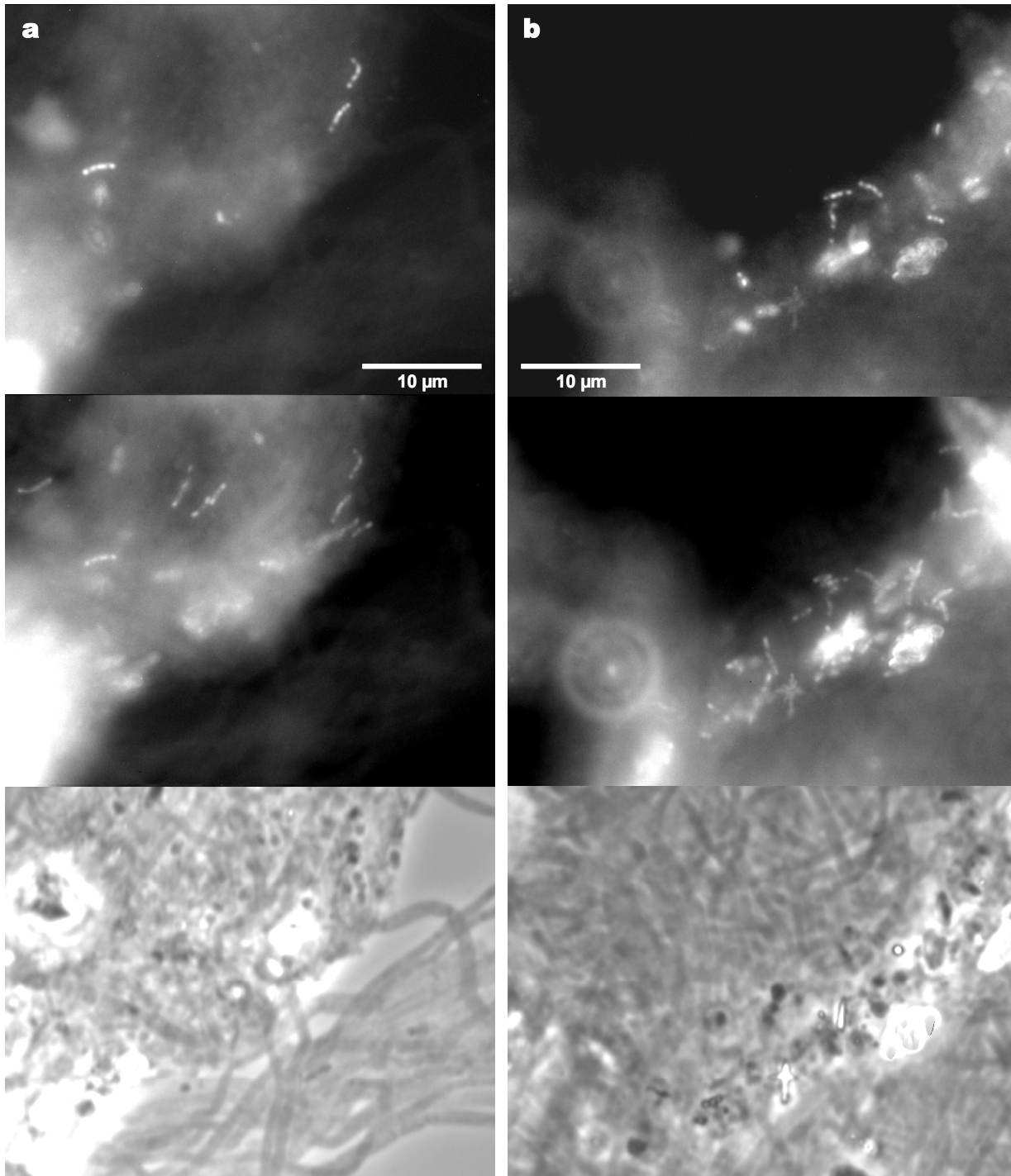


Abbildung C.28: Doppelhybridisierungen von PFA-fixiertem Probematerial von Entnahmestelle 29 der Lower Kane Cave mit Oligonukleotidsonden GFER2787-Cy3 und SGB1223-Fluos (a) bzw. SGB1420-Fluos (b). Oben: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Mitte: Epifluoreszenz, Filtersatz 9 (für Fluorescein-Signale). Unten: Phasenkontrast.

4.2.4 *In situ*-Hybridisierung mit gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten Polynukleotidsonden

Von Klonsequenzen ZE9 (repräsentativ für das Alpspitze-Cluster), ZF3 und ZF6 (repräsentativ für zwei Entwicklungslinien der Untergruppe b) wurden die gegen die Domäne III der 23S-rRNA gerichteten DNA-Polynukleotidsonden ZE9DIII-Cy3, ZF3DIII-Cy3 sowie ZF6DIII-Cy3 hergestellt und unter denselben Bedingungen wie die DNA-Polynukleotidsonde ZD7DIII-Cy3 (B.12.4.2; C.4.1.3) in Probe 29 eingesetzt.

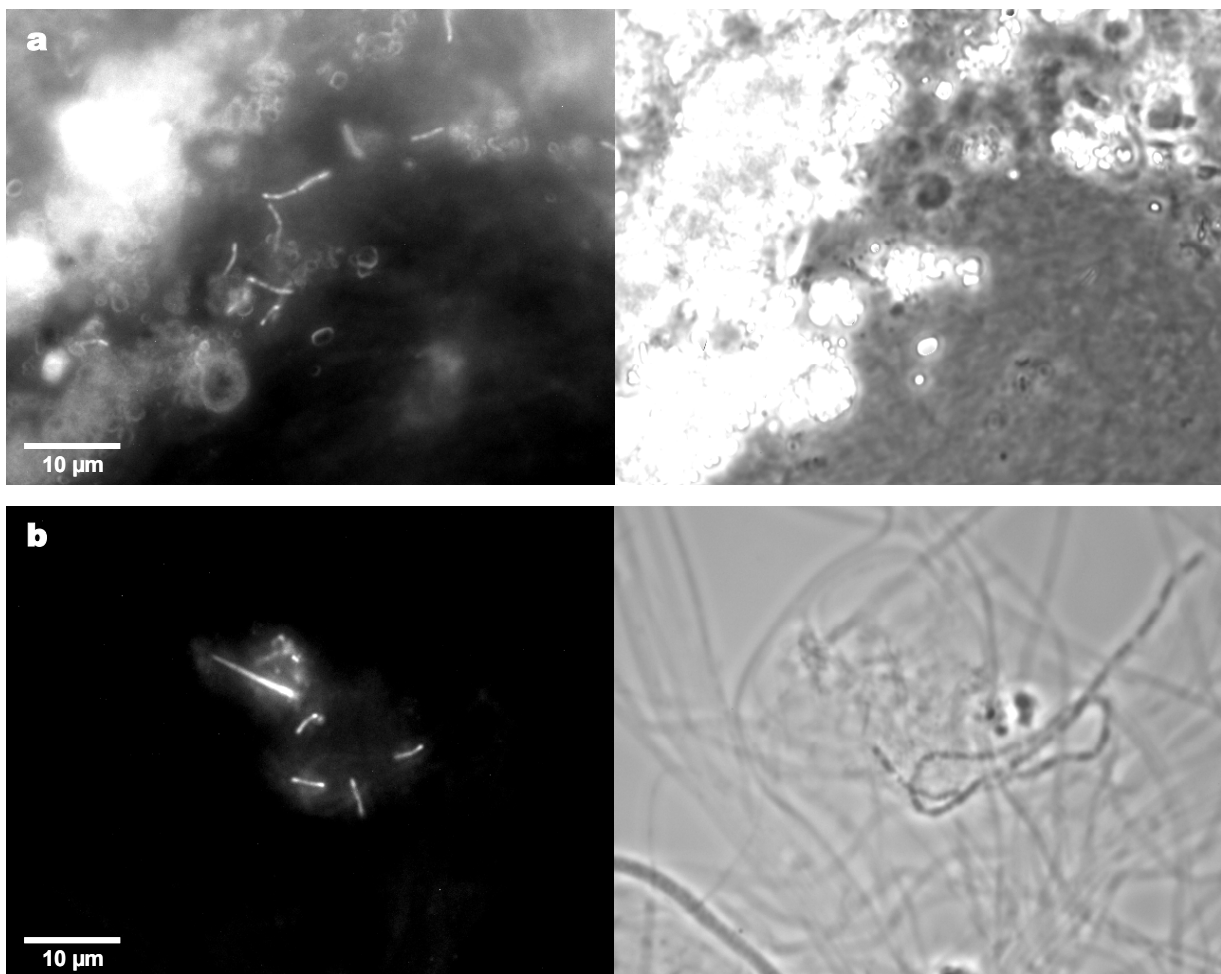


Abbildung C.29: Hybridisierungen mit DNA-Polynukleotidsonden in Probenmaterial von Entnahmestelle 29. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast. **a:** DNA-Polynukleotidsonde ZE9DIII-Cy3. **b:** DNA-Polynukleotidsonde ZF3DIII-Cy3.

Mit ZF6DIII-Cy3 konnten keine Signale erhalten werden, obwohl Sequenzen aus dem ZF6-Cluster auch im DNA-Isolat von Probenahmestelle 29 nachgewiesen werden konnten (C.3.3.6). Deutliche Signale gab hingegen die Sonde ZF3DIII-Cy3; die Zielzellen waren kurze Stäbchen, die häufig in Gruppen auftraten, was aufgrund der Hybridisierungsergebnisse mit den hierarchisch übergeordneten Oligonukleotid-

sonden SGB1223 und SGB1420 zu erwarten war. Ihre Zahl war wesentlich geringer als die Gesamtzahl der SGB1223- und SGB1420-Zielzellen. Sie wiesen keine Halos auf (Abb. C.29b).

Ebenfalls keine Halos, dafür aber intensive Signale, konnten mit der Sonde ZE9DIII-Cy3 erzielt werden. Die Zielzellen waren die auch mit den ALP-Oligonukleotiden zu identifizierenden länglichen Stäbchen, und traten meist einzeln, aber auch in Gruppen von bis zu mehreren Dutzend Individuen auf (Abb. C.29a). Die Fluoreszenz war an den Zellpolen auffällig konzentriert; bei paarweise hintereinanderliegenden Zellen waren nur die jeweils äußeren Zellpole davon betroffen (C.30a). Dieses Phänomen war auch bei Hybridisierungen mit entsprechenden Oligonukleotidsonden zu beobachten (Abb. C.30b).

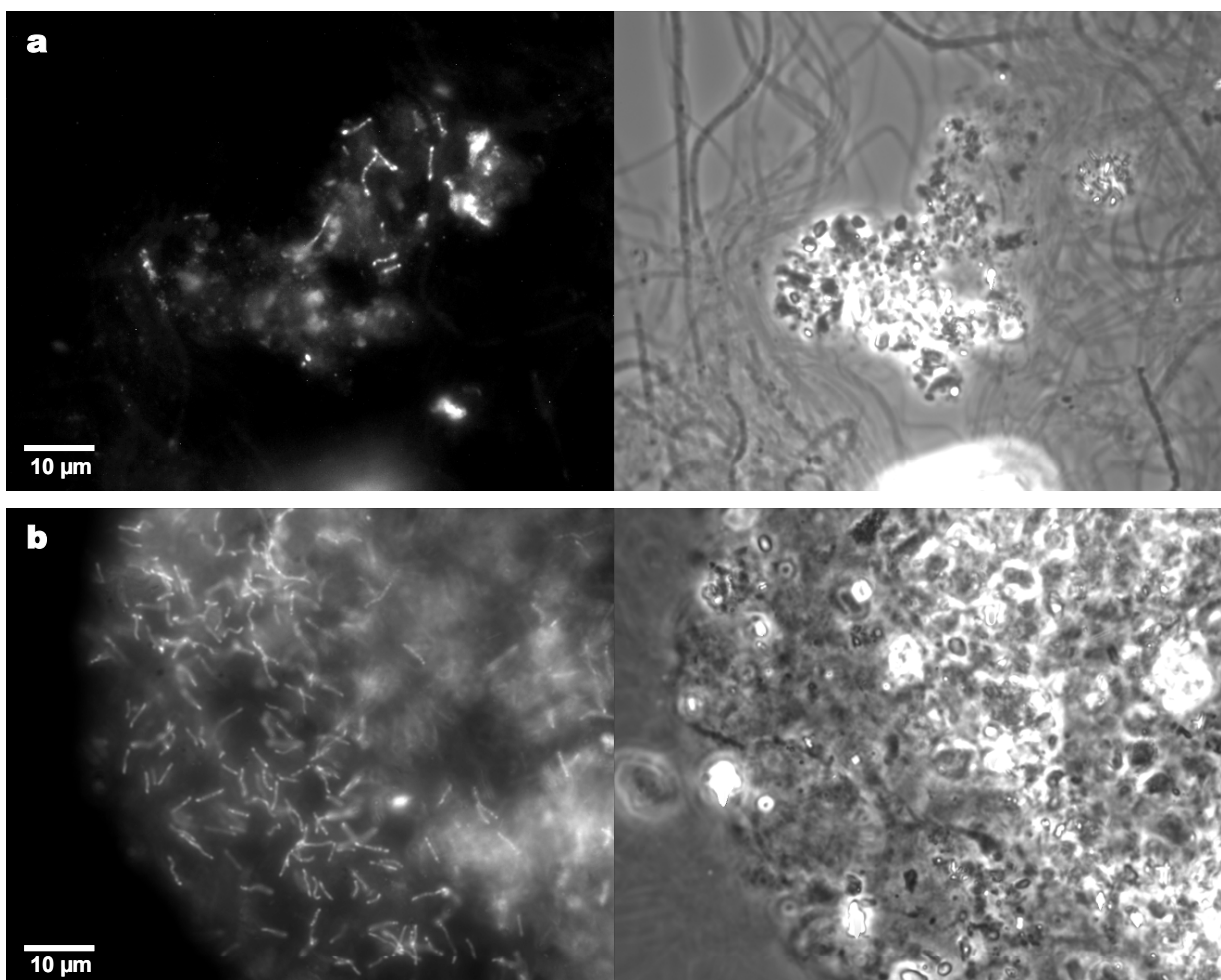


Abbildung C.30: Ungleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz bei Zielzellen der DNA-Polynukleotidsonde ZE9DIII-Cy3 **(a)** und Oligonukleotidsonde ALP760-Cy3 **(b)** in Probematerial von Entnahmestelle 29. Links: Epifluoreszenz, Filtersatz 15 (für Cy3-Signale). Rechts: Phasenkontrast.

