

BERICHTE
aus dem
INSTITUT FÜR MEERESKUNDE
an der
CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT · KIEL



Nr. 295

**Beziehungen zwischen Struktur und
Funktion bakterieller Gemeinschaften
in Mikrokosmos- und Freiwasser-Chemoklinen**

von

Georg Donner

1997

DOI: 10.3089/IFM-BER-295

Kopien dieses Berichts können bezogen werden durch:

Abt. Marine Mikrobiologie
Institut für Meereskunde
an der Universität Kiel
Düstembrooker Weg 20
D-24105 Kiel

ISSN 0341-8561

Diese Arbeit wurde von der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Kiel als Dissertation angenommen.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hoppe möchte ich an dieser Stelle recht herzlich für den großen wissenschaftlichen Freiraum sowie für die uneingeschränkte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit danken.

Katrin Schwarz gilt besonderer Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit während des "Mikrokosmos-Projektes".

Von den Mitarbeitern der Abteilung Marine Mikrobiologie erhielt ich jede nur denkbare Unterstützung. Insbesondere Hans Sell drehte manche Schraube und half mir auch sonst viele technische Hürden zu überwinden.

Manch hilfreichen Rat erhielt ich auch von Lilijana Podgorsek, Jörg Süling, Jürgen de Wall, und Andreas Schneider. Ihnen allen sei gedankt.

Bernd Thiemann ermöglichte mir die Durchführung der Fettsäureanalysen. Auch ihm sei hier gedankt

Mein besonderer Dank gilt der Gastfreundschaft und dem Engagement von Herrn Dr. Gerhard Muyzer vom Max Plank Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen, der es mir ermöglichte die DGGE-Technik zu erlernen.

In der Endphase meiner Arbeit erhielt ich besondere Unterstützung von Hanna Giesenhausen, Herbert auf dem Venne und Sören Ulrich. Ihnen sei gedankt.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich immer in meinem Weg bestärkt, aufgemuntert und unterstützt haben.

INHALT

1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	5
2.1 Die untersuchten Chemoklinen	5
2.1.1 Chemoklinen in der Gotland See	5
2.1.2 Chemoklinen im Mikrokosmos	6
2.2 Probennahmen im Mikrokosmos	9
2.2.1 Der Magnetprober	9
2.2.2 Der "Gefrierschöpfer" für kleinskalige Probennahmen in den oxisch-sulfidischen Grenzschichten des Mikrokosmos	10
2.3 Abiotische Parameter	13
2.3.1 Naßchemische Sauerstoff und Sulfidbestimmungen	13
2.3.2 Lichtleitergestützte Sauerstoffmessungen	14
2.3.3 Schwefel- (S ^o) Bestimmungen	16
2.4 Biotische Parameter	16
2.4.1 Gesamtbakterienzahl und zelluläre Biomasse	16
2.4.2 Bakterielle Sekundärproduktion	17
2.4.3 Keimzahlbestimmungen	17
2.4.4 "Total Viable Direct Counts" von Bakterien (TVDC)	18
2.4.5 Bestimmung Ektoenzymatischer Aktivitäten (EEA) in Mikrotiterplatten	18
2.4.5.1 Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten unter oxischen und anoxischen Bedingungen	19
2.4.5.2 Der Einfluß von oxischen und anoxischen Inkubationsbedingungen auf die ektoenzymatische Aktivität	22
2.4.5.3 Entwicklung eines Prototyps für die lichtleitergestützte fluorimetrische <i>in situ</i> -Erfassung ektoenzymatischer Aktivitäten	22
2.4.5.4 Lichtleitergestützte <i>in situ</i> -Bestimmung der relativen Aktivitäten der Esterasen in der Chemokline des Mikrokosmos	25
2.4.6 Die mikrobielle heterotrophe Aktivität	25
2.4.7 Denaturierende Gel Gradienten Elektrophorese (DGGE)	26
2.4.7.1 Extraktion und Reinigung genomischer Gesamt-DNA aus bakteriellen Gemeinschaften und Einzelisolaten	28
2.4.7.2 Verwendete Primer und die mit der PCR amplifizierten Bereiche	28
2.4.7.3 "Touchdown"- PCR	29
2.4.7.4 Aufbau des Gradienten Gels	29
2.4.7.5 Die Elektrophorese	30
2.4.7.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten	30
2.5 Mikrobielle Untersuchungen in Chemoklinen	30
2.5.1 Adaptationen der mikrobiellen Gemeinschaft an die Bedingungen in der Chemokline des Mikrokosmos	30
2.5.2 Die mikrobielle Gemeinschaft in der Chemokline des Mikrokosmos	31
2.5.3 Die mikrobielle Gemeinschaft in der Chemokline der Gotland See 1993	32
2.5.4 Die taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften und deren ektoenzymatischen Potentiale in der Chemokline des Mikrokosmos unter dem Einfluß von Durchmischung, Stagnation und Eutrophierung	32
2.5.5 Die taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften und deren Aktivitäten in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994	35
2.6 Mikrobielle Untersuchungen im Gradostaten	35
2.6.1 Durchmischungsexperimente im Gradostaten mit mikrobiellen Gemeinschaften der Gotland See	36
2.6.2 Durchmischungsexperimente im Gradostaten mit <i>Shewanella putrefaciens</i>	37
2.7 Charakterisierungen von Isolaten	38
2.7.1 Biochemische Charakterisierungen anhand von Membran-Fettsäuremustern	38
2.7.2 Charakterisierung mit api Systemen	39

3	ERGEBNISSE	40
3.1	Methodische Vorversuche	40
3.1.1	Ektoenzymatische Aktivitätsbestimmungen unter oxidischen und anoxischen Inkubationsbedingungen	40
3.1.2	Der Meßbereich der lichtleitergestützten EEA-Messung	41
3.1.3	Der Einfluß von H ₂ S auf die lichtleitergestützte Sauerstoffmessung	42
3.1.4	Die Auftrennung von Einzelisolaten mit der DGGE	43
3.2	Die Chemokline im Mikrokosmos	45
3.2.1	Die Entwicklung der Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen im Mikrokosmos nach Aufbau der Chemokline	45
3.2.2	Die Entwicklung der Gesamtbakterienzahlen und der zellulären Biomassen im Mikrokosmos nach Aufbau der Chemokline	46
3.3	Vergleichende Untersuchungen in der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See	50
3.3.1	Die Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen	51
3.3.2	Die Gesamtbakterienzahlen	52
3.3.3	Die zellulären Biomassen, die bakterielle Sekundärproduktion (BSP) sowie die Turnoverraten von H ³ -Leucin	52
3.3.4	Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten und die Kt+Sn-Werte der Aminopeptidasen	53
3.3.5	Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten und die Kt+Sn-Werte der β-Glucosidasen	54
3.3.6	Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Esterasen	55
3.3.7	Die Hydrolyseraten der β-Glucosidasen und die Turnoverraten von C ¹⁴ -Glucose	57
3.4	Keimzahlen aerober Saprophyten und anaerober Denitrifizierer in der Chemokline des Mikrokosmos	59
3.5	Die mikrooxidisch-sulfidische Grenzschicht im Mikrokosmos	60
3.5.1	Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen	60
3.5.2	Schwefelkonzentrationen in der Trübungszone	60
3.5.3	Keimzahlen heterotropher- und autotropher Schwefeloxidierer	61
3.6	Die Genetische Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos und deren ektoenzymatische Aktivitäten	62
3.6.1	Der Einfluß einer mehrwöchigen Stagnationsperiode auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos	62
3.6.2	Der Einfluß von Durchmischung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos	64
3.6.3	Die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Mikrokosmos am Ende einer Restabilisierungsperiode	66
3.6.4	Der Einfluß von Eutrophierung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos	69
3.6.5	<i>Shewanella putrefaciens</i> und die ektoenzymatischen Aktivitäten in der Chemokline des Mikrokosmos	75
3.7	Mikrobielle Aktivitäten und die genetische Struktur bakterieller Gemeinschaften in der reoxidierten Chemokline der Gotland See	79
3.8	Durchmischungsexperimente mit mikrobiellen Gemeinschaften der Gotland See im Gradostaten	85
3.9	Durchmischungsexperimente mit <i>Shewanella putrefaciens</i> im Gradostaten.	88

3.10 Charakterisierungen von Isolaten	92
3.10.1 Chemotaxonomische Charakterisierungen von Isolaten aus dem Mikrokosmos anhand ihrer Membranfettsäuremuster	92
3.10.2 Biochemische Charakterisierung von <i>S. putrefaciens</i> mit API-Systemen	94
4 DISKUSSION	96
4.1 Diskussion der Methoden	96
4.1.1 Der Gefrierschöpfer für kleinskalige Probennahmen in der Chemokline des Mikrokosmos	96
4.1.2 Die Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten in Mikrotiterplatten	96
4.1.3 Die lichtleitergestützte fluorimetrische <i>in situ</i> EEA-Messung	97
4.1.4 Der Einsatz eines optischen Sauerstoffsensors	98
4.1.5 Die Denaturierende Gel Gradienten Electrophorese (DGGE)	99
4.1.6 Der Einfluß unvollständiger Zelllysis auf die Qualität der DGGE	99
4.1.7 Ungleichmäßige Amplifikationen während der PCR	99
4.1.8 Die Wahl der geeigneten Primer	99
4.1.9 Die Chemokline im Mikrokosmos	101
4.1.10 Die Stabilisierung des oxisch-sulfidischen Gradienten in der Chemokline des Mikrokosmos	102
4.2. Erhöhte mikrobielle Aktivitäten in der Chemokline und die Anpassung der bakteriellen Gemeinschaften an die Bedingungen im Mikrokosmos	103
4.2.1 Erhöhte zelluläre Biomassen in der Chemokline des Mikrokosmos	104
4.2.2 Erhöhte heterotrophe Aktivitäten mikrobieller Gemeinschaften in Chemoklinen	104
4.2.3 Der heterotrophe Abbau glycosidisch verknüpfter Verbindungen und die hemmende Wirkung von H ₂ S	105
4.2.4 Der Abbau von Proteinen und der Aufbau zellulärer Biomasse in Chemoklinen	107
4.2.5 Erhöhte Aktivitäten der Esterasen unter sulfidischen Bedingungen	108
4.2.6 Keimzahlen als verbindendes Element zwischen taxonomischer Struktur und mikrobieller Aktivität	109
4.3 Struktur und Funktionsanalysen an komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Freiwasser-Chemoklinen	112
4.3.1 Beziehungen zwischen ektoenzymatischen Aktivitäten und Veränderungen der taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos	112
4.3.2 Der aktivitätssteigernde Einfluß von Durchmischung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Umstrukturierung mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos	113
4.3.3 Der Einfluß von Stagnation auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Umstrukturierung mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos	114
4.3.4 Der Einfluß von Eutrophierung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Dominanzverschiebungen in einer mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos	115
4.3.5 Die taxonomische Diversität und die mikrobiellen Aktivitäten bakterieller Gemeinschaften in der reoxidierten Chemokline der südlichen Gotland See	117
4.3.6 Die Hydrolyseraten der β -Glucosidase in Beziehung mit charakteristischen Veränderungen der taxonomischen Struktur in der reoxidierten Chemokline der südlichen Gotland See	118
4.5 Der Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität mikrobieller Gemeinschaften und von Einzelorganismen	119
4.5.1 Der stimulierende Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität mikrobieller Gemeinschaften der Gotland See	120
4.5.2 Der stimulierende Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität von <i>Shewanella putrefaciens</i>	122
4.6 Die Bedeutung kultivierbarer Organismen in der Chemokline des Mikrokosmos	123