4.2.4 Sondengestützte Isolierung von Zielzellen des Typs A und B durch Mikromanipulation

Da die untersuchten Organismen der Typen A und B in Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden keine Halos bildeten, war ein Polynukleotid-gestütztes Zellfischen von vornherein unmöglich. Versuche, Zielzellen aus Untersuchungsmaterial der Lower Kane Cave durchflußcytometrisch zu isolieren scheiterten am sofortigen Zusetzen der Düse des Cell Sorters durch den hohen Anteil filamentöser Strukturen in der Probe. Weder durch Ultraschallbehandlung noch Filtration konnte die Probe für die Durchflußcytometrie vorbehandelt werden.

Möglich war der gezielte Zugriff auf Zellen aus dem Acidobacteria-Phylum mittels Mikromanipulation (Fröhlich und König, 2000). Aliquots von Probe 29 wurden in Lösung mit den Sonden ALP761-Cy3 bzw. ALP16I-Cy3 für Typ A sowie mit der Sonde SGB1223-Cy3 für Typ B hybridisiert (vgl. B.13.2). Unter Fluoreszenzlicht erfolgte die Identifizierung der jeweiligen Zielzellen (nicht abgebildet), die anschließend unter Durchlicht in die Mikrokapillare aufgenommen werden konnten (B.17; Abb. C.31). Auf diese Weise war die Isolierung von Zielzellen aller drei Sonden möglich. Die Aufnahme der wesentlich selteneren frei liegenden Zellen aus beiden phylogenetischen Gruppierungen war unproblematischer als die von Zellen, die in Kolonien vorlagen und in größere Konsortien integriert waren. Drang die Kapillare des Manipulators in die Matrix der Konsortien, die mit anorganischem Material durchsetzt waren (C.4.2.1) ein, gab diese nach und federte bei nachlassender Belastung wieder in die Ausgangslage zurück (Abb. C.32). Diese Verformbarkeit deutet auf eine gelartige Konsistenz hin.

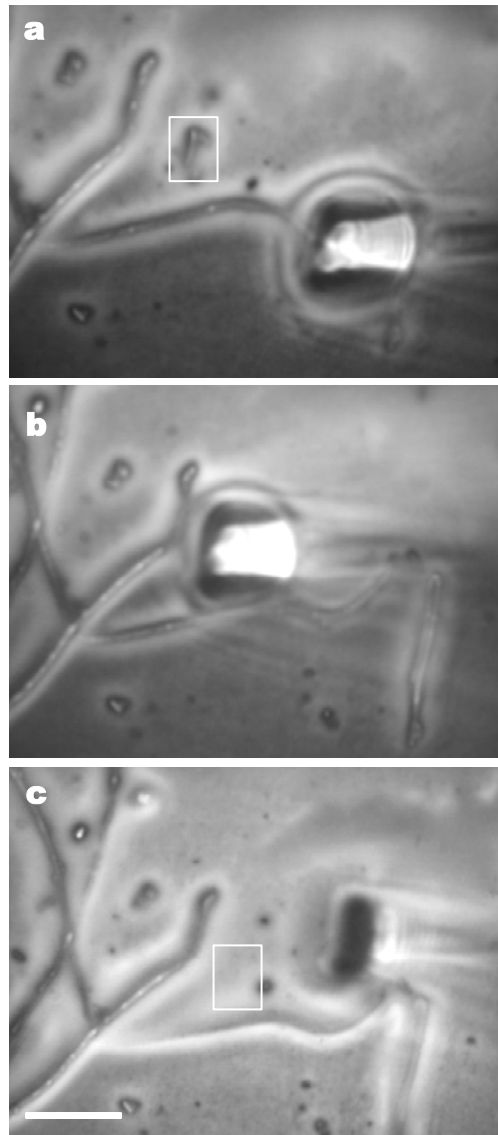
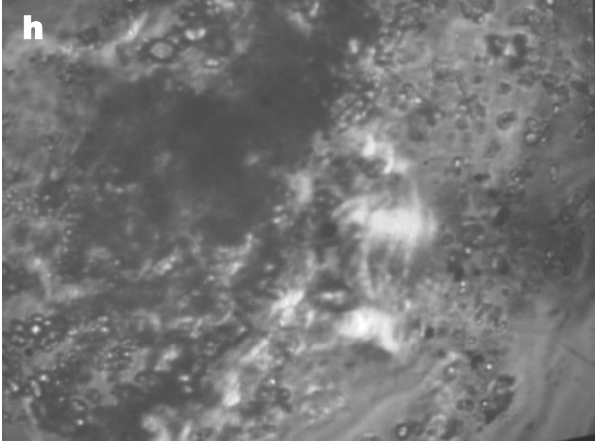
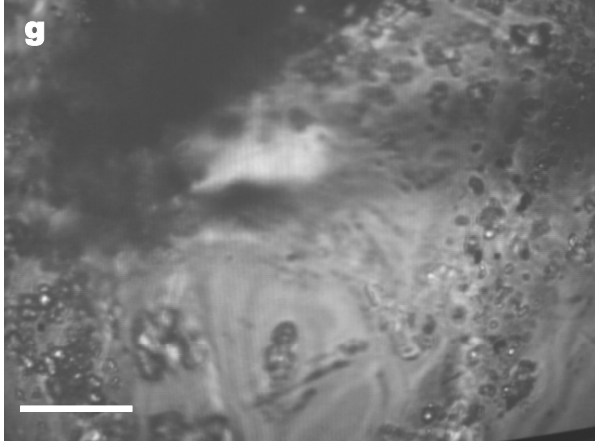
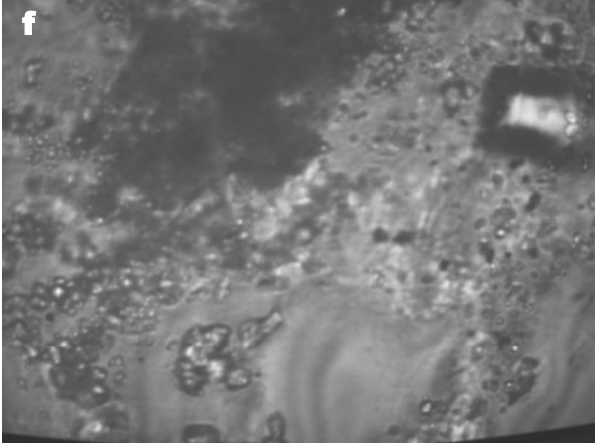
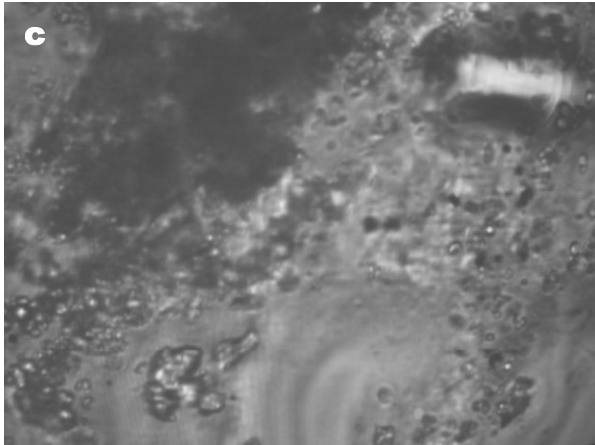
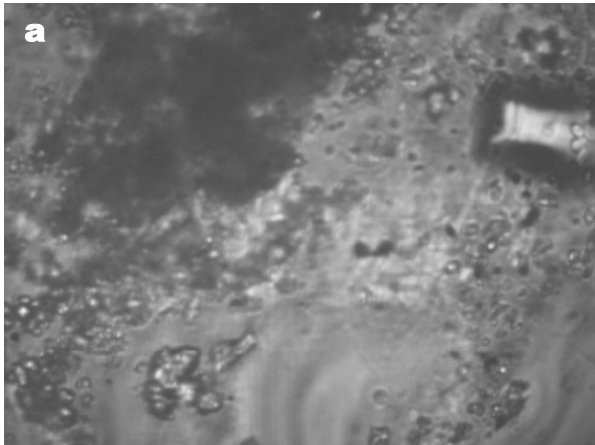


Abbildung C.31: Mikromanipulation einer Zielzelle von Sonde Alp16I in PFA-fixiertem Probenmaterial 29 der Lower Kane Cave. **a:** Die Spitze der Mikrokapillare nähert sich der Zielzelle (im Kasten). **b:** Die Zielzelle wird aufgenommen. **c:** Die Mikrokapillare wird entfernt. Balken ca. 10 μm .

Eine Extraktion einzelner Zielzellen aus den zwar elastischen, aber zähen Matrices war nicht möglich. Größere Verbände konnten aber durch gezielte mechanische Fragmentierung auf Partikel reduziert werden, die größtenteils Zielzellen enthielten. Diese mechanische Zerkleinerung erlaubte schließlich die Aufnahme der Partikel im Ganzen.

Abbildung C.32 (folgende Seite): Gelartige Zusammensetzung der Matrix aus Probe 29, in die eine Kolonie von Alp16I-Zielzellen eingelagert war. Nach Stauchung durch die Mikrokapillare nimmt die Matrix wieder die ursprüngliche Form an. **a-f:** Vertikale Führung der Mikrokapillare. **g, h:** Horizontale Führung der Mikrokapillare. Balken ca. 10 μm .



D Diskussion

1 DNA-Polynukleotidsonden

1.1 Verwendung von DNA-Polynukleotidsonden anstelle von RNA-Transkriptsonden in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

RNA-Polynukleotidsonden wurden für Ganzzellhybridisierungen bereits erfolgreich in künstlichen Bakterienmischungen (Stoffels *et al.*, 1999; Trebesius *et al.*, 1994), Anreicherungen magnetotaktischer Bakterien (Spring *et al.*, 1998), Kokulturen von symbiontischen Verrucomicrobia und ihrem eukaryontischen Wirt *Euplotidium arenarium* (Petroni *et al.*, 2000) und nativem Meerwasser (DeLong *et al.*, 1999; Karner *et al.*, 2001; Pernthaler *et al.*, 2002) eingesetzt.

In Umweltproben komplexer Struktur wie PFA-fixiertem Boden mit einem hohem Anteil mineralischer Substanzen neigen RNA-Polynukleotidsonden jedoch dazu, an Partikel im Probenmaterial zu binden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß in Bodenproben Signale nicht nur mit 23S-rRNA-gerichteten Transkriptsonden für Acidobacteria erhalten wurden, die komplementär zur ribosomalen RNA waren. Identische Signale gaben auch Sonden, die die gleiche Sequenz hatten wie die ribosomale Ziel-RNA, sog. Antisense-Sonden, die als Negativkontrolle eingesetzt worden waren. Dies deutet darauf hin, daß erhaltene Signale nicht spezifisch waren. In der Regel können unspezifische Signale durch Erhöhung der Stringenz unterdrückt werden. Aus technischen Gründen war allerdings eine Stringenzsteigerung über die Erhöhung der Formamidkonzentration nicht mehr möglich, da die Hybridisierungen bei einer Konzentration von 95% Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt worden waren.

Als Alternative boten sich DNA-Polynukleotidsonden an. DNA-Polynukleotidsonden wurden bisher beispielsweise radioaktiv markiert in Hybridisierungen geblotteter DNA auf Filtern eingesetzt (Thomas *et al.*, 1994). Sie ermöglichen eine größere Variationsbreite in den Hybridisierungsbedingungen: Aufgrund der geringeren Stabilität von DNA-RNA-Hybriden im Gegensatz zur Bindung von RNA-Transkriptsonden an ribosomale RNA kann in solchen Fällen von entsprechenden Sonden eine höhere Spezifität erwartet werden: Eine schwächere Bindung der Sonde-Zielmolekül-Komplexe ermöglicht eine feinere Einstellbarkeit der Hybridisierungsbedingungen, wenn die Differenzierung näher verwandter Organismen gefordert ist. Auch in Hybridisierungen nach ursprünglichem Protokoll (vgl. Trebesius *et al.*, 1994), die ohne nachgeschalteten stringenten Waschschritt

durchgeführt wurden (B.13.4.1), konnten spezifische Signale selbst in komplexem Probenmaterial erhalten werden (C.2.3).

1.2 Signalcharakteristika von DNA-Polynukleotidsonden

Im Gegensatz zu Oligonukleotiden läßt sich bei Polynukleotidsonden der Spezifitätsbereich über die Hybridisierungsbedingungen variieren. Mit Polynukleotiden sind Signalintensitäten zu erreichen, die beim gruppenspezifischen Einsatz unter vergleichsweise relaxierten Bedingungen die Signalintensitäten von einfach markierten Oligonukleotidsonden - deren Stärke wiederum in der Möglichkeit sehr enger Spezifität liegt - weit übersteigen (Trebesius *et al.*, 1994). Je höher allerdings die Stringenz gewählt wird, desto mehr wird die Signalintensität reduziert und den Vorteil gegenüber Oligonukleotidsonden nivelliert. In Versuchen zur intragenerischen Differenzierung von Arten der Gattung *Acinetobacter* (C.2.1) konnte dieser Effekt bestätigt werden.

Halos von DNA-Polynukleotidsonden zeigen allerdings die auffallende Eigenschaft, im Gegensatz zu mit Transkriptsonden erzielten Halos wesentlich breiter zu sein und körniger zu erscheinen (Abb. C.3, C.5 sowie C.13).

Dies mag darin begründet sein, daß DNA-Polynukleotidsonden – die erst denaturiert werden müssen – als PCR-Produkte doppelsträngig eingesetzt werden. Durch das Vorliegen des reversen Komplements bei Hybridisierungen mit DNA-Polynukleotidsonden ist die Möglichkeit gegeben, daß nicht-targetbindende Abschnitte einer ans Ribosom gebundenen Sonde ihrerseits mit den passenden Regionen auf gegensträngigen Molekülen hybridisieren können. An diese wiederum nur partiell gebundenen Stränge binden weitere Sonden, die nach dem vorgeschalteten Denaturierungsschritt einzelsträngig vorliegen, was die Ausbildung ausgedehnter Sonden-Netzwerke um die Zellen herum ermöglicht.

1.3 Die Helix 58 der 23S-rRNA als entscheidende Region für die Bindung von gegen die Domäne III gerichteten Polynukleotidsonden

Wurden die Typstämme der sieben zum Versuchszeitpunkt gültig beschriebenen Arten innerhalb der Gattung *Acinetobacter* mit entsprechenden DNA-Polynukleotidsonden bei höchstmöglicher Stringenz hybridisiert, ergab sich folgendes Muster: *A. baumannii* und *A. calcoaceticus* reagierten jeweils ausschließlich mit den von ihrer DNA hergestellten Sonden, während zwei Gruppen, *A. Iwoffii* und *A. johnsonii* einerseits sowie *A. haemolyticus*, *A. junii* und *A. radioresistens* andererseits nicht nur mit von ihrer, sondern auch mit von DNA der

jeweils anderen Gruppenangehörigen angefertigten Sonden hybridisierten (Tab. C.1).