4.7 Die Identifizierung von Isolaten aus der Chemokline des Mikrokosmos	124
4.8 Grampositive Bakterien in der Chemokline des Mikrokosmos	125
4.9 Schlußbetrachtungen und Ausblick	125
5 ZUSAMMENFASSUNG	129
6 LITERATUR	132
7 ANHANG	147

1 EINLEITUNG

Die Ökologie beschäftigt sich nach der bekannten Definition von Odum (1971) mit der Struktur und Funktion von Ökosystemen, d.h. der Biologie von Organismengruppen und ihren Funktionen auf dem Lande, im Meer und im Süßwasser (Overbeck, 1972). Noch bis vor wenigen Jahren spielten Bakterien und Protozoen eine unbedeutende Rolle in den Modellvorstellungen zur Struktur mariner pelagischer Nahrungsnetze (Azam et al., 1983). Neuere Anschauungen weisen den Mikroorganismen dagegen eine Schlüsselstellung im Energiefluß mariner Ökosysteme zu (Pomeroy, 1974). Ein zentrales Thema der mikrobiellen Ökologie ist die Klärung der strukturellen und funktionellen Beziehungen zwischen den Bakterien und den von ihnen vermittelten Stoffflüssen. Die fundamentalen Fragen richten sich auf die Struktur des Lebensraumes und die Regulation von *in situ* Umsetzungen, sowie auf die taxonomische Struktur und die physiologische Funktion der Einzelkomponenten in mikrobiellen Lebensgemeinschaften (Schütt, 1990).

Der Prozess der mikrobiell vermittelten Mineralisation beginnt mit der hydrolytischen Spaltung von organischen Polymeren durch bakteriell synthetisierte extrazelluläre Enzyme (Hoppe, 1983; Chrost, 1991). Die Aufnahme der abgespaltenen Monomere dient in der Bakterienzelle zur Energiegewinnung und zum Aufbau zellulärer Substanz. Dies äußert sich in Biomassezuwachs und Zellteilung (Kirchman, 1986). Der Ablauf dieser Prozesse ist normalerweise auf eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff angewiesen. In Lebensräumen mit einer eingeschränkten Sauerstoffversorgung in Kombination mit hohen Nährstofffrachten kann deshalb eine teilweise oder vollständige Aufzehrung des Sauerstoffs eintreten. Die zunehmende Sauerstoffverarmung macht einen Übergang zu einer anaeroben Lebensweise notwendig. Unter anaeroben Bedingungen werden durch die hydrolytische Aktivität der Ektoenzyme organische Monomere freigesetzt, welche durch Fermentationsprozesse in eine Anzahl kurzkettiger Verbindungen wie Lactat, Formiat, Butyrat, Propionat oder auch Wasserstoff umgewandelt werden können (Schlegel, 1985). Diese Verbindungen dienen wiederum einer Anzahl stoffwechselphysiologischer Spezialisten als Substrate für eine anaerobe Atmung mit alternativen Elektronenakzeptoren wie z.B. Nitrat und Sulfat (Blackburn und Fenchel, 1979). Eine intensive Veratmung von Sulfat durch sulfatreduzierende Bakterien führt in Bereichen mit langanhaltenden anoxischen Perioden vielfach zu hohen Konzentrationen von Schwefelwasserstoff (Stigebrandt und Wulff, 1987; Andersin und Sandler, 1988). Hohe Sedimentationsraten von organischem Material gefolgt von sauerstoffzehrender Mineralisation durch heterotrophe Bakterien verursachen nach Beobachtungen von Seppänen und Voipio (1971) in einigen Sedimenten der Ostsee eine Akkumulation von Schwefelwasserstoff. Ähnliche Befunde liegen von Sorokin (1983) für das Schwarze Meer und von Omerod (1988) für den Färevarens Fjord vor.

In der Gotland See (zentrale Ostsee) unterbindet der eingeschränkte horizontale Wasseraustausch mit der Nordsee in Kombination mit einer ausgeprägten Dichteschichtung eine kontinuierliche Erneuerung des Tiefenwassers. Die Folge ist ein langsames Aufsteigen des Schwefelwasserstoffs aus dem Sediment in die Wassersäule (Stigebrandt und Wulff, 1987). Hier bildet sich in mittleren Wassertiefen von etwa 120-150 m ein bis zu 30 m breiter Gradient

zwischen Sauerstoff und Sulfid aus. In dieser sogenannten Chemokline durchlaufen kohlenstoff- und stickstoffhaltige Verbindungen, durch bakterielle Stoffumsetzungen vermittelt und in Abhängigkeit von den zur Verfügung stehenden Elektronenakzeptoren, eine Anzahl verschiedener Oxidationsstufen.

Unter oxischen Bedingungen erfolgt der Abbau von organischem Material fast vollständig und direkt. Nach dem Zusammenbruch einer Phytoplanktonblüte und der Sedimentation vom oxischen in den anoxisch-sulfidischen Bereich der Chemokline kommt es zu einem verlangsamten Abbau und zu einer Akkumulation von organischem Material (Rheinheimer, 1991). Dieses Material kann durch Diffusion oder Durchmischung wieder in den oxischen Bereich der Chemokline gelangen und dort möglicherweise die aerobe heterotrophe mikrobielle Gemeinschaft zu einer gesteigerten Aktivität anregen. Dieser Aktivitätsanstieg spiegelt sich in den mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereichen vielleicht auch in den erhöhten bakteriellen Zellzahlen und Biomassen (Gast und Gocke, 1988) sowie in den gesteigerten Stoffumsatzraten wider (Gocke, 1989). Chemoklinien stellen demnach geochemisch und biochemisch sehr aktive Zonen dar (Martens, 1984; Jørgensen und Revsbech, 1989; Jørgensen, 1993; Klump und Martens, 1993).

Die erhöhte heterotrophe Aktivität ist in der Chemokline aber nicht allein abhängig von der Zufuhr von sedimentierendem Phytoplanktonmaterial. Chemoautotrophe Bakterien sind in der Lage, reduzierte anorganische Verbindungen aus dem sulfidischen Bereich der Chemokline für ihre Energiegewinnung zu nutzen und auf diese Weise im oxisch-sulfidischen Grenzbereich ein auf chemoautotropher Produktion basierendes mikrobielles Nahrungsnetz zu unterstützen (Gocke, 1995).

Die Chemokline präsentiert sich damit als ein räumlich und biochemisch stark strukturierter Lebensraum, in dem sich mit wechselnder Verfügbarkeit von organischem Material und den entsprechenden Elektronenakzeptoren charakteristische stoffwechselphysiologische Bakteriengruppen etablieren (Höfle und Brettar, 1990a).

Natürliche mikrobielle Lebensgemeinschaften setzen sich aus Vertretern unterschiedlicher taxonomischer Gruppen zusammen, die sich durch hochspezialisierte physiologische Eigenschaften auszeichnen. Sämtliche Kenntnisse über die Physiologie und die Taxonomie der Mikroorganismen beruhen jedoch im wesentlichen auf ihrer Kultivierbarkeit. Bis heute ist nicht bekannt, inwieweit die unter Laborbedingungen definierten stoffwechselphysiologischen Gruppen mit charakteristischen Vertretern natürlicher Lebensgemeinschaften identisch sind. Die Ursache für diesen Mangel in der mikrobiellen Ökologie beruht auf der bekannten Tatsache, daß nur bis zu 1% der aquatischen Mikroflora auf Kultur-Medien isoliert werden können (Jannasch und Jones, 1959; Alexander, 1961). In eutrophen Gewässern liegt der Anteil bei 20% (Höfle, 1990b).

Seit Mitte der 80er Jahre halten molekularbiologische Techniken zunehmend Einzug in den Bereich der aquatischen mikrobiellen Ökologie. Ein vielversprechender Ansatz, um die taxonomische Struktur natürlicher mikrobieller Gemeinschaften direkt in einer Wasserprobe zu bestimmen, beruht auf der Strukturanalyse stabiler RNA Moleküle (Pace, 1986; Höfle, 1988). Die PCR-Technik (Saiki et al., 1985) erlaubt die selektive Vervielfachung (Amplifikation) charakteristischer DNA Abschnitte aus kleinen Probenvolumina. Damit ist die Möglichkeit gegeben, aus Habitaten mit hoher räumlicher Heterogenität DNA-Abschnitte sequenzspezifisch

zu vermehren. In Verbindung mit einer neuen molekularbiologischen Technik, der "Denaturierenden Gel Gradienten Elektrophorese" (DGGE; Muyzer et al., 1993), werden somit direkte Aussagen über Veränderungen der genetischen Diversität in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften möglich.

Um zu einer Verknüpfung von organismenorientierter Mikrobiologie und funktionsorientierter Ökologie zu gelangen, werden aber außer einer breiten Kenntnis der taxonomischen Struktur auch quantitative Daten benötigt, welche Informationen über habitatspezifische physiologische Funktionen und metabolische Interaktionen geben (Overbeck und Chrost, 1990). Untersuchungen von Höfle und Brettar (1995) in der Chemokline der Gotland See (zentrale Ostsee) stellen einen Schritt in diese Richtung dar. Sie fanden im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich eine Beziehung zwischen erhöhten mikrobiellen Umsatzraten und einem Anstieg der bakteriellen taxonomischen Diversität.

Das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung lag auf der Verteilung bakterieller Abundanzen und heterotropher Aktivitäten im Tiefenprofil von Chemoklinen im Freiwasser. Es sollte festgestellt werden, ob und wie sich die wechselnden oxisch-sulfidischen Bedingungen innerhalb der Chemoklinen in den Abundanzen und Aktivitäten der mikrobiellen Gemeinschaften bemerkbar machen. Da Untersuchungen in der Wassersäule immer nur Momentaufnahmen aus einer sukzessiven Entwicklung wiedergeben können, war die Entwicklung eines Mikrokosmos-Systems ein Ziel dieser Arbeit. Dieses System bestand aus 300 l fassenden Plexiglassäulen, in denen unter kontrollierten Bedingungen Freiwasser-Chemoklinen aufgebaut wurden. Um die Realitätsnähe des Mikrokosmos zu überprüfen, wurde die mikrobielle Gemeinschaft der Gotland See im Tiefenprofil der Chemokline anhand ihrer heterotrophen Aktivitätsmuster charakterisiert und die Ergebnisse mit Untersuchungen im Mikrokosmos verglichen. Die Abundanzverteilungen einiger ökophysiologischer Bakteriengruppen wurden dabei mit charakteristischen Aktivitätsmustern in Beziehung gesetzt.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Untersuchung beruhte auf der Modifizierung und Optimierung klassischer Methoden zur Erfassung mikrobieller Aktivitätsparameter, so daß sie in Verbindung mit neuen molekularbiologischen Techniken Aussagen über strukturelle und funktionelle Beziehungen in mikrobiellen Gemeinschaften mariner Chemoklinen ermöglichten. In dieser Arbeit wurde mit der DGGE-Technik erstmalig eine molekularbiologische Technik in den Gesamtkomplex einer mikrobiell ökologischen Fragestellung integriert, indem mit konventionellen Techniken erfaßte Aktivitätsmuster mit charakteristischen Änderungen der taxonomischen Struktur in Beziehung gesetzt wurden. Hier standen insbesondere Durchmischung, Stagnation und Eutrophierung als Störgrößen im Vordergrund, welche in den komplexen mikrobiellen Gemeinschaften der Chemoklinen des Mikrokosmos und der Gotland See möglicherweise funktionelle und strukturelle Anpassungsprozesse induzierten.