Die Analyse der jeweiligen SONDENSEQUENZEN bezüglich der Lage und Anzahl der diagnostischen Basenpositionen zeigte, daß innerhalb der beiden Gruppen die Nukleotidsequenzen über einen Bereich, der in der 23S-rRNA der Helix 58 entspricht, identisch sind (Tab. D.1).

Tabelle D.1: Helix 58-Sequenzen der *Acinetobacter*-Arten, die für die Evaluation der Spezifität von DNA-Polynukleotidsequenzen herangezogen wurden. Arten, die von denselben Sonden erfaßt werden, sind grau unterlegt. Diskriminierende Positionen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

E.coli pos.	1470	1480	1490	1500	1510	1520
A. baumannii ATCC 19606 ^T	GAAAG GA U GU AGGCAUG U AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U ACUCUAUGCUGAGAU CU GAUAG					
A. calcoaceticus ATCC 23055 ^T	GAAAG GA A GUAGGCAUG CA AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U G CUCUAUGCUGAGAU CU GAUAG					
A. johnsonii ATCC 17909 ^T	GGAAG GU U GU AGGCAUG U AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U ACUCUAUGCUGAG A ACU GAU AG					
A. Iwoffii ATCC 15309 ^T	GGAAG GU U GU AGGCAUG U AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U ACUCUAUGCUGAG A ACU GAU AG					
A. haemolyticus ATCC 17906 ^T	GGAAG ACA GUAGGCAUG CA AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U G CUCUAUGCUGAG A GUC GAUAG					
A. junii ATCC 17908 ^T	GGAAG AC CGUAGGCAUG CA AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U G CUCUAUGCUGAG A GUC GAUAG					
A. radioresistens ATCC 43998 ^T	GGAAG ACA GUAGGCAUG CA AUCUUAGGCAA AU CCGGGG U G CUCUAUGCUGAG A GUC GAUAG					
Helix	[<< <<<<<< <<<<<<<<[[<<<< <[>>>>>>]]>>>> >>>>>> >>>> >>>]]
	58					58

Damit scheint diese Region, die mit 60 Nukleotiden ungefähr einem Fünftel der Gesamtlänge der Sonden entspricht, von elementarer Bedeutung für die Bindung der Polynukleotidsonden zu sein.

Ein Unterschied von einem Nukleotid bei *A. junii* (*E.coli*-Position 1474, Brosius *et al.*, 1981) übt offensichtlich keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten der Sonden aus. Diese Position befindet sich auf der 5'-terminalen Hälfte der Helix 58 in einem Bereich, in dem auch die Zugänglichkeit für Oligonukleotidsonden, zumindest in *E.coli*, eingeschränkt ist (Fuchs *et al.*, 2001). In der 3'-terminalen Hälfte dieser Helix ist hingegen eine gute Zugänglichkeit gegeben.

Die Hybridisierungsergebnisse mit DNA-Polynukleotidsonden standen in deutlichem Gegensatz zur Taxonomie der Gattung *Acinetobacter* auf der Basis von 16S-rDNA-Sequenzdaten (Rainey *et al.*, 1994; Ibrahim *et al.*, 1997). Die Aufklärung dieser Diskrepanzen erforderte eine vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA-Gene der untersuchten Arten.

2 Phylogenetische Struktur der Gattung *Acinetobacter* auf Grundlage von 23S-rRNA-Sequenzdaten

Verschiedentlich hatte sich herausgestellt, daß eine auf Sequenzanalyse von 16S-rRNA-Genen gestützte Phylogenie auf intragenerischer Ebene unzuverlässig sein kann. Am Beispiel der Zuordnung verschiedener Isolate aus der Gattung *Fibrobacter* zu den Arten *F. succinogenes* und *F. intestinalis* wurden die Unterschiede in den durch vergleichende 16S-rRNA-Analyse und DNA-DNA-Hybridisierungen ermittelten Ähnlichkeitswerten aufgezeigt (Amann *et al.*, 1992). Fox *et al.* zeigten im gleichen Jahr, daß bei *Bacillus*-Stämmen, deren 16S-rRNA-Sequenzen identisch erschienen, eine feinere Auflösung mittels DNA-DNA-Hybridisierung erreicht werden konnte. Die Differenzierung von *Staphylococcus*-Arten durch 16S-rRNA-Sequenzanalysen war nicht kongruent mit einer Zuordnung der Arten, die auf DNA-DNA-Hybridisierungsstudien beruhte (Schleifer, persönliche Mitteilung).

Im Fall der Gattung *Acinetobacter* korrelierten DNA-DNA-Hybridisierungsstudien (Bouvet und Grimont, 1986; Tjernberg und Ursing, 1989) gut miteinander, wohingegen eine auf vergleichenden Sequenzanalysen der 16S-rRNA-Gene gestützte Phylogenie dieser Gattung (Rainey *et al.*, 1994) völlig inkonsistent - besonders auffällig in den Verwandtschaftsverhältnissen von *A. haemolyticus* und *A. johnsonii* - mit diesen Ergebnissen war. Ergebnisse aus der ebenfalls 16S-rDNA-gestützten Amplified DNA Restriction Analysis (ARDRA; Vaneechoutte *et al.*, 1995) fielen ähnlich wie die Ergebnisse aus der vergleichenden 16S-rRNA-Sequenzanalyse aus („Thus, for some species there was little overall agreement between ARDRA grouping, i.e., partial 16S rRNA gene sequence information, and data from DNA-DNA hybridization, which is considered to be the gold standard for species delineation... Finally, it was observed that some results obtained with ARDRA seem to be in discordance with taxonomic relationships based on DNA relatedness...“). Eine spätere Studie allerdings führte zu ARDRA-Ergebnissen, die im Einklang mit DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen standen: „Comparison of the results obtained with ...DNA-DNA hybridization [and]... ARDRA... showed good agreement for most strains“ (Seifert *et al.*, 1997). Erklärt wird dies mit möglichen Unterschieden zwischen verschiedenen Operons.

Die Analyse der *gyrB*-Gene für die Untereinheit B der DNA-Gyrase zeigte, daß eine auf diesen Genen beruhende phylogenetische Struktur der Gattung *Acinetobacter* mit den Ergebnissen von DNA-DNA-Hybridisierungen, aber nicht mit der 16S-rDNA-gestützten Phylogenie korreliert: „The result of a phylogenetic analysis using *gyrB* nucleotide sequences was consistent with those using DNA-DNA hybridization and phenotype comparison... On the other hand, the topology of the phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences was quite different from that based on the *gyrB*

sequences...” (Yamamoto und Harayama, 1996); „...the grouping mostly corresponded to genomic species determined by DNA-DNA hybridization“ (Yamamoto *et al.*, 1999).

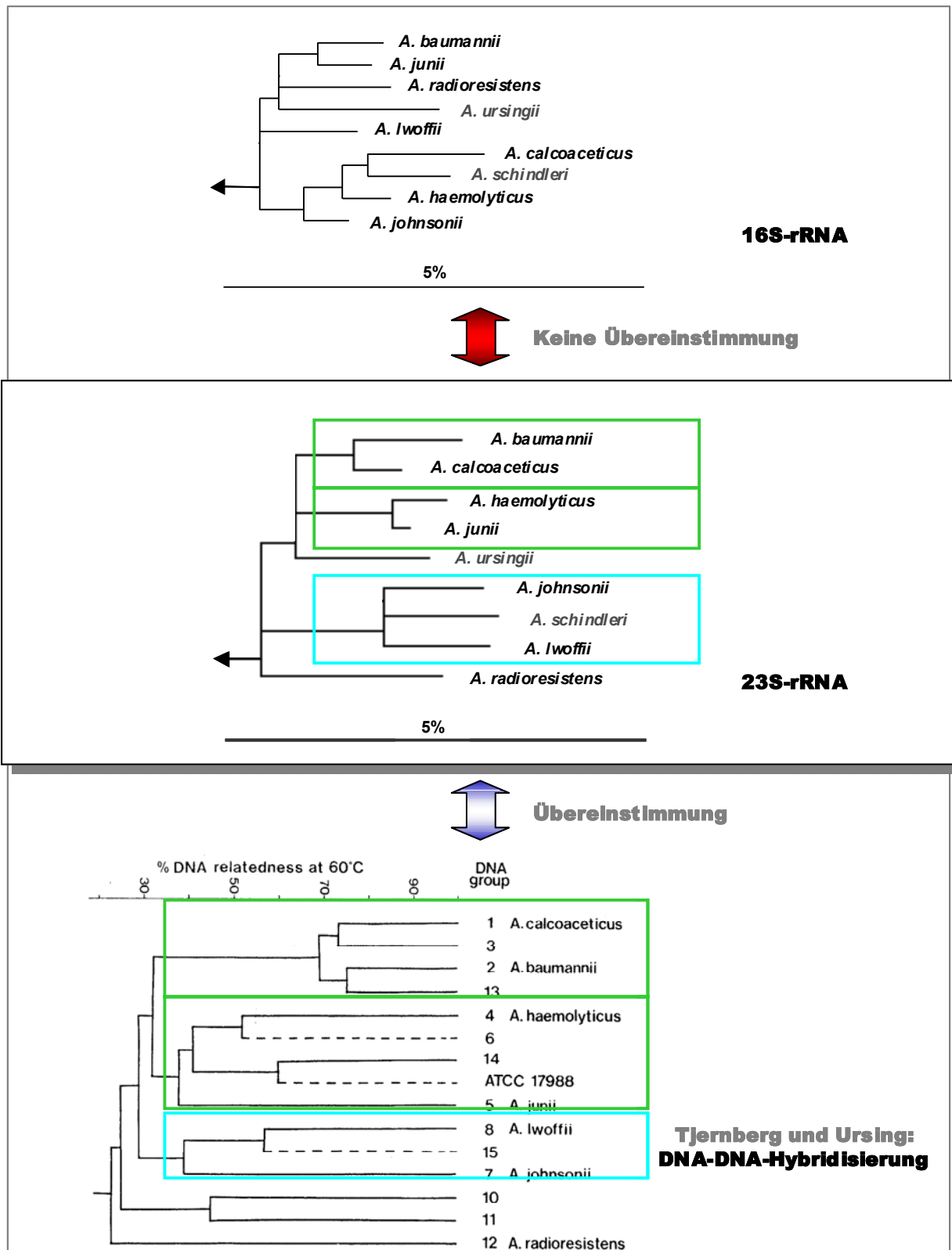


Abbildung D.1: Phylogenetische Struktur der Gattung *Acinetobacter*: Vergleich von Bäumen auf Grundlage von rRNA-gestützten Phylogenien mit DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen.

Auch eine auf biochemischen Eigenschaften basierende Taxonomie stimmte mit den DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen überein („We observed good correlation with DNA-DNA hybridization data“, Kämpfer *et al.*, 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit durch vergleichende Sequenzanalyse der 23S-rRNA ermittelte phylogenetische Struktur der Gattung *Acinetobacter* deckt sich mit jener aus den oben erwähnten DNA-DNA-Hybridisierungsstudien (Abb. D.1):

Die enge Affiliation der DNA-Gruppen-Paare 1 (*A. calcoaceticus*) und 2 (*A. baumannii*) zusammen mit 4 (*A. haemolyticus*) und 5 (*A. junii*) und die deutliche Trennung vom DNA-Gruppen-Paar 7 (*A. johnsonii*) und 8 (*A. lwoffii*) bei ungefähr gleicher Distanz zur DNA-Gruppe 12 (*A. radioresistens*) ist ein Muster, das auch in den Ergebnissen der DNA-DNA-Hybridisierungen angetroffen werden kann.

Die phylogenetische Nähe der Arten zueinander ist bei auf 23S-rRNA-Sequenzen beruhender Darstellung stärker ausgeprägt als in DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen (Abb. D.2).

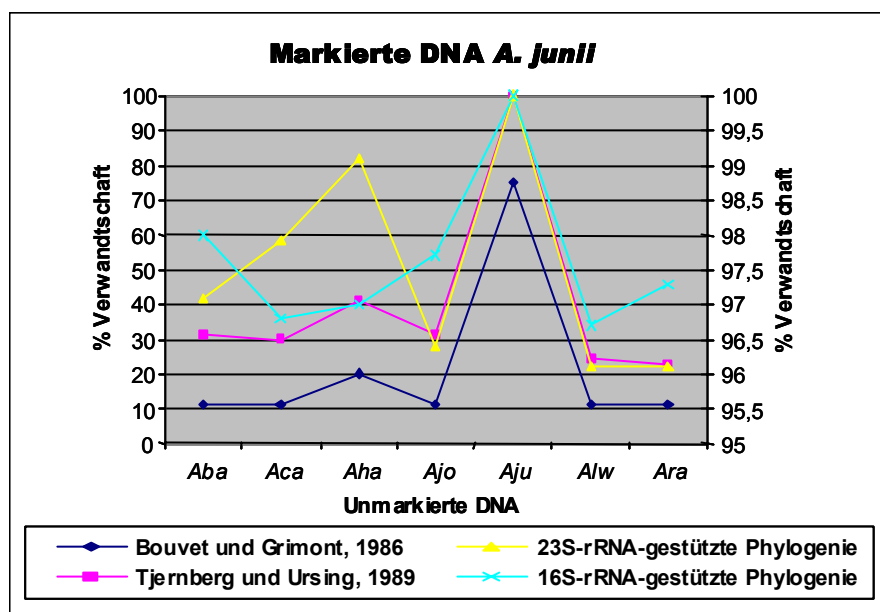


Abbildung D.2: Vergleich von Ergebnissen aus DNA-DNA-Hybridisierungsstudien mit rRNA-gestützten Phylogenien am Beispiel der Verwandtschaftsverhältnisse von *A. junii* mit anderen Arten der Gattung *Acinetobacter*. Obwohl stark überzeichnet, entspricht das Muster der 23S-rRNA-gestützten Phylogenie (gelb) dem der DNA-DNA-Hybridisierungsstudien (ultramarin und magenta), wobei der in allen drei Fällen deutlich erkennbare linke Peak die nahe Verwandtschaft von *A. junii* zu *A. haemolyticus* repräsentiert.

Keine Entsprechung findet sich hingegen in den Werten der 16S-rRNA-gestützten Phylogenie (türkis): Sie bildet die intragenerischen Verwandtschaftsverhältnisse völlig anders ab.

Die vergleichende Analyse entsprechender 16S-rRNA Sequenzdaten unter Zugrundelegung derselben Methoden und Parameter wie bei Erstellung des 23S-

rRNA-gestützten Dendrogramms führt jedoch generell zu wesentlich instabileren Baumtopologien, die überdies deutlich von dem Muster abweichen, das aus 23S-rRNA- und DNA-DNA-Hybridisierungsstudien herzuleiten ist. Die auffälligsten Unterschiede betreffen die relativen Positionen sowohl von *A. baumannii* und *A. calcoaceticus* als auch *A. haemolyticus* und *A. junii*. Bekanntermaßen ist bei 16S-rRNA-Ähnlichkeitswerten von 97% und höher die phylogenetische Aussagekraft dieser Daten eher begrenzt; DNA-DNA-Hybridisierungsdaten stellen in solchen Fällen einen verlässlicheren Ansatz dar (Stackebrandt und Goebel, 1994).

Bemerkenswert sind die vorliegenden Ergebnisse jedoch in dem Sinne, daß der phylogenetische Informationsgehalt und damit die taxonomische Aussagekraft des 23S-rRNA-Moleküls wesentlich größer ist als der seines 16S-Gegenstücks. Es bleibt noch zu ergründen, ob die höhere Verlässlichkeit einer 23S-rRNA-gestützten Phylogenie auch für andere Gruppen als die Gattung *Acinetobacter* gegeben ist.

3. *Acinetobacter baumannii* als Eikelboom-Typ 1863

In Anbetracht der Spezifität von Domäne III-gerichteten DNA-Polynukleotidsonden unter den vorliegenden Hybridisierungsbedingungen (C.2.1) erscheint es erstaunlich, welche morphologische Bandbreite Organismen aufweisen, die mit der Sonde gegen *A. baumannii*, ABADIII, reagieren.

Dieses polymorphe Verhalten könnte seine Ursache jedoch im Nährstoffangebot des Habitats haben: Wurden Zellen des *A. baumannii*-Typstammes ATCC 19606^T in R2A-Flüssigmedium angezogen, zeigten sie, bei einer OD_{600nm} von ungefähr 0,37 geerntet, extremen Polymorphismus. Nicht nur die Länge, sondern auch der Durchmesser der Zellen wies mit Werten von ungefähr 0,8 bis 1,8 µm starke Schwankungen auf. Die Morphologien von in R2A-Medium gewachsenen *A. baumannii*-Kulturen variierten von kleinen kokkoiden Formen bis zu großen Stäbchen. Häufig traten unregelmäßig geformte, keulenförmig aufgetriebene Zellen auf. Sämtliche Zellen in den Kulturen zeigten deutliche Fluoreszenz sowohl mit der DNA-Polynukleotidsonde ABADIII als auch mit der Oligonukleotidsonde ACA23a.

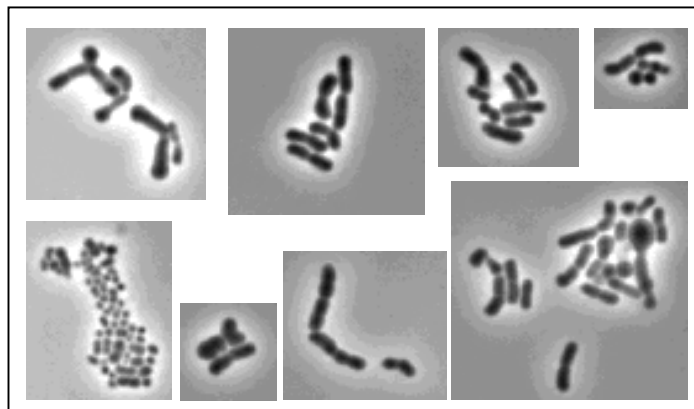


Abbildung D.3: *A. baumannii*, in R2A-Medium angezogen und bei einer OD_{600nm} von ca. 0,37 geerntet (Bild unten links: Ernte bei OD_{600nm} von ca. 0,5; alle Bilder: gleicher Maßstab).

Diese morphologische Vielfalt von *A. baumannii*-Zellen in Kultur, die die Betonung der Bedeutung morphologischer Kriterien in der Identifizierung von Mikroorganismen noch in jüngster Zeit (Cavalier-Smith, 1998) ad absurdum führt, kann die Unterschiede im Erscheinungsbild der ABADIII-Zielzellen in nativem Probenmaterial erklären. Wurden die Zellen in Flüssigmedium 220 angezogen, das im Gegensatz zum R2A-Medium einen wesentlich höheren Gehalt an Nährstoffen aufweist, trat dieses Phänomen nicht auf. Damit ist der starke Pleomorphismus der ABADIII-Zielzellen wohl auf das Nährstoffangebot im Habitat zurückzuführen.

Signifikante Schwankungen in der Zellmorphologie als Antwort auf externe Einflüsse wurden für *A. baumannii* auch von Houang *et al.*, 1998, beschrieben. Bei *A.*

calcoaceticus (Lawson und Tonhazy, 1980) und bei Oberflächen besiedelnden *Acinetobacter* sp. (James *et al.*, 1995) konnten ähnliche Reaktionen beobachtet werden. Bei Anzucht in R2A-Medium und Ernte bei optischen Dichten zwischen 0,1 und 0,4 zeigten auch andere Arten der Gattung Unterschiede in der Morphologie (Abb. C.3). Bei keiner dieser Arten unterschieden sich jedoch die Zellen intraspezifisch so stark wie bei *A. baumannii*. Wurden die Zellen in Medium 220 angezogen, waren die Unterschiede wesentlich geringer.

Die in C.2.3 beschriebenen Ketten von Kokken, die von ABADIII-Zielzellen gebildet wurden, konnten morphologisch als sog. Eikelboom-Typ 1863 (Eikelboom 1975) identifiziert werden (Jenkins *et al.*, 1993).

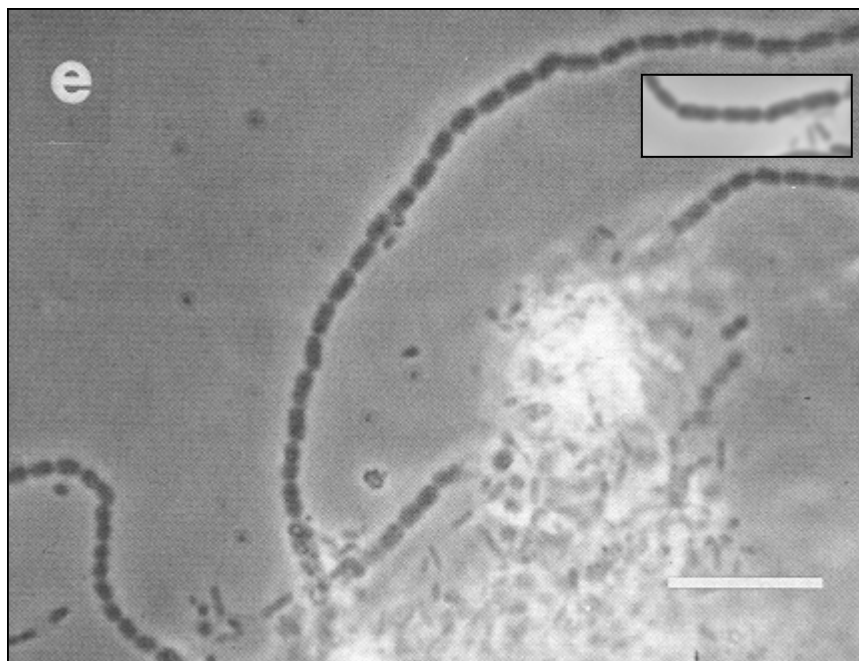


Abbildung D.4: Eikelboom-Typ 1863 (aus Jenkins *et al.*, 1993; Balken 10 μ m). Kleines Bild : Durch DNA-Polynukleotidsonde ABADIII-Cy3 im Rahmen dieser Arbeit als *A. baumannii* identifizierte Zellen im gleichen Maßstab (BSB1; vgl. C.2.4).

Seviour *et al.* (1997) zufolge stellt Typ 1863 keine geschlossene genetische Einheit dar. Vielmehr konstituiert sich diese nach morphologischen Kriterien nicht mehr aufzulösende Gruppe aus mehreren - phylogenetisch nicht mit einander in Verbindung stehenden - Bakterienarten.

Analysen von Isolaten aus australischen Kläranlagen zeigten, daß neben Mitgliedern des *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*-Phylums und einer *Moraxella* sp. zwei Repräsentanten der Gattung *Acinetobacter*, einer davon nahe mit *A. johnsonii*, der andere nahe mit *A. calcoaceticus* verwandt, die charakteristischen morphologischen Merkmale des Eikelboom-Typs 1863 aufweisen können (Seviour *et al.*, 1997). Rossetti *et al.* (1997) identifizierten ein Eikelboom-Typ 1863-Isolat aus einer italienischen Anlage als *A. johnsonii*.

Bisher trat *A. baumannii* bei noch nicht als Angehöriger des Eikelboom-Typ 1863 in Erscheinung. Beacham *et al.* (1990) geben die Häufigkeit dieser Art in Kläranlagen als relativ niedrig im Vergleich zu *A. johnsonii* an. Allerdings konnten bis zu 30% (8 aus 28) von Abwasser-Isolaten, die der Gattung *Acinetobacter* zugeordnet worden waren, durch PCR-Fingerprinting als *A. baumannii* identifiziert werden (Wiedmann-al-Ahmad *et al.*, 1994).

4 Phylogenetische Struktur der Acidobacteria auf Grundlage von 23S-rRNA-Sequenzdaten

Die auf 16S-rRNA-Ebene getroffene Einteilung in Untergruppen nach Ludwig *et al.*, 1997, kann im Fall der Untergruppen a, b und d auch auf 23S-rRNA-Ebene nachvollzogen werden (Abb. D.5).

Eindeutig der Untergruppe c konnte keine der gefundenen Sequenzen zugeordnet werden. Dies kann daran liegen, daß Organismen dieser Gruppe möglicherweise die Zielsequenz des 23S-rRNA-gerichteten Primers HOL189F (C.3.1), mit dem ein Großteil der Genbanken erzeugt wurde, nicht teilen, da für die Konstruktion dieses Oligonukleotids nur Sequenzinformationen von Organismen der Untergruppe a und *H. foetida* zur Verfügung standen. Verbindende Daten für 16- und 23S-rRNA liegen bisher nicht vor.

Eine weitere Möglichkeit läge darin, daß das monophyletische Cluster, das den ZD8-Typ, die Nara-Klone und weitere Sequenzen von Organismen aus Belebtschlamm, dem Reintal und von der Alpspitze enthält und für das keine Referenzsequenzen auf der 16S-rRNA vorliegen, Organismen der Untergruppe c repräsentiert.

Dies ist allerdings nur durch Amplifikation von DNA aus Umweltproben mit einem universalen 16S-rRNA-gerichteten Vorwärtsprimer und einem für diese Gruppe spezifischen Rückwärtsprimer auf der 23S-rRNA zu verifizieren.

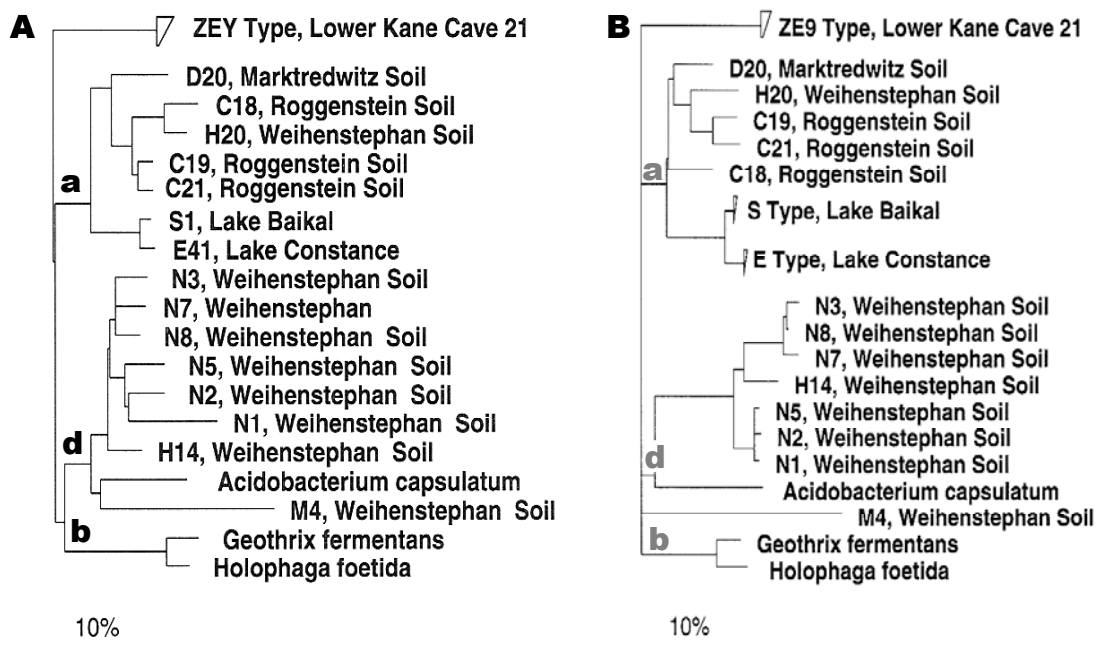


Abbildung D.5: Vergleich von Stammbäumen, die auf 16S-rRNA- (A) und 23S-rRNA-Daten (B) beruhen.

5 Acidobacteria in Boden- Süßwasser- und Sedimentproben

Von Acidobacteria, deren rDNA-Fragmente aus Proben landwirtschaftlich genutzter Böden entweder aufgrund ihrer Dominanz in diesem Ökosystem oder leichten Amplifizierbarkeit (v. Wintzingerode *et al.*, 1997) erhalten werden konnten - ursprünglich war die Amplifikation von DNA aus Organismen der Candidate Divisions WS6, OP5 und OP11 angestrebt (C.3.1) -, lagen sowohl 16S- als auch 23S-rRNA-Sequenzinformationen vor. Sie waren im wesentlichen den Untergruppen a und d zuzuordnen, von denen auf 16S-rRNA-Ebene sehr viele klonierte DNA-Abschnitte in Datenbanken vorliegen (Abb. D.5).

Eine Wasserprobe aus einem Teich eines Shintoschreines in Nara auf der Insel Honshu, JP, enthielt Sequenzen (Genbank ZC), die über die Untergruppen b, d und das Alpspitze-Cluster verstreut sind, was auf eine hohe Diversität der Acidobacteria in diesem Habitat hindeutet.