Eine Alternative zu dem quasi-holistischen Ansatz des Mikrokosmos bietet das von Lovitt und Wimpenny (1981) entwickelte Gradostatensystem (Wimpenny und Abdollahi, 1991). Hierbei handelt es sich um ein Durchflußsystem in dem mehrere Chemostatengefäße kaskadenartig miteinander verbunden sind. Es kann z.B. zur Simulation von Sauerstoff-Sulfid Gradienten eingesetzt werden. Die an den oxisch-sulfidischen Grenzschichten von Chemoklinen auftretenden Diffusionsgradienten bedingen einen Stofftransport, der zu

stoffwechselphysiologischen Anpassungsreaktionen natürlicher Gemeinschaften führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Prozesse im Gradostaten anhand der mikrobiellen Gemeinschaften der Gotland See und mit Einzelorganismen untersucht. Der kombinierte Einsatz von Mikrokosmos und Gradostat ermöglichte neben den Untersuchungen zu den heterotrophen bakteriellen Aktivitäten auch populationsdynamische Studien wie sie in der Chemokline der Gotland See unter *in situ* Bedingungen in der Praxis nicht durchgeführt werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stehen in Zusammenhang mit einer aktuellen Problematik, die z. Zt. nicht nur im Ostseeraum akut ist. Gemeint ist die Ausbreitung anoxischer Zonen in eingeschlossenen Meeresgebieten und Sedimenten.

Durch den zunehmenden anthropogenen Eintrag von Phosphor und Stickstoff in die Ostsee wird das Phytoplanktonwachstum im Oberflächenwasser begünstigt (Gerlach, 1995). Es ist anzunehmen, daß durch die gesteigerte Phytoplanktonproduktion in zunehmendem Maße organisches Material in das Tiefenwasser der Ostsee absinkt und dort eine zusätzliche Sauerstoffzehrung verursacht (Gerlach, 1988). Die Akkumulationsraten für organische Substanzen erreichen in den Sedimenten der tieferen Bereiche der Ostsee sogar Werte, die 5- bis 8fach höher liegen als aus der Primärproduktion zu erwarten ist. Dies zeigt die Bedeutung der tieferen Gebiete auch als Senken für anthropogene Frachten (Bodungen und Zeitschel, 1995). Sollte keine Verbesserung der Sauerstofftransporte oder eine Verringerung der Nährsalzeinträge erfolgen, dann "stirbt" die Ostsee in ihren Tiefengebieten und es wird sich dort Schwefelwasserstoff wie im Schwarzen Meer weiter ausbreiten (Gerlach, 1988).

Der Zusammenhang zwischen Eutrophierung, gesteigerten Planktonmengen, Sauerstoffzehrung und der Bildung von Schwefelwasserstoff im Tiefenwasser ist soweit einleuchtend. Die Ausbreitungsmechanismen anoxischer Zonen sind dagegen auf mikrobieller Ebene noch weitgehend unverstanden. Dies wird besonders deutlich angesichts der lückenhaften Informationen zur Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die untersuchten Chemoklinen

2.1.1 Chemoklinen in der Gotland See

Die Hydrographie der Gotland See, als Teilgebiet der zentralen Ostsee, wird durch die Lage dieses Gebietes innerhalb einer humiden Klimazone stark beeinflusst (Matthäus, 1986). Regenfälle und Flußwassereintrag bewirken eine positive Wasserbilanz. Dies führt dazu, daß salzreicheres und dichteres Tiefenwasser durch salzärmeres Oberflächenwasser überlagert wird. Eine Folge ist die Ausbildung einer Salzgehaltssprungschicht mit einer starken Dichteschichtung in 70-80 m Tiefe. Der Wasseraustausch zwischen dem Oberflächenwasser und dem Tiefenwasser sowie der damit verbundene Eintrag von Sauerstoff in das Tiefenwasser ist folglich stark eingeschränkt. Eine Erneuerung des Tiefenwassers der Gotland See erfolgt lediglich durch einströmendes, dichteres und sauerstoffreicheres Nordseewasser (Matthäus, 1978). Solche Einstromereignisse sind sehr selten, und die Perioden zwischen diesen Ereignissen, den sogenannten Stagnationsperioden, können bis zu 13 Jahre andauern (Andersin und Sandler, 1988). In den Jahren zwischen 1950 und 1980 wurden sieben markante Stagnationsperioden für das Gotlandbecken vermerkt (Matthäus, 1986). Dies führte in der Vergangenheit zur Ausbildung saisonaler anoxischer Zonen und auch zur Manifestierung langzeitiger Anoxie im Tiefenwasser der Gotland See (Stigebrandt und Wulff, 1987; Andersin und Sandler, 1988).

Zwischen 1992 und 1994 wurden drei Expeditionen mit F.S. Alkor in das Gotlandtief (südliche Gotland See, Station 57°20'N / 20°03'E) durchgeführt (Abb. 2.1). In diesem Zeitraum fanden im Tiefenwasser und in der oxisch-sulfidischen Übergangszone (Chemokline) im Gotland Becken drastische Veränderungen der Sauerstoffkonzentrationen statt. 1993 wurde durch Salzwassereinströme erstmalig seit 1977 wieder Sauerstoff in das Tiefenwasser der Gotland See eingetragen. Über einen Zeitraum von 1.5 Jahren wurde anschließend das Tiefenwasser langsam und unvollständig durch gelegentliche, starke laterale Einströme sauerstoffreichen Nordseewassers oxidiert. Der Sauerstoff dieser zwischen 1993 und 1994 erfolgten Einströme wurde jedoch schnell wieder reduziert. Die im Rahmen einer BAMBI Studie (**B**altic **M**icrobial **B**iology **I**nvestigation) erhobenen Daten zeigten, daß die oberhalb der Halokline erfolgten Wassereinströme ohne Einfluß auf die Chemokline in 120 m Tiefe waren.

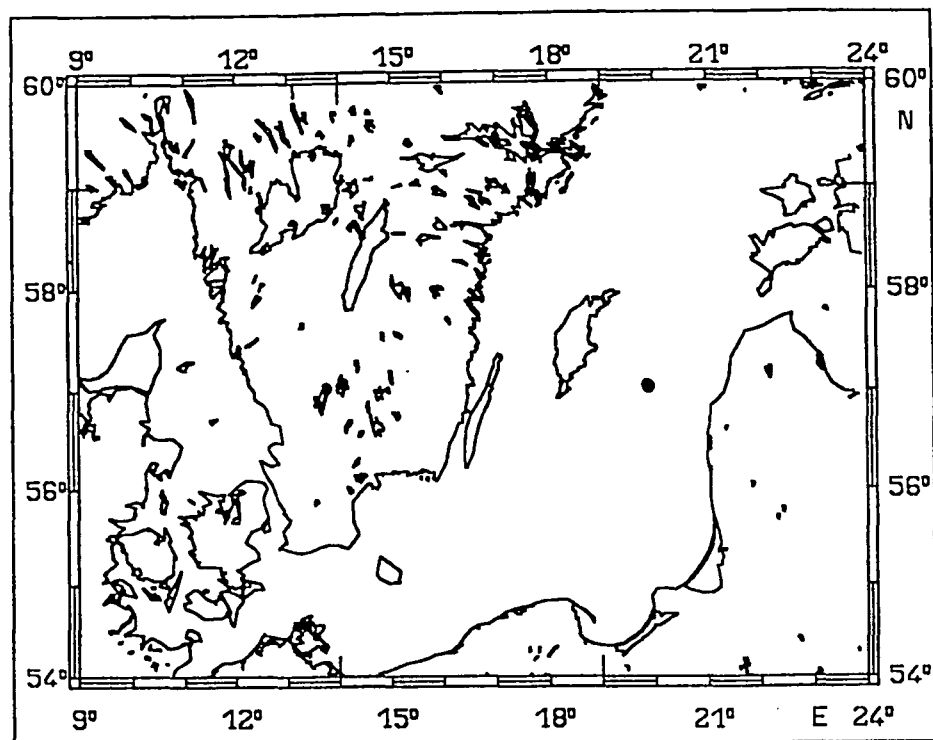


Abb. 2.1 Untersuchungsgebiet in der Gotland See, Zentrale Ostsee (Station 57°20'N / 20°03'E).

2.1.2 Chemoklinen im Mikrokosmos

Um Untersuchungen zur Aktivität und taxonomischen Struktur mikrobieller Gemeinschaften unter den kontrollierten Bedingungen eines Labors durchführen zu können, wurden Chemoklinen in 300 l fassenden Plexiglassäulen (Höhe = 2 m, $\varnothing = 0.45\text{m}$, Fa. Röhm), den Mikrokosmen, aufgebaut. Die Befüllung der Mikrokosmen mit Seewasser erfolgte über die Seewasserleitung des Institutes für Meereskunde (IfM-Kiel). Das Wasser ($S = 15$) gelangte über eine Kiesbett-Glasfaser-Vorfiltration in die Säulen (Abb. 2.2a). Um Thermokonvektionen vorzubeugen, befand sich der gesamte Aufbau in einem temperaturkonstanten Raum (10 °C). Da die Bedingungen in der Chemokline der Gotland See simuliert werden sollten, wurde die Raumtemperatur den *in situ* Temperaturen des Tiefenwassers der Gotland See angepaßt. Anreicherungen von phototrophen Organismen wurden vermieden, da die Säulen in einem abgedunkelten Raum standen.

Für die Experimente wurden zwei Experimentalsäulen verwendet. In einer Säule wurden hauptsächlich quantitative Untersuchungen zur heterotrophen Aktivität mikrobieller Gemeinschaften in Chemoklinen des marinen Pelagials durchgeführt (Schwarz, 1995). Weitgehend zeitgleich erfolgten in der zweiten Säule die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Aktivität und taxonomischen Struktur mikrobieller Gemeinschaften in marinen Freiwasser-Chemoklinen.

Eine dritte Säule diente zur Unterschichtung der beiden Experimentalsäulen mit sulfidischem

Wasser. Diese Säule stand um 15 cm erhöht, so daß ein Gefälle gegenüber den beiden Experimentalsäulen vorhanden war. Verschiedene "Zugänge" ermöglichten in allen drei Säulen die Befüllung und die Belüftung mit N_2 . In der erhöht stehenden Säule waren außerdem Öffnungen für eine Umwälzpumpe angebracht, so daß eine gute Durchmischung möglich war.

Nach der Befüllung mit Seewasser wurden die Säulen zunächst für 4 Stunden mit Stickstoff begast und so in ihren Sauerstoffkonzentrationen auf ca. $0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ erniedrigt (Abb. 2.2b). Außerdem wurde die erhöht stehende Säule durch Zumischung von NaCl um 2 ‰ in ihrem Salzgehalt erhöht. Zusammen mit der erniedrigten Sauerstoffkonzentration wurde so die Ausbildung eines zu steilen Gradienten im späteren oxisch-sulfidischen Übergangsbereich vermieden. Der erhöhte Salzgehalt bewirkte gleichzeitig eine Stabilisierung der Chemokline, so daß eine Oxidation des Bodenwasserkörpers vermieden wurde. Der Salzgehaltsunterschied von 2‰ liegt im Toleranzbereich von Ostseebakterien (Rheinheimer, 1991).