In Proben alpiner Standorte ist ein breites Spektrum verschiedener phylogenetischer Entwicklungslinien innerhalb der Acidobacteria vertreten. Genbank Z wurde aus einer Sedimentprobe einer halbgefrorenen Lache am Fuß der Schöngänge unterhalb der Alpspitze erhalten. An einem Standort in einer Höhe von 1900 m über NN ist mit einer erhöhten Belastung durch UV-Strahlung zu rechnen. Der Altitude Effect (AE) gibt Aufschluß über den Anstieg atmosphärischer Strahlung mit zunehmender Höhe. Ein Höhengewinn um 1000 m kann eine Zunahme der UV-B-Strahlung um bis zu 19 %, der UV-A-Strahlung um bis zu 11% und der globalen UV-Strahlung um bis zu 9 % bedeuten (Blumthaler *et al.*, 1992), wobei die Exposition des Standortes von Bedeutung ist und der AE nicht nur abhängig von der Bewölkung stark variiert (Neale *et al.*, 2001) sondern auch von der Albedo, dem Rückstrahlvermögen der unmittelbaren Umgebung, beeinflusst wird (Blumthaler *et al.*, 1994). Angesichts der Höhe der Probenahmestelle ist an der Alpspitze von einer höheren Variabilität der Strahlungsintensität und höheren Intensitätsmaxima auszugehen, denen Organismen an derart exponierten Standorten angepasst sein müssen. Für das Habitat, aus dem Genbank Z erzeugt wurde, bedeutet das eine Zunahme der durchschnittlichen UV-B-Strahlung von bis zu ca. 30% sowie der UV-A-Strahlung von bis zu 15% im Vergleich zu Standorten auf ca. 500 m über NN wie beispielsweise Weihenstephan.

Die Probe enthielt DNA-Fragmente von Organismen, die den Untergruppen a (Z5) und d (Z4) zugeordnet werden konnten sowie von Organismen, deren nächste Verwandte in Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried zu finden sind (Z1, 2, 6). Die phylogenetische Zuordnung der zueinander nah verwandten Organismen Z3 und Z8 ist unklar (Alpspitze-Cluster) und variiert je nach Berechnungsverfahren.

Auch eine Sedimentprobe aus dem Oberlauf der Partnach im Reintal, genommen auf Höhe der Reintalangerhütte (1360 m über NN), enthielt Sequenzen (Genbank ZB), die verschiedenen Clustern der Untergruppe d mit nahen Verwandten in landwirtschaftlich genutzten Böden angehören und eine Sequenz, ZB3, die eine hohe phylogenetische Nähe zu Sequenzen des E-Typs aus Sedimenten des Bodensees aufweist.

6 Acidobacteria in der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried

Die untersuchte Anlage war auf der Grundlage von im Oktober 1996 genommenen Proben charakterisiert worden (Juretschko *et al.*, 2002). Analysen von 16S-rRNA-Sequenzen zeigten, daß zum Zeitpunkt der Probenahme Angehörige der Untergruppen a (2 Klone) und c (3 Klone) des Acidobacteria-Phylums in der Anlage auftraten. Im Gegensatz dazu wurden in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Januar 2002 genommenen Proben zwei 23S-rRNA-Sequenzen von Angehörigen der Untergruppe a und 15 Sequenzen von Angehörigen der Untergruppe d, dafür aber keine zuverlässig der Untergruppe c des Phylums zuzuordnenden Klone isoliert.

In situ ließ sich die Abundanz von Angehörigen Acidobacteria-Phylum – detektiert werden konnten lediglich Organismen aus dem ZD7-Cluster – nur näherungsweise schätzen; sie lag unter 1%. Dies ist vergleichbar mit den Abundanzen, die für das Phylum in den Proben von 1996 ermittelt worden waren: Acidobacteria machten 1% der Gesamtzahl *in situ* detektierter Organismen und 5% der 16S-rRNA-Klone aus (Juretschko *et al.*, 2002). In einer industriellen Kläranlagen in Tennessee wurde durch 16S-rRNA-Sequenzanalysen ein Anteil von Angehörigen des Phylums Acidobacteria an der Gesamtzahl identifizierter Organismen von zeitweise annähernd 70% ermittelt (Layton *et al.*, 2000). Dieser Wert erscheint allerdings sehr hoch, wenn man bedenkt, daß im Verlauf derselben Studie zu zwei anderen Entnahmezeitpunkten in Abständen von wenigen Monaten keine Klone aus dem Phylum Acidobacteria in den Genbanken auftraten.

In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Belebtschlamm dominierten nach den Zahlen ihrer Sequenzen Organismen, die von Sequenzen der ZD7- und der ZD8-Gruppe repräsentiert wurden, die Genbank ZD. Auffällig war, daß *in situ* mit spezifischen Sonden lediglich Organismen des ZD7-Typs nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß ZD7-Organismen durch ihre auffälligen Kolonien besonders gut zu detektieren sind. Falls ZD8-Organismen nur vereinzelt vorliegen und damit im komplexen Habitat Belebtschlamm schwer zu detektieren, gleichzeitig aber besonders gut zu amplifizieren sind („PCR bias“; v.

Wintzingerode *et al.*, 1997), sind sie in der Genbank überrepräsentiert und entziehen sich dem *in situ*-Nachweis.

7 Acidobacteria in der Lower Kane Cave, WY

Sequenzen der Genbank ZEY (C.3.2.6) sind identisch mit Klonsequenz LKC22-55 von Sampling Site 22 der Lower Kane Cave (Engel, Lee, persönliche Mitteilung) und auf 16S-rRNA-Ebene einem Cluster der Untergruppe b zugehörig, das die Sequenz iii1-8 aus landwirtschaftlich genutztem Boden des Versuchsgutes Roggenstein enthält (Ludwig *et al.*, 1997). Hohe Sequenzidentität besteht zu einer 16S-rRNA-Sequenz aus der Lower Kane Cave, LKC22-34 (Engel, Lee, persönliche Mitteilung). Weitere ähnliche Sequenzen (Sequenzidentität 96,9%) finden sich in der SJA-36-Gruppe (v. Wintzingerode *et al.*, 1999) aus einem anaeroben, Trichlorbenzol-abbauenden Konsortium in einem Bioreaktor.

Organismen aus der phylogenetischen Umgebung von *G. fermentans* waren in Probe 29 wesentlich häufiger als Zellen des Alpspitze-Clusters. Mit zunehmender Entfernung von der Fissure Spring nahm der Anteil von Zellen aus der *Geothrix*-Gruppe ab, und das Verhältnis verschob sich zugunsten von Organismen des Alpspitze-Clusters. Auch das Verhältnis von Klonen der beiden Gruppen zueinander reflektiert diese Verschiebung (Tab. D.2).

Tabelle D.2: Vergleich von *in situ*-Hybridisierungen und vergleichenden Sequenzanalysen von Genbanken von einzelner Probenahmestellen der Lower Kane Cave, WY.

Sampling Site	Nr.	Abundanz von Zielorganismen ¹⁹		Anteil an Acidobacteria-Sequenzen	
		ALP761	SGB1223	Typ A	Typ B
123 m ²⁰ , white filaments, floating	29	II	V	0/3	3/3
194 m, white filamentous mats	11	II	IV	0/7	7/7
198 m, white filaments	14	IV	I	n.d.	n.d.
198 m, gray fluffy, channel	15	IV	I	n.d.	n.d.
203 m, white mat mix	21	III	I	11/12	1/12

In der Lower Kane Cave konnten mit Sonden für *G. fermentans* Zielzellen detektiert werden, die auch mit Sonden weiterer Spezifität für die Untergruppe b des Phylums Signale gaben (Abb. C.25). 23S-rRNA-Fragmente aus Lower Kane Cave-Proben weisen eine hohe Ähnlichkeit mit der 23S-rRNA-Sequenz von *G. fermentans* auf: Mit

¹⁹ Auftreten der Zielorganismen von I (selten) bis V (abundant)

²⁰ Fissure Spring

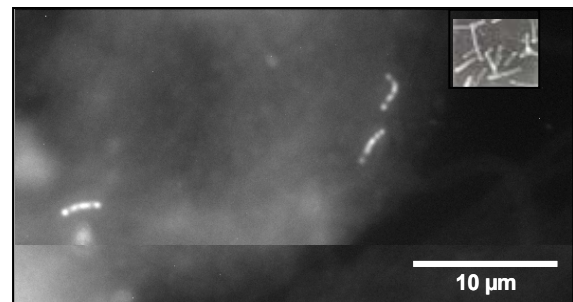
ZH10 besteht eine Sequenzidentität von 98,3%, mit ZF3 von 96,8%. Auf 16S-rRNA-Ebene repräsentiert die klonierte Sequenz LKC22-26 (Engel, Lee, persönliche Mitteilung) einen nahe verwandten Organismus (Sequenzidentität 95,8%).

Das Vorliegen von Eisenphosphatverbindungen (vgl. Abb. C.22a) könnte ein Hinweis auf das Vorliegen größerer Populationen von Fe(III)-reduzierenden Organismen sein. Auch in der unmittelbaren Umgebung von auf Festmedien gewachsenen Kolonien von *G. fermentans* wurde ein Fe(II)-Mineral, mutmaßlich Vivianit $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}]$, festgestellt (Coates *et al.*, 1999).

Da in Probe 29 der Anteil von *G. fermentans* an der Gesamtpopulation der mit SGB-Sonden Signal gebenden Zellen niedrig ist und auch phylogenetisch nächste Nachbarn von *G. fermentans* sowohl in den 16S- als auch 23S-rRNA-Datensätzen nur mit jeweils einer Sequenz vertreten sind, könnten sich unter den Typ B-Acidobacteria der Lower Kane Cave weitere Eisen(III)-Reduzierer befinden.

Da in Höhlen, in denen die eisenhaltigen Pigmente paläolithischer Felsmalereien wahrscheinlich durch Eisen(III)-Reduktion gebleicht werden, Acidobacteria gefunden wurden, wird eine Rolle dieser Bakterien in der Zersetzung der Farben diskutiert (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002a, b). Die im Verlauf dieser Untersuchungen gefundenen Acidobacteria sind jedoch nach den 16S-rRNA-Daten wesentlich weniger nah mit *G. fermentans* verwandt als die Organismen der Untergruppe b, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Lower Kane Cave nachgewiesen werden konnte (Sequenzähnlichkeit von *G. fermentans* mit ZH10 auf 23S-rRNA-Ebene 97,9%, mit Organismus AJ42118 aus der Cueva de Tito Bustillo auf 16S-rRNA-Ebene 86,5%).

Abbildung D.6: Größenvergleich von Zielzellen der Sonde GFER2787-Cy3 in Probe 29 der Lower Kane Cave (vgl. C.4.2.3) mit Zellen aus einer Reinkultur von *G. fermentans* H-5^T (kleines Bild, gleicher Maßstab; aus: Coates *et al.*, 1999).



Die weißen Matten der Lower Kane Cave bestehen zu einem großen Teil aus makroskopisch sichtbaren, weißen Fäden. Diese Fäden sind ihrerseits aus Filamenten mit ca. 1 µm Durchmesser zusammengesetzt, zwischen denen große Mengen von Acidobacteria detektiert werden können (C.4.2.1). Mit der Oligonukleotidsonde LKC2 (Engel *et al.*, in Vorbereitung) sind diese Filamente als Epsilonproteobacteria zu identifizieren (Abb. D.6). Damit stellt sich die Frage, ob eine Beziehung zwischen den beiden Gruppen besteht, wie es beispielsweise für

Acidobacteria der Untergruppe a der Fall zu sein scheint, die nur in Gesellschaft von Alphaproteobacteria angereichert werden können (Spring *et al.*, 2000).

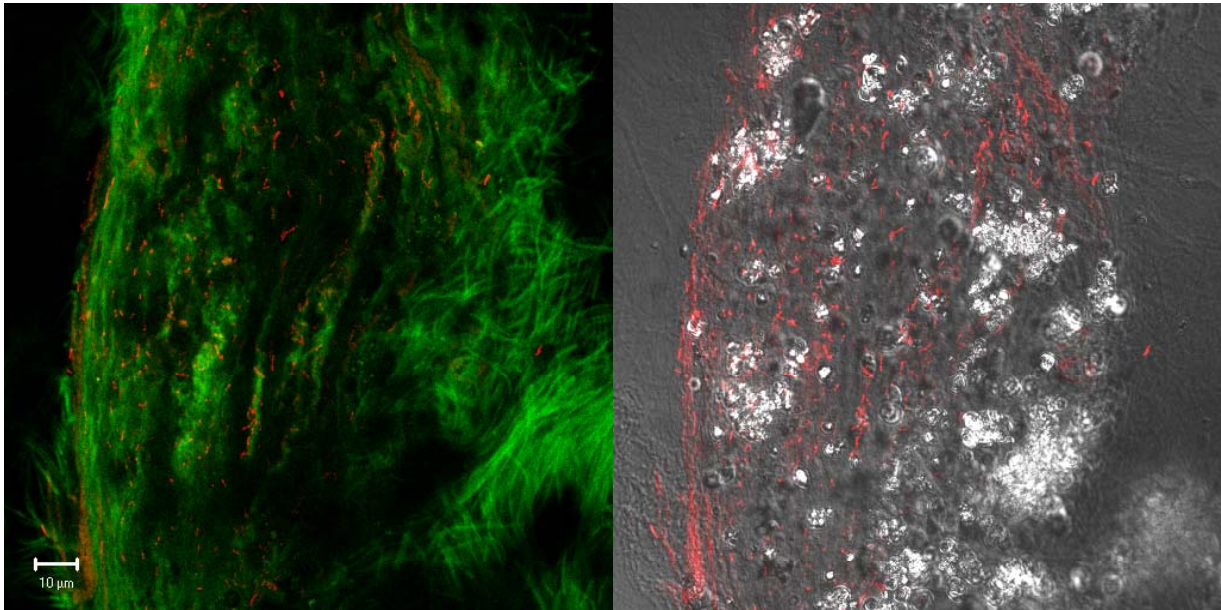


Abbildung D.7: Zusammensetzung eines Acidobacteria enthaltenden Fadens aus Epsilonproteobacteria-Filamenten. Doppelhybridisierungen PFA-fixierten Probenmaterials von Entnahmestelle 29 mit Cy3-markierter Oligonukleotidsonde ALP16I (C.4.2.2) und der fluoresceinmarkierten Oligonukleotidsonde LKC2, spezifisch für eine Untergruppe der Epsilonproteobacteria in der Lower Kane Cave (Engel *et al.*, in Vorbereitung), aufgenommen am konfokalen Laserscanningmikroskop. Links: Epifluoreszenz. Rechts: Phasenkontrast mit Cy3-Signalen.

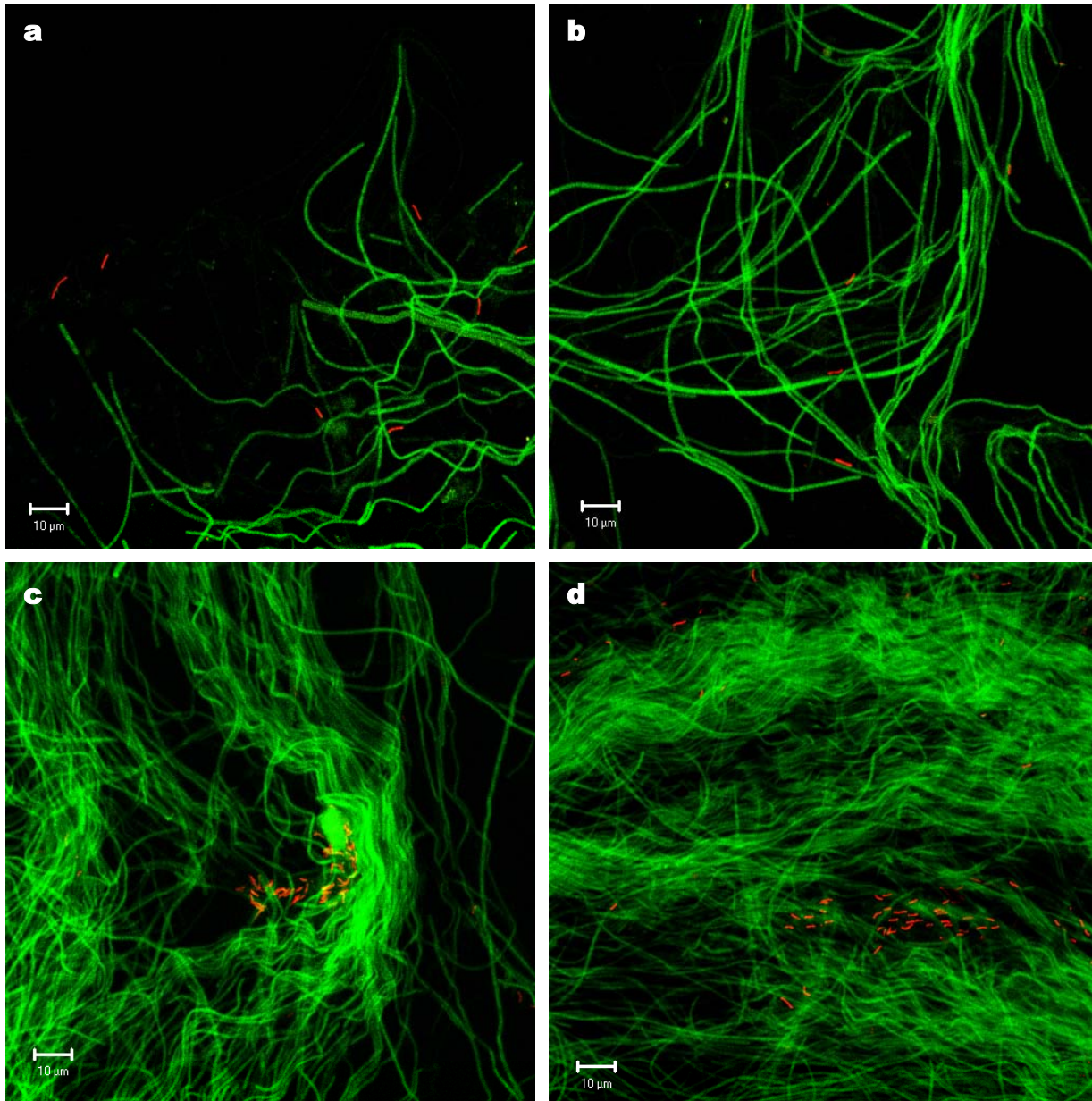


Abbildung D.8: Doppelhybridisierungen von PFA-fixiertem Probenmaterial von Entnahmestelle 29 der Lower Kane Cave mit der fluoresceinmarkierten Oligonukleotidsonde LKC2, spezifisch für eine Untergruppe der Epsilonproteobacteria in der Lower Kane Cave (Engel *et al.*, in Vorbereitung), und ALP761-Cy3 (**a, b**) bzw. ALP16I-Cy3 (**c, d**), aufgenommen am konfokalen Laserscanningmikroskop.

8 Rückhaltung von Zielzellen in Mikrotiterplatten

Um die Möglichkeit der Anreicherung von Zielzellen mit DNA-Polynukleotidsonden zu untersuchen, wurden Mikrotiterplatten der Typen NucleoLink und TopYield auf ihre Eignung hierfür geprüft (C.2.4). *A. baumannii*, eine Art, die mit fluoreszenzmarkierten DNA-Polynukleotidsonden deutlich ausgeprägte Halos bildete (C.2.1), diente als Testorganismus.

Kontrolliert wurde das Vorliegen gefischter Zielzellen durch eine spezifische Amplifikation. Die Stärke der erhaltenen Banden schwankte zwischen den Parallelansätzen stark (Abb. C.6). In Mikrotiterstreifen vom Typ NucleoLink konnten in allen Kavitäten Zielzellen nachgewiesen werden; damit fand sowohl in der ersten als auch in der zweiten Hybridisierung in der Platte eine Anreicherung statt (Abb. C.6.a). Beim Modell TopYield hingegen war die Bindung der hybridisierten Zellen an die komplementären immobilisierten Sondenmoleküle dagegen auf den ersten Hybridisierungsschritt in der Platte beschränkt (Abb. C.6.b).

Die hohe Variabilität der Ergebnisse aus den Parallelansätzen wie auch eine geringe Reproduzierbarkeit der Versuche deuten darauf hin, daß der Anreicherungsprozeß sehr stark von äußeren Faktoren beeinflusst wird. Da die Kavitäten der Platten seriell durchgespült werden, ist anzunehmen, daß inhibitorische Einflüsse durch Rückstände von Hybridisierungsreagenzien die PCR zur Detektion der Zellen in Parallelansätzen in jeweils ähnlicher Weise beeinflussen und die Ursachen für die beschriebenen Schwankungen in den Hybridisierungen selbst zu suchen sind.

Das Verfahren ermöglichte prinzipiell das Zellfischen mit DNA-Polynukleotidsonden. Wurden Bodenproben mit Zielzellen versetzt, war jedoch die Ausbeute verringert. Ob die Methode damit für Habitate wie Bakterienmatten, in denen *Acidobacteria*, die allerdings keine Halos bildeten, detektiert werden konnten, anwendbar wäre, erscheint angesichts des hohen Anteils an filamentösen Strukturen (C.4.2.1, D.7) und der zähen Matrices (C.4.2.4) in diesen Materialien fraglich. In Belebtschlamm, dessen Flocken durch Ultraschallbehandlung und Filtration soweit disintegriert werden können, daß Durchflußcytometrie möglich ist (C.4.1.6), erscheint der Einsatz dieser Methode für Zielorganismen, die anders als die in diesem Habitat untersuchten *Acidobacteria* des ZD7-Typs (C.4.1.3, C.4.1.4) Halos bilden, sinnvoll.

9 Spezifische Isolierung von Acidobacteria

Organismen des Acidobacteria-Phylums konnten durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Polynukleotidsonden in Belebtschlamm (C.4.1.3) und weißen filamentösen Matten aus der Lower Kane Cave (C.4.2.4) nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu in Kultur vorliegenden Zellen des Typstammes von *Acidobacterium capsulatum* gaben die in Umweltproben detektierten Zellen keine Halosignale.

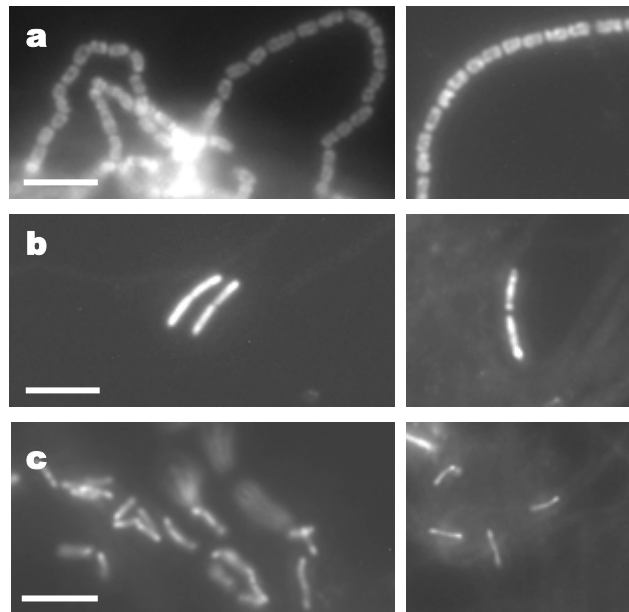


Abbildung D.8: Übersicht über im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in situ* mit Oligo- und Polynukleotidsonden detektierte nicht kultivierbare Acidobacteria: ZD7-Typ in Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried (a); Typ A (b) und Typ B (c) in weißen filamentösen Matten der Lower Kane Cave, Wyoming. Links: Hybridisierungen mit spezifischer Oligonukleotidsonden. Rechts: Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden. Balken 5 µm.

Es erscheint naheliegend, dieses Phänomen auf die Beschaffenheit des Probenmaterials an sich oder mögliche Unzulänglichkeiten der Fixierung zurückzuführen. Da jedoch mit der DNA-Polynukleotidsonde ABADIII-Cy3 gegen *A. baumannii* in nativem Belebtschlamm der Kläranlage Großlappen bei München sehr ausgeprägte Halos erzielt werden konnten (C.2.3) und im Kraftisrieder Belebtschlamm, in dem die nicht-halobildenden Zellen der ZD7-Gruppe vorlagen, mit einer Sonde gegen *Azoarcus evansii* halobildende Zielzellen detektiert wurden, muß das Ausbleiben des Haloeffekts andere Ursachen haben.

Obwohl die Ausbildung von Halos bei Bakterien verschiedener Phyla beobachtet werden kann, scheint sie bei Acidobacteria generell seltener zu sein: Nicht-halobildende Zellen der ZD7-Gruppe in Kraftisried-Belebtschlamm weisen eine wesentlich größere phylogenetische Nähe zum halobildenden Typstamm von *A.*

capsulatum auf als zu den nicht-halobildenden Organismen des Typs A und B in der Lower Kane Cave (C.3.2).

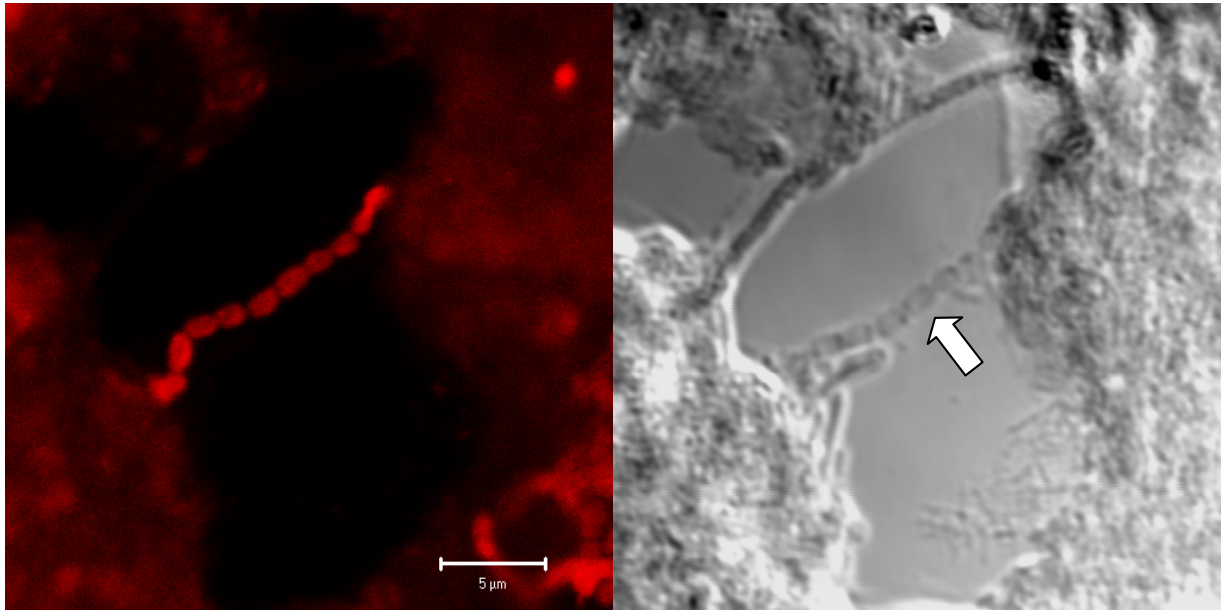


Abbildung D.9: Hybridisierung von PFA-fixiertem Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried mit Cy3-markierter Polynukleotidsonde ZD7DIII, aufgenommen am konfokalen Laserscanningmikroskop. Links: Epifluoreszenz. Rechts: Phasenkontrast.

Plausibler wirkt ein Einfluß des Zustandes der Zellen auf die Ausbildung eines Halos: Wurden Zellen aus der ZD7-Gruppe, die keine Halos bildeten, am konfokalen Laserscanningmikroskop im Phasenkontrast untersucht, erwiesen sie sich als schwach lichtbrechend (vgl. Abb.D.9).

Ein ähnliches Phänomen war bei *Acinetobacter haemolyticus* zu beobachten. Wurde diese Art in R2A-Medium angezogen, waren die spindelförmigen Zellen ebenfalls schwach lichtbrechend (Abb C.3), was auf einen Zustand der Zellen hindeuten könnte, der einen vollständigen Eintritt von Polynukleotidsonden in die Zelle begünstigt wird. Im Zellinneren war die Fluoreszenz gleichmäßig verteilt und der Haloeffekt zugleich schwach ausgebildet.

Bei *A. lwoffii* hingegen schien in der logarithmischen Wachstumsphase in R2A-Medium die Zellhülle extrem verdichtet zu sein: Die Zellen waren im Phasenkontrast stark lichtbrechend, und in Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden der *A. haemolyticus-lwoffii-radioresistens*-Gruppe (C. 1.3) waren die Signale sehr schwach und fast ausschließlich um die Zelle herum konzentriert (Abb. C.3). Innerhalb des im Phasenkontrast festgestellten Zellumrisses war nur relativ schwache Fluoreszenz feststellbar.

Dies könnte ein Hinweis sein, daß die Durchlässigkeit der Zellhülle in umgekehrtem Verhältnis zur Ausbildung eines Halos steht. Auch eine Permeabilisierung der Zellhülle durch Vorbehandlung mit Lysozym verhindert die Ausbildung eines Halos

und führt zur gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle (Trebesius *et al.*, 1994). Bei Zellen des Typs A und B aus der Lower Kane Cave, die ebenfalls keine Halos bildeten, konnte allerdings keine Auffälligkeiten in der Lichtbrechung festgestellt werden.