Durch Zugabe einer Natriumsulfid-Lösung wurde der Restsauerstoff in der erhöht stehenden Säule zunächst reduziert. Eine Umwälzpumpe sorgte hier für eine gleichmäßige Durchmischung. Nach 24 Stunden stellte sich eine H_2S -Konzentration von maximal $100 \mu\text{M}$ ein (Abb. 2.2c). Danach erfolgte die Unterschichtung der beiden Experimentalsäulen mit sulfidischem Wasser aus der erhöht stehenden Säule über das Gefälle. Die Experimentalsäulen wurden bis zu 25 % ihres Volumens mit sulfidischem Wasser über einen bodennahen Zulauf befüllt. Das verdrängte Wasser konnte über einen Überlauf abfließen (Abb. 2.2d). Der Restsauerstoff ($0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) in den unterschichteten Experimentalsäulen wurde durch das H_2S in der Kontaktzone reduziert, so daß nach drei Tagen in beiden Säulen die Ausbildung einer etwa 20 cm breiten Chemokline einsetzte. (Abb. 2.2e).

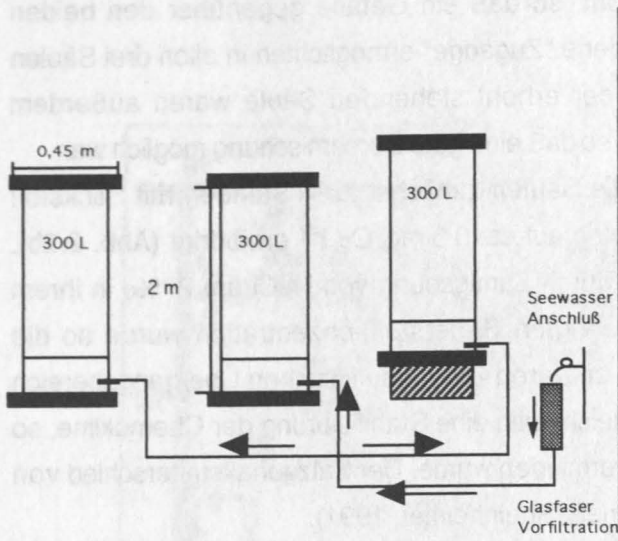


Abb. 2.2a

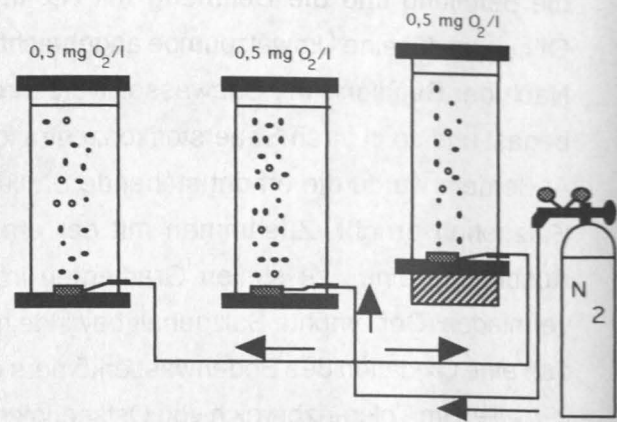


Abb. 2.2b

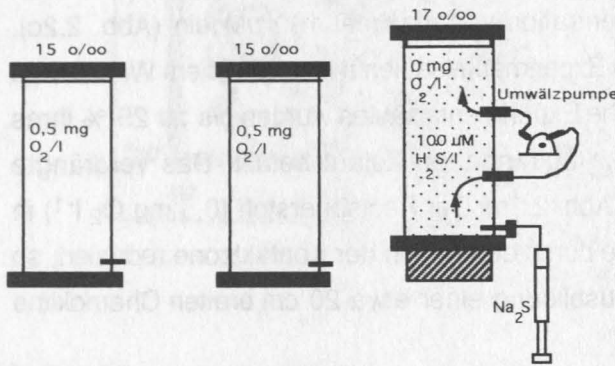


Abb. 2.2c

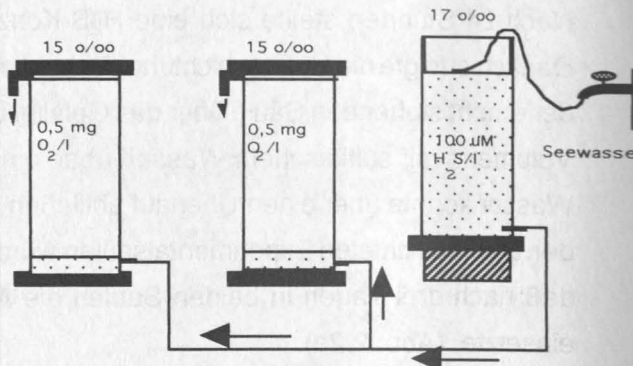


Abb. 2.2d

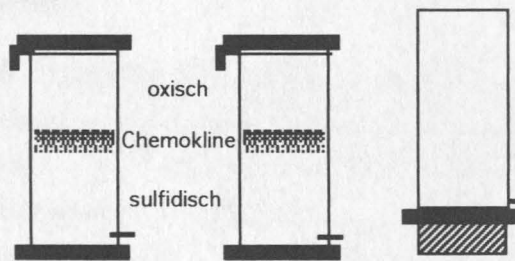


Abb. 2.2e

Abb. 2.2 a-e: Schematische Darstellung vom Aufbau der Freiwasser-Chemoklinen in 300 l fassenden Mikrokosmen.

a: Befüllen der Säulen; b: Begasung mit N₂; c: Zugabe von Na₂S; d: Unterschichtung mit sulfidischem Wasser; e: Ausbildung des oxisch-sulfidischen Übergangsbereiches (Chemokline).

2.2 Probennahmen im Mikrokosmos

2.2.1 Der "Magnetprober"

Für die Entnahme von Wasserproben aus dem Mikrokosmos wurde ein spezieller "Magnetprober" entwickelt der es ermöglichte, in Abständen von 2-3 cm aus verschiedenen Tiefenbereichen der Chemokline Proben zu entnehmen (Abb. 2.3A). Eine Edelstahlkanüle (\varnothing innen = 1 mm, Fa. Terumo) war im Mikrokosmos an einem Magneten befestigt, der von außen von einem weiteren Magneten gehalten wurde und damit in der Höhe verstellbar war. Die Kanüle wiederum war mit einem Tygon-Schlauch (\varnothing innen = 1 mm) verbunden, der über einen mit einem Septum versehenen Schraubstutzen nach außen führte und dort mit einer Schlauchklemme verschlossen werden konnte. Die Schlauchstücke waren alle mit Luer-Lock Anschlüssen versehen, so daß Glasspritzen und Kolbenprober problemlos an diese Verbindungen anzuschließen waren. Damit konnten Wasserproben luftblasenfrei aus dem Mikrokosmos entnommen werden (Abb. 2.3B).

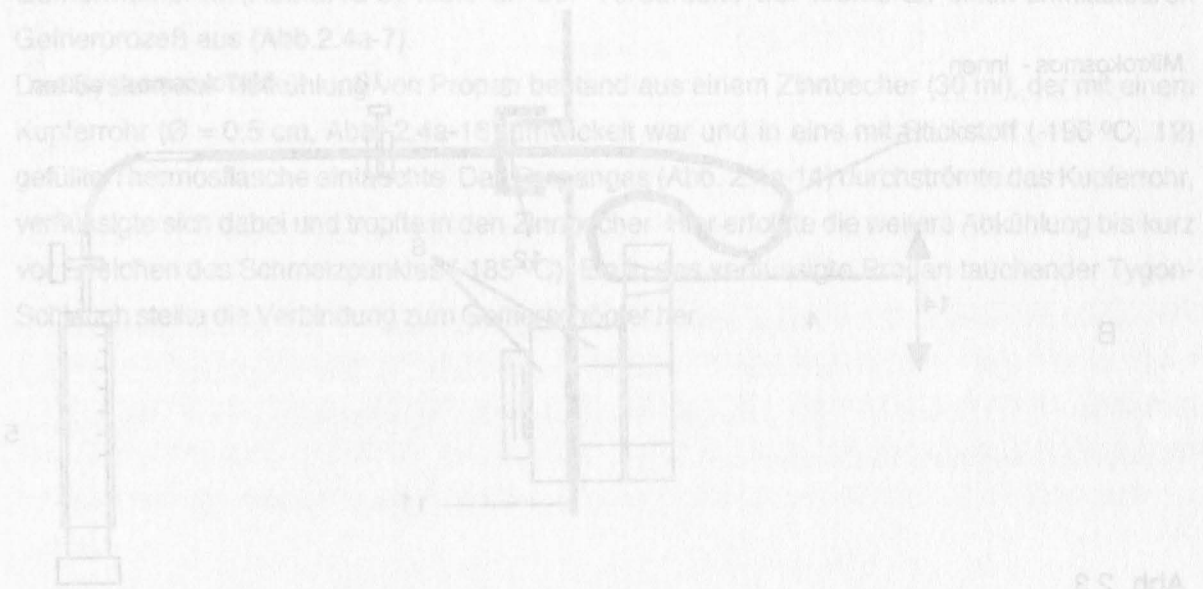


Abb. 2.3

Mikrokosmos (Außenansicht, A) und Detailansicht des Magnetprobers (B).
 1: Deckel, 2: Überlauf, 3: Bohrlochstopfen, 4: Kanüle, 5: Kolbenprober, 6: ml, 8: Magnet,
 7: Mikrowanne innen, 8: Bodenhalter Zulauf, 9: Sperrvorrichtung, 10: Bodenplatte mit Dichtung,
 11: Fixierwand des Mikrokosmos, 12: Dichtung und Gitterstopfen, 13: Schlauchklemme,
 14: Bewegung der Kanüle, 15: Tygon-Schlauch $\varnothing = 1$ mm innen

2.2.1 Der "Gatterschieber" für kleinste Probenmengen in den oxidisch-sulfidischen Grenzschichten des Mikrokosmos
 Die Entnahme größerer Probenmengen (>50ml) aus dem Mikrokosmos mit Hilfe der Magnetprober in Abständen von 2-3 cm führte dazu, daß das Probenwasser nicht mehr "fischgrünlich" war. Wenige Wochen nach Aufbau der Chemokline bildete sich im oxidisch-sulfidischen Grenzschicht des Mikrokosmos eine nur wenige mm breite Trübungszone aus (Foto