Da die Ursache für das Phänomen nicht bei den Polynukleotidsonden zu liegen scheint – Halos konnten bei den fraglichen Zielzellen weder mit ca. 0,3 kb langen Domäne III-gerichteten DNA-Polynukleotidsonden und RNA-Transkriptsonden (C.4.1.3) noch mit ca. 1,4 kb langen DNA-Polynukleotidsonden (C.4.1.4) noch mit Oligo-Oligonukleotiden (C.4.1.5) erzeugt werden – ist ein Einfluß des Wachstumszustandes über die Permeabilität der Zellwand auf die Halobildung nicht auszuschließen.

Da eine Anreicherung von Zielorganismen durch Zelfischen das extrazelluläre Vorliegen von Sondenmolekülen erfordert (Stoffels *et al.*, 1999), mussten für Organismen des Acidobacteria-Phylums alternative Methoden eingesetzt werden:

In Belebtschlamm der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried war die Isolierung von Zielzellen der ZD7-Gruppe mittels Durchflußcytometrie nach vorheriger Sonifikation und Filtration des Probenmaterials möglich (C.4.1.6). Diese Methode war in Proben von weißen filamentösen Matten in der Lower Kane Cave nicht einsetzbar, daher wurden die Zielzellen des Typs A und B aus dieser Probe durch Mikromanipulation isoliert (C.4.2.5). Beide Verfahren eignen sich für die Anreicherung von Zielzellen zum Zweck weiterer DNA-Untersuchungen. Die durchflußcytometrisch angereicherten Zielzellen liegen allerdings in wesentlich höheren Mengen vor als die mikromanipulierten Zellen, was die PCR aus den angereicherten Zellen erleichtert. Während in den Versuchen mit ZD7-Organismen ungefähr 15000 Zielzellen in ein Reaktionsgefäß sortiert wurden, bleibt als einziges Verfahren zur Untersuchung einzelner mikromanipulierter Zellen die Single Cell PCR. Sie hat allerdings den Nachteil großer Störanfälligkeit und erfordert eine exakte, auf das jeweilige Untersuchungsmaterial ausgerichtete Optimierung (Fröhlich und König, 1999).

Trotz dieser Schwierigkeiten bieten die beiden Methoden eine Möglichkeit des Zugriffs auf das Erbmateriale bisher unkultivierbarer Mikroorganismen. Weitere Untersuchungen können zeigen, ob das Phänomen der Nichtausbildung von Halos auch von anderen mikrobiellen Taxa geteilt wird.

E Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Angehörigen des Phylums Acidobacteria durch Analyse von Sequenzen aus der Umwelt und durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Umweltproben sowie die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Vertretern dieses Phylums. Die ursprüngliche Strategie folgte der Anreicherung durch Polynukleotidsonden-gestütztes Zelfischen, das die Ausbildung eines sogenannten Halosignales um die Zielzelle erfordert. Um Hybridisierungen mit Polynukleotidsonden in komplexem Probenmaterial zu optimieren, wurden DNA- anstelle der klassischen RNA-Polynukleotidsonden eingesetzt, was eine Steigerung der Hybridisierungsqualität zur Folge hatte und zur Ausbildung der gewünschten Halos, ähnlich wie bei Transkriptsonden, führte. An den sieben zum Versuchszeitpunkt gültig beschriebenen Typstämmen der Gattung *Acinetobacter* wurde die Spezifität von DNA-Polynukleotidsonden evaluiert und die Position der maßgeblichen Zielregion aufgeklärt. Im Verlauf dieser Untersuchungen stellten sich tiefgreifende Diskrepanzen zwischen Hybridisierungsergebnissen mit 23S-rRNA-gerichteten Polynukleotidsonden und einer von 16S-rRNA-Daten abgeleiteten Phylogenie der Gattung *Acinetobacter* heraus, die eine Sequenzierung der 23S-rRNA der untersuchten Arten erforderten. Eine auf 23S-rRNA-Sequenzinformationen basierende Phylogenie der Gattung *Acinetobacter* stand im Einklang einerseits mit den gefundenen Polynukleotidsonden-Hybridisierungsergebnissen und andererseits mit Ergebnissen früherer Studien, die beispielsweise auf DNA-DNA-Hybridisierung beruhten.

Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten 23S-rRNA-Vollsequenzen der Arten *Geothrix fermentans* und *Acidobacterium capsulatum* sowie Teilsequenzen unkultivierter Acidobacteria aus verschiedenen Habitaten konnten Oligonukleotidsonden hierarchisch überlappender Spezifität für dieses Phylum und einzelne Teilgruppen entwickelt werden, die die Detektion der entsprechenden nur durch Klonsequenzen bekannten Organismen in fixierten Umweltproben ermöglichten. Wurden diese Zellen jedoch mit DNA-Polynukleotidsonden, die durch Amplifikation von Plasmid-DNA der entsprechenden Klone hergestellt worden waren, hybridisiert, blieb die Bildung von Halos aus. Auch durch eine Vervielfachung der Sondenlänge konnte die Entstehung von Halos nicht herbeigeführt werden. Dieses Phänomen erforderte den Einsatz anderer Methoden zur Isolierung von Einzelzellen aus komplexen Proben: Je nach Beschaffenheit des Probenmaterials wurden Durchflußcytometrie oder Mikromanipulation angewendet. Dies ermöglichte die Isolierung von durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung identifizierten Zielorganismen aus dem Phylum Acidobacteria.

F Literatur

Abed, R.M.M., Safi, N.M.D., Köster, J., de Beer, D., El-Nahhal, N., Rullkötter, J. and F. Garcia-Pichel: Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1674-1683 (2002).

Amann, R.: In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.6**: 1-15 (1995).

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and D.A. Stahl: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925 (1990a).

Amann, R.I., Krumholz, L. and D.A. Stahl: Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic and Environmental Studies in Microbiology. *J. Bacteriol.* **172**(2): 762-770 (1990b).

Amann, R.I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L. and D.A. Stahl: Diversity Among Fibrobacter Isolates: Towards a Phylogenetic Classification. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 23-31 (1992).

Amann, R.I. and W. Ludwig: Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 555-565 (2000).

Amann, R.I., Ludwig, W. and K.H. Schleifer: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169 (1995).

Bak, F., Finster, K. and F. Rothfuß: Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**: 529-534 (1992).

- Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M. and N.R. Pace:** Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *PNAS* 91: 1609-1613 (1994).
- Barns, S.M., Takala, S.L. and C.R. Kuske:** Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom *Acidobacterium* in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1731-1737 (1999).
- Baroin-Tourancheau, A., Delgado, P., Perasso, R. and A. Adoutte:** A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *PNAS* **89**: 9764-9768 (1992).
- Baumann, P.:** Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *J. Bacteriol.* **96**(1): 39-42 (1968).
- Beacham, A.M., Seviour, R.J., Lindrea K.C. and I. Livingston:** Genospecies diversity of *Acinetobacter* isolates obtained from a biological nutrient removal pilot plant of a modified UCT configuration. *Water Res.* **24**: 23-29 (1990).
- Behr, T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D., Frahm, E., Obst, U., Schleifer, K.-H., Nießner, R. and W. Ludwig:** A Nested Array of rRNA Targeted Probes for the Detection and Identification of Enterococci by Reverse Hybridization. *System. Appl. Microbiol.* **23**: 563-572 (2000).
- Bergogne-Bérézin, E. and K.J. Towner:** *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**(2): 148-165 (1996).
- Blumthaler, M., Ambach, W. and W. Rehwald:** Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two Alpine stations at different altitudes. *Theor. Appl. Climatol.* **46**: 39-44 (1992).
- Blumthaler, M., Webb, R., Seckmeyer, G., Bais, A.F., Huber, M. and B. Mayer:** Simultaneous spectroradiometry: a study of solar UV irradiance at two altitudes. *Geophys. Res. Lett.* **21**: 2805-2808 (1994).
- Bouvet, B.J.M. and P.A.D. Grimont:** Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii*, sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus*, sp. nov., *Acinetobacter johnsonii*, sp. nov., and *Acinetobacter junii*, sp. nov. and

Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**(2): 228-240 (1986).

Bouvet, B.J.M. and S. Jeanjean: Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* **140**: 291-299 (1989).

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and H.F. Noller: Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**: 107-127 (1981).

Carr, E., Eason, H., Feng, S., Hoogenraad, A., Croome, R., Soddell, J., Lindrea, K. and R. Seviour: RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorus microbiologically. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 309-319 (2001).

Cavalier-Smith, T.: A revised six-kingdom of life. *Biol. Rev.* **73**: 203-266 (1998).

Chityothin, O., Sethabutr, O., Echevarria, P., Taylor, D.N., Vongsthongri, U. and S. Tharavanij: Detection of Heat-Stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Hybridization with an RNA Transcript Probe. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1572-1573 (1987).

Clark, J.M. and R.L. Switzer: Experimental Biochemistry. 2nd ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco (1977).

Coates, J.D., Ellis, D., Gaw, C.W. and D.R. Lovley: *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1615-1622 (1999).

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and M. Wagner: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444 (1999).

Dijkshoorn, L., van Harselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P.J.M. and M. Vaneechoutte: Evaluation of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of *Acinetobacter* Genomic Species. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 33-39 (1998).

- DeLong, E.F., Wickham, G.S. and N.R. Pace:** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* **243**: 1360-1363 (1989).
- DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh and C.M. Preston:** Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5554-5563 (1999).
- DeLong, E.F. and N.R. Pace:** Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Syst. Biol.* **50**(4): 470-478 (2001).
- de Rijk, P., Van de Peer, Y., Van den Broeck, I. and R. de Wachter:** Evolution according to Large Ribosomal Subunit RNA. *J. Mol. Evol.* **41**: 366-375 (1995).
- de Rijk, P., Wuyts, J., van de Peer, Y., Winkelmans, T. and R. de Wachter:** The European Large Subunit Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* **28**: 177-178 (2000).
- di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F. and R. Fani:** Molecular characterization of an *n*-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res. Microbiol.* **148**: 237-249 (1997).
- Dijkshoorn, L. and J. van der Toorn:** *Acinetobacter* Species: Which Do We Mean? *Clin. Infect. Dis.* **15**: 748-749 (1992).
- Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K. and N.R. Pace:** Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3896-3877 (1998).
- Dojka, M.A., Harris, J.K. and N.R. Pace:** Expanding the Known Diversity and Environmental Distribution of an Uncultured Phylogenetic Division of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1617-1621 (2000).
- Ebringer, A., Pirt, J., Wilson, C., Cunningham, P., Thorpe, C. and C. Ettelaie:** Bovine Spongiform Encephalopathy: Is It an Autoimmune Disease Due to Bacteria Showing Molecular Mimicry with Brain Antigens? *Environ. Health Perspect.* **105**: 1172-1174 (1997).

- Ebringer, A., Pirt, J., Wilson, C., Thorpe, C., Tiwana, H., Cunningham, P. and C. Ettelaie:** Bovine Spongiform Encephalopathy: Comparison between the 'Prion' Hypothesis and the Autoimmune Theory. *J. Nutrition. Environ. Med.* **8:** 265-276 (1998).
- Eikelboom, D.H.:** Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Res.* **9:** 365-388 (1975).
- Engel, A.S., Bennett, P.C. and L.A. Stern:** Mineralogic and Geochemical Consequences from Microbial Habitat Modification in Karst Systems: Examples from the Kane Caves, Wyoming. AGU Meeting, San Francisco, CA (2000).
- Engel, A.S., Lee, N., Porter, M.L., Stern, L., Bennett, P.C. and M. Wagner:** Characterization of ϵ -Proteobacteria from Sulfidic Cave Springs Using Fluorescence *In Situ* Hybridization (in preparation).
- Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W.M. and A.D.L. Akkermans:** Spatial Distribution of 16S rRNA Levels from Uncultured Acidobacteria in Soil. *Letf. Appl. Microbiol.* **31:** 118-122 (2000).
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and P.J. Jurtshuk:** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42:** 166-170 (1992).
- Fröhlich, J. and H. König:** Rapid Isolation of Single Microbial Cells from Mixed Natural and Laboratory Populations with the Aid of a Micromanipulator. *Syst. Appl. Microbiol.* **22:** 249-257 (1999).
- Fröhlich, J. and H. König:** New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol. Rev.* **24:** 567-572 (2000).
- Fry, J.:** Bacterial diversity and 'unculturables'. *Microbiology today* **27:** 186-188 (2000).
- Fuchs, B. M.:** Entwicklung von durchflußcytometrischen Methoden zur Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften des Wassers. PhD Thesis, Technical University Munich (1999).

- Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwig, K. and R. Amann:** *In Situ* Accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 961-968 (2001).
- Gerner-Smidt, P. and W. Frederiksen:** *Acinetobacter* in Denmark: I. Taxonomy, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of 112 clinical strains. *APMIS* **101**: 815-825 (1993).
- Gerner-Smidt, P. and I. Tjernberg:** *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* **101**: 826-832 (1993).
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and K.G. Field:** Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63 (1990).
- Grimont, P.A.D.:** Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* **34**: 541-546 (1988).
- Hahn, D. and J. Zeyer:** *In situ* detection of bacteria in the environment. In: Ritz, K., Dighton, J. and K.E. Giller (eds.): *Beyond the Biomass*: 137-148. Wiley-Sayce, Chichester (1994).
- Henriksen, S.D.:** *Moraxella*, *Acinetobacter* and the *Mimeae*. *Bact. Rev.* **37**(4): 522-561 (1973).
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich A.B., Wagner, M., Hacker, J. and B.S. Moore:** Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4431-4440 (2002).
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I. and K. Smalla:** Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1045-1049 (1999).
- Hiraishi, A., Kishimoto, N., Kosako, Y., Wakao, N. and T. Tano:** Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 91-94 (1995).
- Holmes, A.J., Bowyer, J., Holley, M.P., O'Donoghue, M., Montgomery, M. and M.R. Gillings:** Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision

- of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 111-120 (2000).
- Hose, L.D., Palmer, A.N., Palmer, M.V., Northup, D.E., Boston, P.J. and H.R. DuChene:** Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chem. Geol.* **169**: 399-423 (2000).
- Houang, E.T.S., Sormunen, R.T., Lai, L., Chang, C.Y. and A.S.Y. Leong:** Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter Iwoffii*. *J. Clin. Pathol.* **51**: 786-788 (1998).
- Huber, R., Eder, W., Heldwein, H., Wanner, G., Huber, H., Rachel, R. and K.O. Stetter:** *Thermocrinis ruber* gen. nov, sp. nov., a Pink-Filament-Forming Hyperthermophilic Bacterium Isolated from Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3576-3583 (1998).
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. and N.R. Pace:** Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774 (1998a).
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. and N.R. Pace:** Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *J. Bacteriol.* **180**: 366-376 (1998b).
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A. and L. Blackall:** Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain *Bacteria* with No Known Pure-Culture Representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 411-419 (2001).
- Hunter-Cevera, J.:** The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 278-285 (1998).
- Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P. and W. Liesack:** Phylogenetic Relationship of the Twenty-One DNA Groups of the Genus *Acinetobacter* as Revealed by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**(3): 837-841 (1997).
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. and M. Sait:** Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2391-2396 (2002).