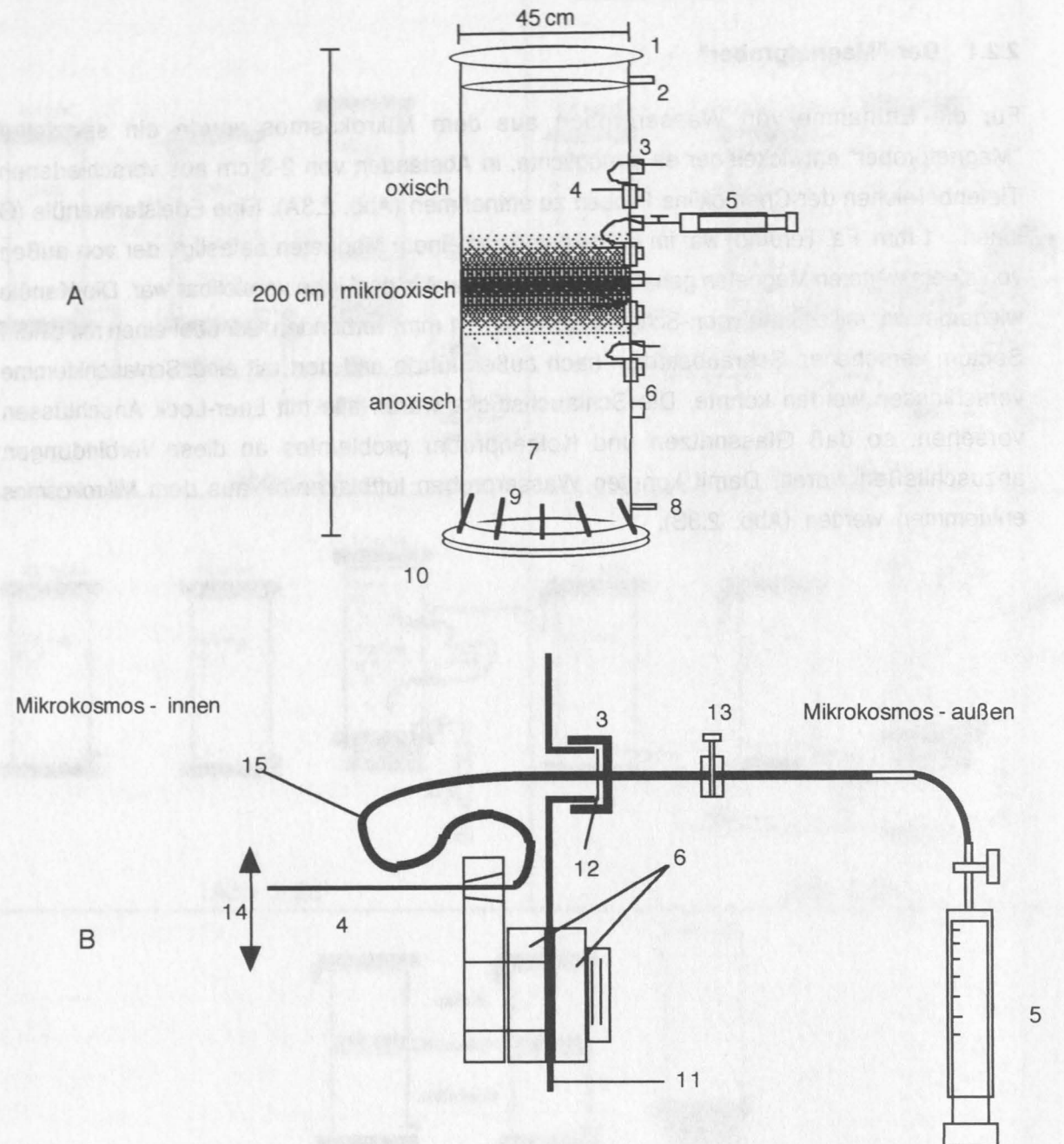


Abb. 2.3

Mikrokosmos (Außenansicht, A) und Detailansicht des Magnetprobers (B).

- 1: Deckel; 2: Überlauf; 3: Schraubstutzen; 4: Kanüle; 5: Kolbenprober 50 ml ; 6: Magnete;
 7: Mikrokosmos innen; 8: bodennaher Zulauf; 9: Spannvorrichtung ; 10: Bodenplatte mit Dichtungsring;
 11: Plexiglaswand des Mikrokosmos; 12: Dichtungsring und Silikonsepten ; 13: Schlauchklemme;
 14: Bewegung der Kanüle; 15: Tygon-Schlauch $\varnothing = 1$ mm innen

2.2.2 Der "Gefrierschöpfer" für kleinskalige Probenahmen in den oxisch-sulfidischen Grenzschichten des Mikrokosmos

Die Entnahme größerer Probenvolumina (>50ml) aus dem Mikrokosmos mit Hilfe der Magnetprober in Abständen von 2-5 cm führte dazu, daß das Probenwasser nicht mehr "tiefenspezifisch" war. Wenige Wochen nach Aufbau der Chemokline bildete sich im oxisch-sulfidischen Grenzbereich des Mikrokosmos eine nur wenige mm breite Trübungszone aus (Foto

1a). Die starke räumliche Heterogenität dieser kleinskaligen Struktur erforderte eine störungsfreie Probennahme unter der Vermeidung von Turbulenzen.

Die Magnetprober waren für die Probennahmen in diesem Bereich nicht mehr geeignet. Für eine verbesserte Auflösung wurde daher eine neue Probennahmetechnik entwickelt, die sich an die SIP- ("Spatial Information Preservation"; Krembs, 1995) Methode anlehnte. Durch schnelles Einfrieren eines kleinen Wasservolumens wurde mit dieser Methode eine räumliche Auflösung bis in den mm-Bereich erreicht.

Für die Probennahme in der Chemokline des Mikrokosmos wurde der Gefrierschöpfer (Abb. 2.4a-9) über eine magnetische Führung (Abb. 2.4a-1) von außen in der Trübungszone der oxisch-sulfidischen Grenzschicht positioniert (Foto 1b).

In die Frontseite des mit Silikon isolierten Schöpfers war eine Silbermembran (Feinsilber, 5 cm lang, 0.5 cm breit, 0.3 mm dick) eingelassen, die mit ihrer Vorderseite direkten Kontakt mit der Trübungszone hatte (Foto 1b). An dieser Oberfläche fand der eigentliche Gefrierprozeß statt. Dazu wurde -185 °C kaltes Propan (Abb.2.4a-14, Fa. Messer Griesheim) über eine Tygon-Schlauchverbindung (Abb.2.4a-4) mit Unterdruck (-0.7 bar, Abb.2.4a-10) in den Gefrierschöpfer (Abb.2.4a-9) gesaugt. Der plötzliche Kontakt des Propans (Abb.2.4a-6) mit der Rückseite der Gefriermembran (Abb.2.4a-5) löste an der Vorderseite der Membran einen unmittelbaren Gefrierprozeß aus (Abb.2.4a-7).

Das System zur Tiefkühlung von Propan bestand aus einem Zinnbecher (30 ml), der mit einem Kupferrohr ($\varnothing = 0.5$ cm, Abb. 2.4a-16) umwickelt war und in eine mit Stickstoff (-196 °C, 12) gefüllte Thermosflasche eintauchte. Das Propangas (Abb. 2.4a-14) durchströmte das Kupferrohr, verflüssigte sich dabei und tropfte in den Zinnbecher. Hier erfolgte die weitere Abkühlung bis kurz vor Erreichen des Schmelzpunktes (-185 °C). Ein in das verflüssigte Propan tauchender Tygon-Schlauch stellte die Verbindung zum Gefrierschöpfer her.

2.3 Abiotische Parameter

2.3.1 Geochemische Sauerstoff- und Sulfidbestimmungen

Während der Expeditionen in die Ostfriesland-See wurden die Proben für die Sauerstoff- und die Sulfidbestimmungen nach dem Überlaufverfahren in WINKLER-Flaschen abgefaßt. Die Sauerstoffbestimmungen erfolgten nach der WINKLER-Methode volumetrisch (Grasshoff et al., 1983). Die Sulfidbestimmung erfolgte ebenfalls nach den Beschreibungen von Grasshoff et al. (1983). Für die Anwendung an Mikrokosmos war es erforderlich die Methoden zur Sauerstoff- und Sulfidbestimmung zu modifizieren. Die Methoden wurden daher soweit in ihren Volumina reduziert, daß sie in 10 ml Glaszylinder reproduzierbar durchgeführt werden konnten.

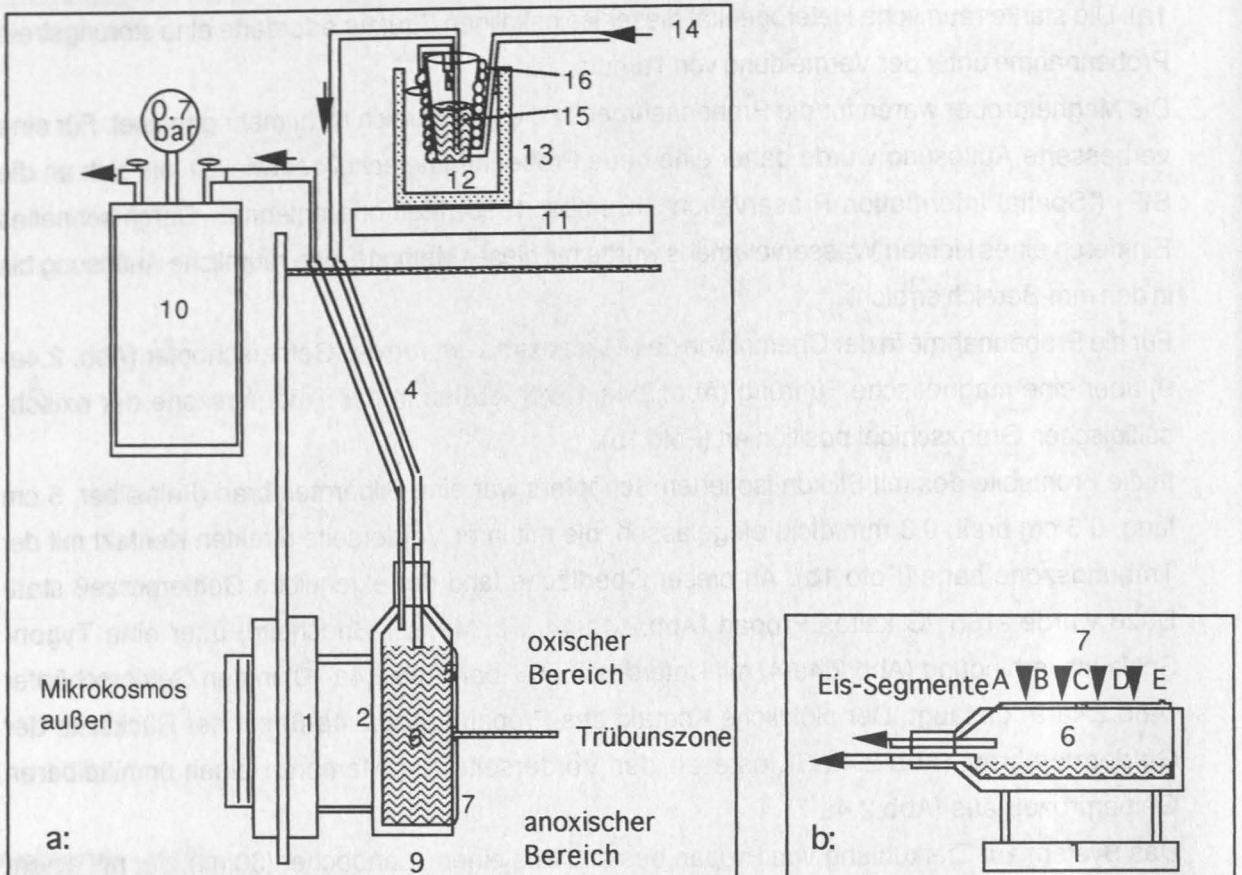


Abb. 2.4a: Schematische Darstellung der Probennahme mit dem Gefrierschöpfer in der oxidisch-sulfidischen Grenzschicht des Mikrokosmos.

Abb. 2.4b: Der Gefrierschöpfer nach der Probennahme und die Zerteilung der Probe in 5 Eis-Segmente (A-E).

1: magnetische Führung, 2: Isolierung aus Silikon, 4: Tygon-Schlauch, 5: Gefriermembran-innen, 6: tiefgekühltes Propan im Gefrierschöpfer, 7: Gefriermembran-außen, 9: Gefrierschöpfer, 10: 0.7 bar Unterdruck, 11: Konsole, 12: flüssiger Stickstoff, 13: Thermosflasche, 14: Propangas, 15: tiefgekühltes Propan, 16: Zinnbecher

Abb. 2.3

Mikrokosmos 10 cm

1: Deckel 7 cm

7: Mikrokosmos

11: Flüssigkeit

14: Gasphase

2.2.1 Gefrierschöpfer

Gefrierschöpfer

Die Gefrierschöpfer

Magnetische

Tygon-Schlauch

Zinnbecher

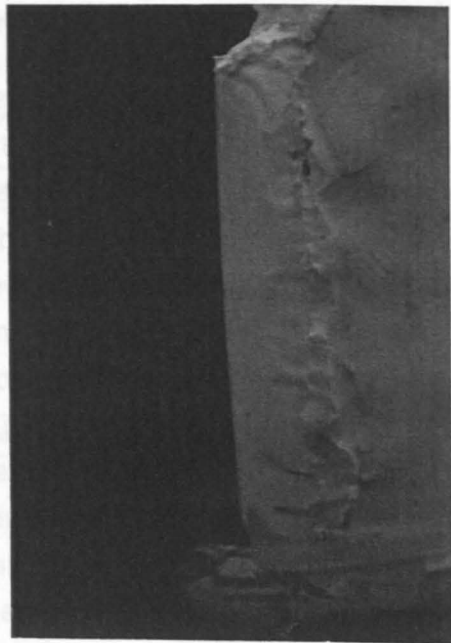
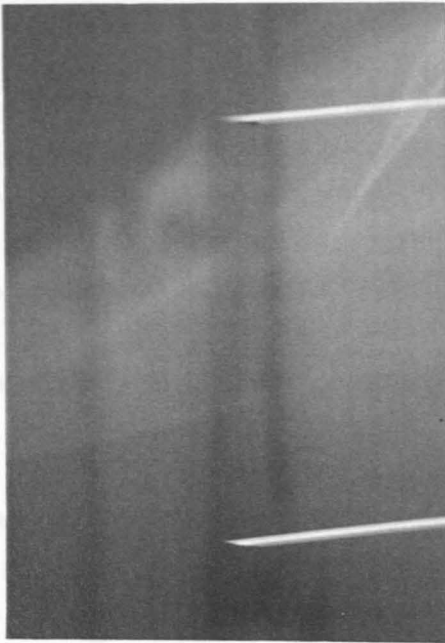


Foto 1a: Die Kanülen der Magnetprober in der Chemokline des Mikrokosmos oberhalb und unterhalb der Trübungszone

Foto 1b: Der Gefrierschöpfer im Mikrokosmos kurz vor der Probennahme

Das Einbringen des Gefrierschöpfers in die Trübungszone (Abb.2.4a-1, Foto 1a) verursachte leichte Turbulenzen an der Oberfläche der Gefriermembran. Um hier eine Restabilisierung zu ermöglichen, wurde vor der Durchführung des Gefriervorganges etwa 1-2 Stunden gewartet.

Nach dem Einsaugen des tiefgekühlten Propanes in den Gefrierschöpfer dauerte der Gefriervorgang etwa 5 Sekunden. Der Schöpfer wurde an dem Magneten aus dem Mikrokosmos herausgezogen und waagrecht gelegt (Abb.2.4b). Das restliche in der Kammer verbliebene Propan (Abb. 2.4b-6) bewirkte eine weitere Kühlung, so daß genügend Zeit blieb, das Eis in 5 je 1 cm lange Segmente zu zerlegen (Abb.2.4b A-E) und die Einzelstücke in sterile Gefäße zu überführen und aufzutauen. Die aufgetauten Proben ergaben Volumina von 50-100 μl . Diese Mengen reichten aus, um in der Probe die optische Dichte ($OD = 540 \text{ nm}$) und die Keimzahlen zu bestimmen.

2.3 Abiotische Parameter

2.3.1 Naßchemische Sauerstoff- und Sulfidbestimmungen

Während der Expeditionen in die Gotland See wurden die Proben für die Sauerstoff- und die Sulfidbestimmungen nach dem Überlaufverfahren in WINKLER-Flaschen abgefüllt. Die Sauerstoffbestimmungen erfolgten nach der WINKLER-Methode titrimetrisch (Grasshoff et al., 1983). Die Sulfidbestimmung folgte ebenfalls den Beschreibungen von Grasshoff et al. (1983). Für die Anwendung im Mikrokosmos war es erforderlich die Methoden zur Sauerstoff- und Sulfidbestimmung zu miniaturisieren. Die Methoden wurden daher soweit in ihren Volumina reduziert, daß sie in 5 ml und 10 ml Glasspritzen reproduzierbar durchgeführt werden konnten.

2.3.2 Lichtleitergestützte Sauerstoffmessungen

Die Sauerstoffbestimmungen in Glasspritzen (5-10 ml) konnten aus Gründen der Reproduzierbarkeit nicht weiter hinsichtlich ihres Probenvolumens verkleinert werden. Deshalb wurde ein neues Meßprinzip eingesetzt, mit dem im Sauerstoff-Sulfid Gradienten des Mikrokosmos praktisch anströmungsfrei die Sauerstoffkonzentration kontinuierlich und *in situ* erfaßt werden konnte. Dieses neue Analyseverfahren nutzt die Fähigkeit des Sauerstoffs, das Fluoreszenzverhalten bestimmter fluorogener Verbindungen (Fluorophore) zu beeinflussen. Die Messung ist an keinen Sauerstoffverbrauch gekoppelt (Kohls et al., 1994). Unter Einbeziehung der Glasfasertechnik eröffnet sich die Möglichkeit, unverfälschte Aussagen über die Sauerstoffkonzentration direkt aus den oxisch-anoxischen Übergangsbereichen zu erhalten. Die Moleküle der verwendeten fluorogenen Substanz bestehen aus einem organischen Ringsystem mit einem zentralen Ruthenium-Molekül. Die Anregungswellenlänge beträgt 480 nm, während die Emission bei 680 nm erfolgt. Vorhandene Sauerstoffmoleküle unterdrücken die Emission. Um diesen Effekt für die Sauerstoffdetektion nutzbar zu machen und gleichzeitig einen faseroptischen Sensor (Optrode) zu erhalten, wurde das Fluorophor auf Kieselgel (LiChrosorb, SI 100, Merck) adsorbiert, in Silikon (Einkomponentensilikon, E43, Wacker) eingebunden und auf der Spitze eines Lichtleiters immobilisiert (Abb.2.5A-4). In dieser Untersuchung kamen einfache Kunststofflichtleiter (Fa. Conrad) zum Einsatz. Aufgrund ihrer größeren Flexibilität waren sie für die Anwendung im Mikrokosmos geeigneter als die sehr unflexiblen Quarz-Lichtleiter (Fa. Laser Components). Das Exzitations-Detektionsystem wurde nach einem einfachen Umbau in einem Spektralfluorimeter (Kontron SFM-25) installiert. Die Einkopplung des Anregungslichtes in den Lichtleiter erfolgte durch einen entsprechend abgestimmten dichroitischen Spiegel. Das von der sauerstoffsensitiven Silikonmatrix emittierte Licht durchlief den Lichtleiter, passierte den dichroitischen Spiegel und wurde vom Photomultiplier des Fluorimeters detektiert (Abb.2.5B-2).

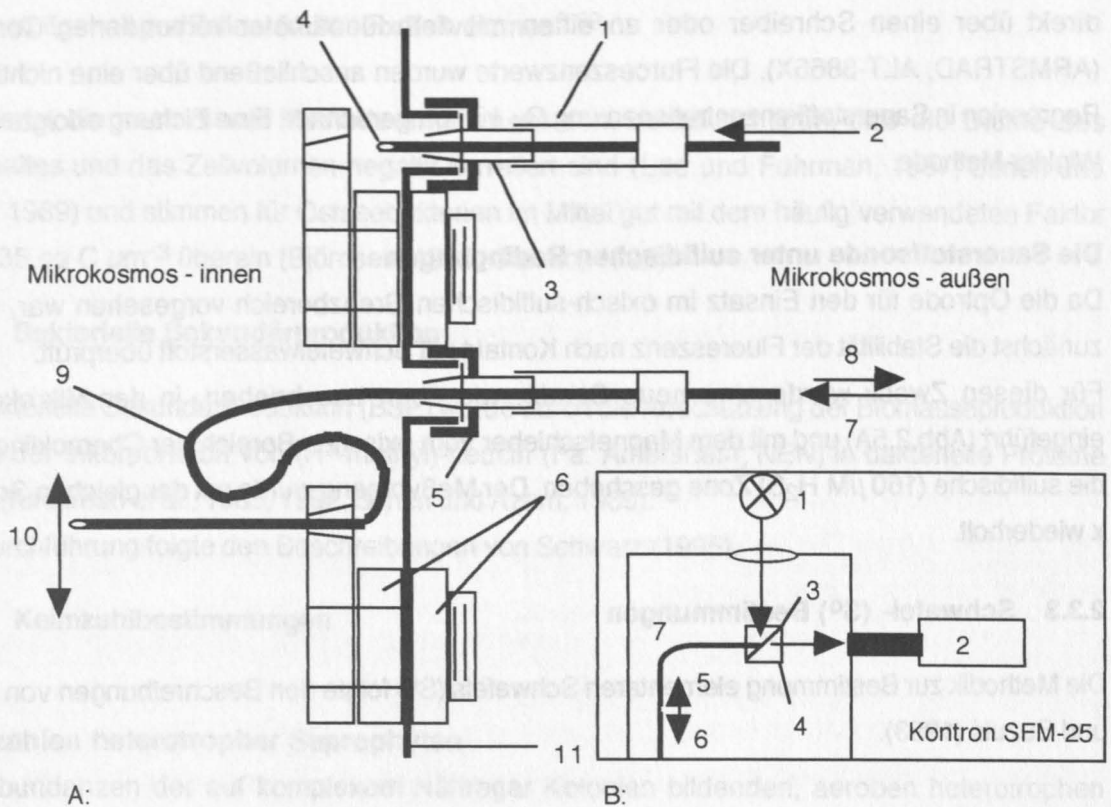


Abb. 2.5A: Einbau einer Sauerstoffoptode in den Mikrokosmos

- 1: Silikonschlauch
- 2: Einführen der Sauerstoffoptode in den Mikrokosmos
- 3: Führungshülse
- 4: Silikonmatrix mit Fluorophor
- 5: Schraubstutzen mit Dichtungsring und Teflon-Septen
- 6: Magnetschieber
- 7: Exzitationslicht 480 nm
- 8: Emissionslicht 680 nm
- 9: Lichtleiter mit Beschichtung
- 10: Bewegung der Sauerstoffoptode im Mikrokosmos
- 11: Plexiglaswand des Mikrokosmos

Abb. 2.5B: Schematischer Aufbau eines Exzitations-Detektionssystems in einem Kontron SFM-25 Fluorimeter.