- Jenkins, D., Richard, M.G. and G.T. Daigger:** Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. 2nd. Ed. Lewis Publishers, Chelsea, MI (1993).
- Jeanthon, C.:** Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 117-133 (2000).
- Johnson, J.L., Anderson, R.S., and E.J. Ordal:** Nucleic Acid Homologies Among Oxidase-Negative *Moraxella* Species. *J. Bacteriol.* **101**(2): 568-573 (1970).
- Jukes, T.H. and C.R. Cantor:** Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (ed.): *Mammalian protein metabolism III*: 21-132. Academic Press, London (1969).
- Juni, E.:** Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* **112**: 917-931 (1972).
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. and M. Wagner:** The Microbial Community Composition of a Nitrifying/Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 84-99 (2002).
- Kaeberlein, T., Lewis, K. and S.S. Epstein:** Isolating „Uncultivable“ Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* **296**: 1127-1129 (2002).
- Karner, M., DeLong, E.F. and D.M. Karl:** Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**: 507-509 (2001).
- Kämpfer, P., Tjernberg, I. and J. Ursing:** Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 259-268 (1993).
- Kishimoto, N., Kosako, Y. and T. Tano:** *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic, chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* **22**: 1-7 (1991).
- Knight, I.T.:** Molecular Genetic Methods for Detection and Identification of Viable but Nonculturable Microorganisms. In: Colwell, R.R. and D.J. Grimes (eds.): *Nonculturable Microorganisms in the Environment*: 77-85. ASM Press, Washington, D.C. (2000).

- Kreft, J.U. and B. Schink:** Demethylation and degradation of phenylmethylesters by the sulfide-methylating homoacetogenic bacterium strain TMBS4, *Arch. Microbiol.* **159**: 308-315 (1993).
- Kuske, C.R., Barns, S.M. and J.D. Busch:** Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3614-3621 (1997).
- Laurion, I., Ventura, M., Catalan, J., Psenner, R. and R. Sommaruga:** Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1274-1288 (2000).
- Lawson, E.N. and T.E. Tonhazy:** Changes in Morphology and Phosphate-Uptake Patterns of *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Water S.A.* **6**: 105-112 (1980).
- Layton, A.C., Karanth, P.N., Lajoie, C.A., Meyers, A.J., Gregory, I.R., Stapleton, R.D., Taylor, D.E. and G.S. Saylor:** Quantification of *Hyphomicrobium* Poulations in Activated Sludge from an Industrial Wastewater Treatment System as Determined by 16S rRNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1167-1174 (2000).
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, U. and E. Stackebrandt:** *Holophaga foetida* gen. nov., spec. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **162**: 85-90 (1994).
- Lonergan, D.J., Jenter, H.L., Coates, J.D., Philips, E.J.P., Schmidt, T.M. and D.R. Lovley:** Phylogenetic Analysis of Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacteria. *J. Bacteriol.* **178**(8): 2402-2408 (1996).
- Ludwig, W., Bauer, S.H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I. Spring S., Hartmann, A. and K.-H. Schleifer:** Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 181-190 (1997).
- Ludwig, W., Dorn, S., Springer, N., Kirchhof, G. and K.-H. Schleifer:** PCR-based preparation of 23S rRNA targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3236-3244 (1994).
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. und K.-H. Schleifer:** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568 (1998).

- Ludwig, W. und O. Strunk:** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/arb.ps> (1996).
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M. and C.R. Woese:** A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **27**: 171-173 (1999).
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and K.-H. Schleifer:** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 563-600 (1992).
- Marmur, J.:** A Procedure for the Isolation of Desoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218 (1961).
- Mino, T.:** Microbial Selection of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Activated Sludge Wastewater Treatment Processes for Enhanced Biological Phosphate Removal. *Biochemistry (Moscow)* **65**: 341-348 (2000).
- Mino, T., Van Loosdrecht, M.C.M. and J.J. Heijnen:** Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.* **32**: 3193-3207 (1998).
- Neale, P.N., Bossard, P., Huot, Y. and R. Sommaruga:** Incident an in situ irradiance in Lakes Cadagno and Lucerne: A comparison of methods and models. *Aquat. Sci.* **63**: 250-264 (2001).
- Nemec, A., Dijkshoorn, L. and P. Ječek:** Recognition of Two Novel Phenons of the Genus *Acinetobacter* among Non-Glucose-Acidifying Isolates from Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **38**(11): 3937-3941 (2000).
- Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vanechoutte, M., van der Reijden, T.J.K. and L. Dijkshoorn:** *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1891-1899 (2001).
- Newman, D.K. and J.F. Banfield:** Geomicrobiology: How Molecular-Scale Interactions Underpin Biogeochemical Systems. *Science* **296**: 1071-1077 (2002).

- Northup, D.E. and K.H. Lavoie:** Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiol. J.* **18**: 199-222 (2001).
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. and R. Amann:** Comparison of Fluorescently Labeled Oligonucleotide and Polynucleotide Probes for the Detection of Pelagic Marine Bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 661-667 (2002).
- Petroni, G., Spring, S., Schleifer, K.-H., Verni, F. and G. Rosati:** Defensive extrusive ectosymbionts of *Euplotidium* (Ciliophora) that contain microtubule-like structures are bacteria related to *Verrucomicrobia*. *PNAS* **97**: 1813-1817 (2000).
- Prusiner, S.B.:** Prions. Nobel lecture. *PNAS* **95**: 13363-13383 (1998).
- Rainey, F.A., Lang, E. and E. Stackebrandt:** The phylogenetic structure of the genus *Acinetobacter*. *FEMS Microbiology Letters* **124**: 349-354 (1994).
- Reasoner, D.J. and E.E. Geldreich:** A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1-7 (1985).
- Richter, L. and W. Ludwig:** RNA termini accessible now: Random and limited PCR (previously unreleased).
- Roller, C., Ludwig, W. and K.-H. Schleifer:** Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1167-1175 (1992).
- Rondon, M.R., Goodman, R.M. and J. Handelsman:** The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *TIBTECH* **17**: 403-409 (1999).
- Rosselló-Mora, R. and R. Amann:** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67 (2001).
- Rossetti, S., Hildisch, D., Christensson, C., Del Dot, T., Blackall, L.L. and V. Tandoi:** Isolation and identification of an Eikelboom Type 1863 strain as *Acinetobacter johnsonii*. *Water Res.* **31**: 657-660 (1997).
- Rudant, E., Bouvet, P., Courvalin, P. and T. Lambert:** Phylogenetic Analysis of Proteolytic *Acinetobacter* Strains Based on the Sequence of Genes Encoding Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferases. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 59-67 (1999).

- Saitou, N. and M. Nei:** The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425 (1987).
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, R. and C. Rölleke:** Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Letters* **211**: 7-11 (2002a).
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, R. and C. Rölleke:** Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environ. Microbiol.* **4**: 392-400 (2002b).
- Seifert, H., Dijkshorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I. and M. Vaneechoutte:** Distribution of *Acinetobacter* Species on Human Skin: Comparison of Phenotypic and Genotypic Identification Methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2819-2825 (1997).
- Seviour, E.M., Blackall, L.L., Christensson, C., Hugenholtz, P., Cunningham, M.A., Bradford, D., Stratton, H.M. et al.:** The filamentous morphotype Eikelboom 1863 is not a single genetic entity. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 411-421 (1997).
- Sommaruga, R. and R. Psenner:** Ultraviolet Radiation in a High Mountain Lake of the Austrian Alps: Air and Underwater Measurements. *Photochem. Photobiol.* **65**: 957-963 (1997).
- Spring, S., Lins, U., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ferreira, L.C.S., Esquivel, D.M.S. and M. Farina:** Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Arch. microbiol.* **169**: 136-147 (1998).
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J. und K.-H. Schleifer:** Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 573-590 (2000).
- Stackebrandt, E. and T.M. Embley:** Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment. In: Colwell, R.R. and D.J. Grimes (eds.): *Nonculturable Microorganisms in the Environment*: 57-75. ASM Press, Washington, D.C. (2000).

- Stackebrandt, E. and B.M. Goebel:** 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 (1994).
- Stackebrandt, E., Pukall, R., Ulrichs, G. and H. Rheims:** Analysis of 16S rDNA clone libraries: Part of the big picture. In: Bell, C.R., Brylinsky, M. and P. Johnson-Green (eds.): *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada (1999).
- Stoffels, M., Ludwig, L., and K.-H. Schleifer:** rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environ. Microbiol.* **1:** 259-271 (1999).
- Strunk, O. and W. Ludwig:** Arb: A Software Environment for Sequence Data. Software program package. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pup/ARB/>. (1997).
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K. and R.B. Wallace:** Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In: Brown, D.D. and E. Fox (eds.): *Developmental biology using purified genes:* 683-693. Academic Press, New York (1981).
- Tandoi, V., Majone, M., May, J. and R. Ramadori:** The behaviour of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* isolates in an anaerobic-aerobic chemostat. *Wat. Res.* **32:** 2903-2912 (1998).
- Tiwana, H., Wilson, C., Pirt, J., Cartmell, W. and A. Ebringer:** Autoantibodies to Brain Components and Antibodies to *Acinetobacter calcoaceticus* Are Present in Bovine Spongiform Encephalopathy. *Infect. Immun.* **67:** 6591-6595 (1999).
- Tjernberg, I. and J. Ursing:** Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97:** 595-605 (1989).
- Trebesius, K.-H.:** Entwicklung und Anwendung sensitiver *in situ*-Techniken zum Nachweis ribosomaler RNS in ganzen bakteriellen Zellen. PhD Thesis, Technical University Munich (1995).
- Trebesius, K.H., Amann, R.I., Ludwig, W., Mühlegger, K. and K.-H. Schleifer:** Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23 rRNA-targeted polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60:** 3228-3235 (1994).

- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claey, G. and G. Verschraegen:** Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**(1): 11-15 (1995).
- Vaneechoutte, M., Tjernberg, I., Baldi, F., Pepi, M., Fani, R., Sullivan, E.R., van der Toorn, J. and L. Dijkshoorn:** Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp. nov.' belong to the same genomic species. *Res. Microbiol.* **150**: 69-73 (1999).
- Vlasceanu, L., Sarbu, S.M., Engel, A.S. and B.K. Kinkle:** Acidic Cave-Wall Biofilms Located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.* **17**: 125-139 (2000).
- Wagner, M., Amann, R.I., Lemmer, H. and K.-H. Schleifer:** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for bacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520-1525 (1993).
- Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. and K.-H. Schleifer:** Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 405-417 (1994).
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and K.-H. Schleifer:** Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 792-800 (1994).
- Wiedmann-al-Ahmad, M., Tichy, H.V. and G. Schon:** Characterization of *Acinetobacter* Type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR fingerprinting. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 792-800 (1994).
- v. Wintzingerode, F., Göbel, U.B. and E. Stackebrandt:** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229 (1997).
- v. Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. and U.B. Göbel:** Phylogenetic Analysis of an Anaerobic, Trichlorobenzene-Transforming Microbial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 283-286 (1999).

- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. and G.E. Fox:** PCR amplifications of 16S rDNA from lyophilized cell culture facilitates studies in molecular systematics. *Curr. Microbiol.* **21**: 325-327 (1990).
- Woese, C.:** Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **52**(2): 221-271 (1987).
- Woese, C., Kandler, O. and M.L. Wheelis:** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *PNAS* **87**: 4576-4579 (1990).
- Yamamoto, S. and S. Harayama:** Phylogenetic Analysis of *Acinetobacter* Strains Based on the Nucleotide Sequences of *gyrB* genes and on the Amino Acid Sequences of Their Products. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(2): 506-511 (1996).
- Yamamoto, S., Bouvet, P.J.M. and S. Harayama:** Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 87-95 (1999).
- Zimmermann, J.:** Entwicklung von Polynukleotid-Transkriptsonden gegen die Domäne III der 23S-rRNS von Vertretern des Phylums *Holophaga/Acidobacterium*. Diploma Thesis, Technical University Munich (1999).

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer im Zeitraum von Mai 1999 bis Juni 2002 angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle:

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer für die Themenstellung, die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Ludwig für die gute Betreuung und fachliche Unterstützung.

Dr. Natuschka Lee für die lange gute Zusammenarbeit und vielen interessanten fachlichen Diskussionen sowohl über *Acidobacteria* als auch über *Acinetobacter*.

Christina Hoboth für die hervorragende Unterstützung in der Anfangsphase der DNA-Polynukleotidsonden-Ära.

Dr. Linda Blackall, Advanced Wastewater Management Centre, Brisbane, AU, für die wertvollen Diskussionen zum Thema *Acinetobacter baumannii* und vielen anderen Themen.

Dr. Alexandr Němec, National Institute of Health, Prague, CZ, für die Überlassung der Typstämme von *A. schindleri* und *A. ursingii*.

Annette Summers Engel, Department of Geological Sciences der University of Austin, TX, für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung von Probenmaterial aus der Lower Kane Cave.

Dr. Bernhard Fuchs, Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie Bremen, für die große Hilfe bei der durchflußcytometrischen Anreicherung von *Acidobacteria*.

Dr. Jürgen Fröhlich, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, für die große Hilfe bei der Mikromanipulation von *Acidobacteria*.

Prof. Dr. Gerhard Wanner, Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die große Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Elementanalyse von Umweltproben.

Dr. Stephan Thiel, Institut für Meteorologie und Klimaforschung des Forschungszentrum Karlsruhe, Garmisch-Partenkirchen, und Dr. Ruben Sommaruga, Institut für Zoologie und Limnologie der Universität Innsbruck, für interessante Diskussionen über atmosphärische Strahlenbelastung.

Dr. Thomas Behr für die hervorragende fachliche Unterstützung während unserer langen Benachbarschaft, die vielen gemeinsamen Unternehmungen und seine durch nichts zu erschütternde Ruhe.

André Mehlen für *Acinetobacter*-Zusammenarbeit und zahllose OH-Gruppen-geschwängerte Abende.

Sebastian Lücke und Friederike Feldmann für wertvolle Unterstützung.

Katrin Zwirgmaier für Anregungen zu Hybridisierungen in der Mikrotiterplatte.

Dr. Holger Daims und Kilian Stöcker für Unterstützung am konfokalen Laserscanningmikroskop und Holger ganz besonders für das erbarmungslose Überlebenstraining im Lee der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried.

Frau Barbara Wunner-Füßl für die Erledigung einiger zusätzlicher Arbeiten.

Allen gegenwärtigen und gewesenen Isos, Eberls und Wagners für die schönen drei Jahre.

Meiner Mutter für die große moralische Aufbauarbeit und die vielen schönen Samstagnachmittage über die ganze Zeit.

Und nochmal Chrissie, diesmal für die fantastischen zweieinhalb Jahre mit Dir.