- 1: Halogenlampe
- 2: Photomultiplier
- 3: dichroitischer Spiegel
- 4: xyz-Feinjustierung
- 5: Emissionslicht 680 nm
- 6: Exzitationslicht 480 nm
- 7: Lichtleiter

Einsatz einer lichtleitergestützten Sauerstoffsonde im Mikrokosmos

Der Einbau der lichtleitergestützten Sauerstoffsonde in den Mikrokosmos erfolgte, indem die Lichtleiter von außen über Führungshülsen in Halterungen geschoben wurden, die an Magnetschiebern im Inneren des Mikrokosmos befestigt waren. So war es möglich, die Optroden über die Magnetschieber vertikal im oxisch-anoxischen Gradienten zu verschieben und die

Sauerstoffmessungen durchzuführen (Abb.2.5A). Die Ausgabe der Daten erfolgte entweder direkt über einen Schreiber oder an einen mit dem Fluorimeter verbundenen Computer (ARMSTRAD, ALT-3865X). Die Fluoreszenzwerte wurden anschließend über eine nichtlineare Regression in Sauerstoffkonzentrationen ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) umgerechnet. Eine Eichung erfolgte mit der Winkler-Methode.

Die Sauerstoffsonde unter sulfidischen Bedingungen

Da die Optrode für den Einsatz im oxisch-sulfidischen Grenzbereich vorgesehen war, wurde zunächst die Stabilität der Fluoreszenz nach Kontakt mit Schwefelwasserstoff überprüft.

Für diesen Zweck wurde eine neue Sonde, wie oben beschrieben, in den Mikrokosmos eingeführt (Abb.2.5A) und mit dem Magnetschieber vom oxischen Bereich der Chemokline bis in die sulfidische ($160 \mu\text{M H}_2\text{S}$) Zone geschoben. Der Meßvorgang wurde mit der gleichen Sonde 3 x wiederholt.

2.3.3 Schwefel- (S^0) Bestimmungen

Die Methodik zur Bestimmung elementaren Schwefels (S^0) folgte den Beschreibungen von Chan und Suzuki (1993).

2.4 Biotische Parameter

2.4.1 Gesamtbakterienzahl und zelluläre Biomasse

Für die Bestimmung der Gesamtbakterienzahlen (GBZ) wurden Proben aus dem Mikrokosmos (5-20 ml) und aus der Gotland See (100 ml) mit partikelfrei-filtriertem Formol (Fa. Merck) fixiert (2% Endkonz.). Die fixierten Proben wurden auf geschwärzte Polycarbonatfilter (Nuclepore, $0.2 \mu\text{m}$, 25 mm) filtriert und 4 min. lang mit 1 ml Acridinorange-Lösung (39 mg in 100 ml partikelfreiem, bidestilliertem Wasser) angefärbt. Anschließend wurden die Filter auf einem mit Immersionsöl (Cargille TypA) beschichteten Objektträger ohne Deckglas bis zur Auswertung (max. 1 Jahr) bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren (Zimmermann, 1977; Hobbie et al., 1977). Die Zählung der Bakterien erfolgte mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop (10er Okular, 100x Öl-Neofluar-Objektiv) unter Blauanregung (Bandpass- Exzitationsfilter: 450-490 nm, FT 510, LP 520). Pro Filter wurden 20 Felder oder mindestens 200 Zellen eines "New Porton-Grid 12" (Graticules Ltd., England) ausgezählt (Vendrick, 1978). Das New Porton Grid enthält neben dem Zählraster zwei Reihen von Kugeln zur Bestimmung der Zellgrößen, deren relativer Durchmesser einer $\sqrt{2}$ Progression folgt. Pro Filter wurden 50 Zellen mit Hilfe dieser Kreise nach Länge und Breite vermessen. Zur Bestimmung der Länge gebogener Bakterien wurde das Segment des in Frage kommenden Kreisumfangs bestimmt. Der Fehler bei der GBZ-Zählung und bei der Volumenbestimmung lag in dieser Untersuchung mit ca. 5 % bzw. ca. 3 % in einem Bereich, der auch in anderen Untersuchungen gefunden wurde (Galvao, 1990; Giesenhausen, 1996).

Das Zellvolumen wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (J. Kuparinen, Finnish Institute of Marine Research, Helsinki) berechnet; der Kohlenstoffgehalt pro Zelle wurde nach der nicht-linearen Funktion von Simon und Azam (1989) ermittelt:

Kohlenstoffgehalt pro Zelle = $92.9219 \times \text{Zellvolumen}^{0.59}$

Die Werte, die nach dieser Methode erhalten werden, berücksichtigen, daß die Dichte des Zellinhaltes und das Zellvolumen negativ korreliert sind (Lee und Fuhrman, 1987; Simon und Azam, 1989) und stimmen für Ostseebakterien im Mittel gut mit dem häufig verwendeten Faktor von $0.35 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$ überein (Björnsen, 1986; Galvao, 1990).

2.4.2 Bakterielle Sekundärproduktion

Die bakterielle Sekundärproduktion (BSP) wurde durch die Abschätzung der Biomasseproduktion mittels der Inkorporation von (H^3 -methyl)-Leucin (Fa. Amersham; NEN) in bakterielle Proteine erfaßt (Kirchman et al., 1985, 1992; Simon und Azam, 1989).

Die Durchführung folgte den Beschreibungen von Schwarz (1995).

2.4.3 Keimzahlbestimmungen

Keimzahlen heterotropher Saprophyten

Die Abundanzen der auf komplexem Nähragar Kolonien bildenden, aeroben heterotrophen Saprophyten wurden auf ZoBell-Agar-Platten (Rezept: siehe Anhang) erfaßt (nachfolgend als cfu ml^{-1} ; cell-forming-units ml^{-1} bezeichnet). Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt (Reichardt, 1978):

1. Titeranpassung durch Verdünnung der Probe mit autoklaviertem, künstlichem Seewasser (SSW-Standardseewasser, aus Standard-Aquarium-Salz "Tropic Marin Neu" Aquarium IfM Kiel.)
- 2.) Ausspateln von 0.1 ml Probe mit einem Glasspatel auf der Agaroberfläche.

Für die Keimzahlbestimmung aerober Saprophyten wurden die beimpften Platten 14 Tage bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend ausgezählt.

Die Keimzahlbestimmung fakultativ anaerober Saprophyten erfolgte nach einer 3-4 wöchigen Inkubation der Platten in Anaerobentöpfen, in denen mit Hilfe eines Katalysatorsystems (Anaerocult C, Merck) eine anoxische Atmosphäre erzeugt wurde.

Keimzahlen auf TCBS-Agar

Durchführung wie oben beschrieben.

Zur Anreicherung von extrem copiotrophen Bakterien wurde ein hoch-selektiver Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS-Agar, Rezept: siehe Anhang) eingesetzt (Kobayashi et al., 1963; Colwell, 1984). Die Auswertung erfolgte nach 2-3 tägiger aerober Inkubation.

Keimzahlen schwefeloxidierender Bakterien

Durchführung wie oben beschrieben.

Für die Keimzahlbestimmungen autotropher und heterotropher schwefeloxidierender Bakterien auf Agarplatten wurde ein Medium nach Imhoff verwendet (Rezept: siehe Anhang; Imhoff, 1988;

Imhoff, 1995). Die Auswertung erfolgte nach 14 tägiger aerober Inkubation.

Miniaturisierte MPN-Technik für NO_3^- - reduzierende Bakterien

Die Durchführung von MPN- ("Most Probable Number") Zählungen NO_3^- - reduzierender Bakterien folgte den Beschreibungen von Piker (1995). Als Nähr- und Verdünnungsmedium wurde ZoBell-Flüssigmedium verwendet, mit KNO_3 als einzigem Elektronenakzeptor (Rezept: siehe Anhang).

2.4.4 "Total Viable Direct Counts" von Bakterien (TVDC)

Während die Keimzahlbestimmung auf Agarplatten zu einer Unterschätzung der Gesamtzahl teilungsfähiger Bakterien führt (Reichardt, 1978), ist die direkte mikroskopische Zählung von Bakterienzellen nicht zur Unterscheidung zwischen teilungsfähigen und inaktiven Zellen geeignet. Die Bestimmung der "Total-Viable-Direct-Counts" nach einer Methode von Kogure et al. (1978) vermittelt zwischen beiden Methoden.

Als bakteriostatisches Agens wurde den zu untersuchenden Proben Nalidixinsäure (sterilfiltriert; Endkonzentration: 0.04 % wt/vol) zugegeben, welche die DNA Replikation und damit auch die Teilung der Zellen spezifisch hemmt (Goss und Cook, 1974). Dies führt in Gegenwart geeigneter Substrate zur Bildung elongierter Zellen und erlaubt deren Zählung unter dem Mikroskop. Aufgrund ihrer hohen RNA Konzentration binden aktive, schnell wachsende Zellen viel Acridinorange und fluoreszieren unter dem Mikroskop (Daley und Hobbie, 1975). Als Wachstumssubstrat wurde den Proben eine Hefeextraktlösung (partikelfrei filtriert, autoklaviert: 30 Min. 120 °C; Endkonzentration: 0.25 % wt/vol) zugegeben. Die so behandelten Proben wurden 17 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit Formaldehyd (2% Endkonz.) fixiert. Zur Auswertung wurden nur elongierte Zellen herangezogen. Die Zählung der elongierten Zellen erfolgte durch Acridinorange-Direktzählung. Der Anteil der TVDC an der Gesamtzellzahl wurde in Prozent angegeben.

2.4.5 Bestimmung Ektoenzymatischer Aktivitäten (EEA) in Mikrotiterplatten

Die Methode zur Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten (EEA) mit fluorogenen Modellsubstraten folgte weitgehend den ausführlichen Beschreibungen von Hoppe (1993). Das Verfahren war standardmäßig als Küvettentest ausgelegt, um die Messungen möglichst problemlos mit gängigen Spektralfluorimetern (z.B. Kontron SFM-25) durchführen zu können. Für die Anwendung im Mikrokosmos wurde die Methode soweit miniaturisiert, daß sie in geschwärzten Mikrotiterplatten (Fa. Flow Laboratories) durchgeführt werden konnte. Die Umarbeitung der fluorimetrischen Küvettentests zum Nachweis mikrobieller Enzymaktivitäten auf Mikrotiterplattensysteme war an Schmitt-Biegel und Obst (1989) angelehnt.

Neben der Reduzierung des Probenvolumens lag der Vorteil eines miniaturisierten Systems in Mikrotiterplatten in der Automatisierung des Messvorganges. Auf einer Mikrotiterplatte konnten gleichzeitig 96 Ansätze inkubiert werden, so daß eben mehreren Parallel-Ansätzen auch noch umfangreiche Verdünnungsreihen möglich waren. Der Einsatz von Mehrkanalpipetten stellte eine weitere Vereinfachung dar. Damit wurde es möglich, neben einer Vielzahl verschiedener

Modellsubstrate auch die entsprechenden Enzym-Substrat-Kinetiken aufzunehmen. Die Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplattenfluorimeter ("Titertek Fluoroscans II", Fa. Flow Laboratories), welches mit einer rechnergestützten Steuer- und Auswerteeinheit gekoppelt war. Eine geringere Sensitivität gegenüber der Messung im herkömmlichen Kontron-Spektralfluorimeter wurde durch längere Inkubationszeiten ausgeglichen. Der große Vorteil der Messung in Mikrotiterplatten lag in dem 10-fach geringeren Probenvolumen, der extrem kurzen Messzeit (96 Ansätze in 30 Sekunden) und der mit einer größeren Datenmenge verbundenen statistischen Absicherung. Die miniaturisierte Inkubation und Messung in Mikrotiterplatten mit Flachboden aus Polystyrol (Fa. Flow Laboratories) wurde daher in dieser Arbeit schwerpunktmäßig eingesetzt.

2.4.5.1 Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten unter oxischen und anoxischen Bedingungen

Für die Erfassung von ektoenzymatischen Aktivitäten in Proben aus oxischen oder anoxischen Bereichen war es erforderlich, die jeweiligen Gaspartialdrucke für die Dauer der Inkubation konstant zu halten. Für routinemäßige Untersuchungen im oxisch-sulfidischen Gradienten des Mikrokosmos erfolgte die Bearbeitung und die Inkubation der Proben daher in einer Anaerobenkammer (Fa. Grenchen, Abb. 2.6).

Die Modellsubstrate (Tab.1) wurden zunächst in Ethylenglycolmonomethylether (Cellosolve; Merck) über Nacht gelöst. Die Verdünnungen erfolgten in einer Titerplatte mit 1 ml Vertiefungen (Abb. 2.6-4) mit sterilem H₂O dest., in Schritten von 15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000, 2000 µM. Alle Kunststoffteile, insbesondere die aus Polystyrol bestehenden Mikrotiterplatten waren für molekularen Sauerstoff durchlässig (Süßmuth et al., 1987) und mußten vor der Inkubation einer reduzierenden Atmosphäre ausgesetzt werden. Der Restsauerstoff in den molekularen Poren des Kunststoffpolymers wurde über Nacht in einer Anaerobenkammer mit Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂; Fa. Messer Griesheim) reduziert.

Für die Inkubation wurden die Verdünnungsstufen der Substrate mit Hilfe einer Mehrkanalpipette (Abb. 2.6-7) parallel aus der 1ml-Titerplatte (Abb. 2.6-4) in 10 µl Portionen in zwei Mikrotiterplatten (Abb. 2.6-3 u. 2) vorgelegt. In diesen Platten fand später die Inkubation und die anschließende Messung statt. Jede Verdünnungsstufe eines Substrates wurde in 3 Parallelen pipettiert, d.h. es lagen 24 Ansätze pro Substrat vor. Auf einer Platte mit 96 Vertiefungen konnten also 4 Substrate (Tab.1) gleichzeitig getestet werden.

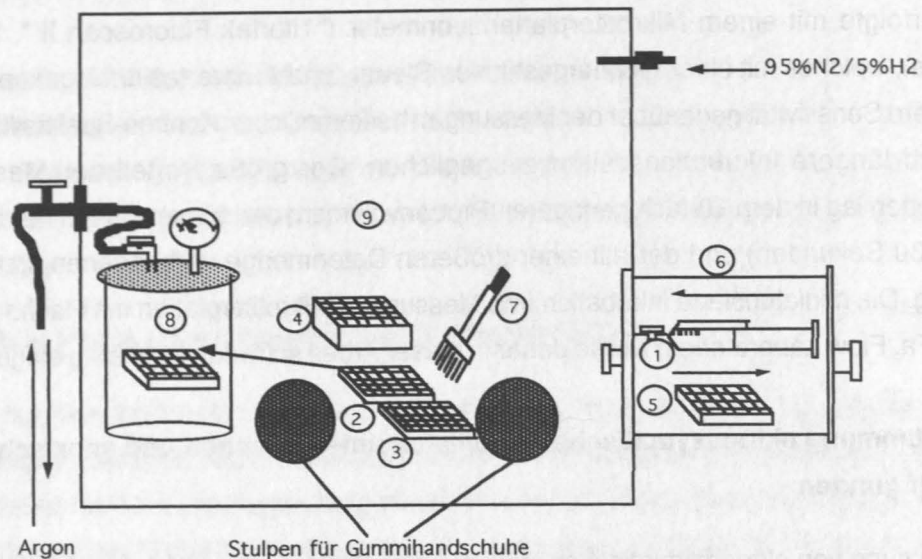


Abb. 2.6: Anoxische Verarbeitung und Inkubation in einer Anaerobenkammer zur Erfassung von ektoenzymatischen Aktivitäten in Mikrotiterplatten.

1: Glasspritze mit Probe, 2-3: Mikrotiterplatten, 4: Titerplatte mit 1 ml Vertiefungen, 5: Mikrotiterplatte (t^0 -Messung), 6: Gasschleuse, 7: Mehrkanalpipette, 8: Anaerobentopf mit Mikrotiterplatte (t^1 -Messung), 9: Anaerobenkammer

Tab. 1

Die zur Bestimmung extrazellulärer Enzymaktivitäten eingesetzten Modellsubstrate

Extrazelluläres Enzym	Substrat-Analog
α -D-Glucosidasen	MUF- α -D-Glucopyranosid
β -D-Glucosidasen	MUF- β -D-Glucopyranosid
Aminopeptidasen	MCA-Leucin
Esterasen und Lipasen	MUF-Butyrat, Heptanoat

MUF = 4-Methylumbelliferyl; MCA = 4-Methylcoumarinyl-7-Amid

Während der Untersuchungen in der Chemokline der Gotland See wurden die Proben für die Bestimmung der ektoenzymatischen Aktivitäten mit einer 50 ml Glasspritze aus 5 L Niskin-Schöpfern luftblasenfrei entnommen. In der Chemokline des Mikrokosmos erfolgten die Probennahmen mit Hilfe der Magnetprober über die tiefenverstellbaren Kanülen (Abb. 2.3B)

Die mit der Probe gefüllten Glasspritzen wurden über eine Gas-Schleuse (Abb. 2.6-6) in die Anaerobenkammer (Abb. 2.6-9) überführt. Mit Hilfe steriler Combitips (Fa. Eppendorf) wurde die Probe aus dem Kolbenprober entnommen und in 100 μ l Portionen in die Vertiefungen der bereits mit den Substraten versetzten Mikrotiterplatten pipettiert. Jede Platte lag als doppelter Ansatz vor. Ansatz 1 (Abb. 2.6-3) diente zur Bestimmung der Anfangsfluoreszenz (t_0 -Wert) und wurde sofort nach Ausschleusen Abb. 2.6-5) aus der Anaerobenkammer im Fluorimeter (Fluoroscan II) gemessen. Ansatz 2 (Abb. 2.6-2) wurde in einen Anaerobentopf (Abb. 2.6-8) überführt und unter einer Argon-(Ar) Atmosphäre inkubiert. Nach Abschluß der Inkubationszeit (4 Std.) wurde

die Fluoreszenzentwicklung auch in dieser Platte gemessen (t_1 -Wert). Der Anstieg der Fluoreszenz, als Ausdruck der ektoenzymatischen Aktivität, errechnete sich aus der Differenz zwischen dem t_1 - und dem t_0 - Wert.

Die Umrechnung der Fluoreszenzänderungen in ektoenzymatische Aktivitäten erfolgte nach einer linearen Umformung der Enzym-Substrat-Kinetiken nach Eadie-Hofstee (Reichardt, 1978) (Abb. 2.7).

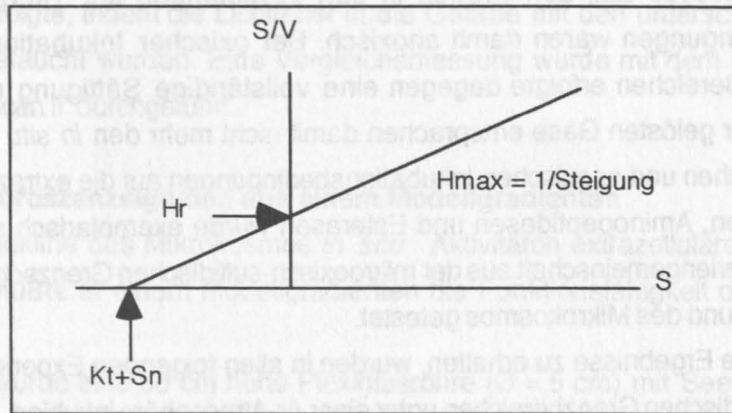


Abb. 2.7: Schematische Darstellung einer Enzym-Substrat Kinetik nach Eadie-Hofstee.

S = Zur Probe zugesetzte Substratkonzentration [μM]; für alle eingesetzten Substrate

wurden die Enzym-Substrat-Kinetiken mit Konzentrationsreihen von 1,5, 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50, 100, 200 μM (Endkonz.) erfaßt.

V = Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit [Fluoreszenzänderung h^{-1}].

H_{max} [$\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$] = Potentielle maximale Hydrolysegeschwindigkeit eines Enzyms bei Enzym-Substrat-Sättigung. H_{max} entspricht dem Kehrwert der Geraden-Steigung.

H_r [% d^{-1}] = Extrapolation der eingesetzten Substratkonzentration gegen 0 erlaubt die Bestimmung der Hydrolyserate der natürlich vorhandenen Substrate, welche durch die zu messenden Enzyme hydrolysiert werden. H_r entspricht dem Schnittpunkt der Geraden mit der y- Achse.

K_t+S_n [μM] = Substratkonzentration bei Erreichen der halbmaximalen

Hydrolysegeschwindigkeit; sie ist ein indirektes Maß für die Größe des Substratpools.

K_t+S_n stellt gleichzeitig ein relatives Maß für die Substrataffinität des Enzyms dar. K_t+S_n entspricht dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse.

2.4.5.2 Der Einfluß von oxischen und anoxischen Inkubationsbedingungen auf die ektoenzymatische Aktivität

Die Beibehaltung der *in situ* Gaspartialdrucke stellte bei der Erfassung ektoenzymatischer Aktivitäten mikroaerob ($< 0.3 \text{ mg l}^{-1} \text{ O}_2$) adaptierter Bakteriengemeinschaften ein besonderes Problem dar. Während der 4-stündigen Inkubation mikrooxischer Proben unter einer Ar-Atmosphäre diffundierte der Restsauerstoff aufgrund des großen Oberflächen- zu Volumenverhältnisses aus den Proben in den Vertiefungen der Titerplatten heraus. Die Inkubationsbedingungen waren damit anoxisch. Bei oxischer Inkubation von Proben aus mikrooxischen Bereichen erfolgte dagegen eine vollständige Sättigung mit Sauerstoff. Die Partialdrücke der gelösten Gase entsprachen damit nicht mehr den *in situ* Bedingungen. Der Einfluß von oxischen und anoxischen Inkubationsbedingungen auf die extrazellulären Aktivitäten von Glucosidasen, Aminopeptidasen und Esterasen wurde exemplarisch an einer mikroaerob adaptierten Bakteriengemeinschaft aus der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht der Chemokline der Gotland See und des Mikrokosmos getestet.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden in allen folgenden Experimenten Proben aus mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereichen unter einer Ar-Atmosphäre inkubiert.

2.4.5.3 Entwicklung eines Prototyps für die lichtleitergestützte fluorimetrische *in situ*-Erfassung ektoenzymatischer Aktivitäten

Die Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten mittels fluorogener Modellsubstrate wurde bisher in Mikroküvetten oder in Mikrotiterplatten durchgeführt. Beim Abfüllen und Pipettieren wurden die Proben jedoch stark durchmischt. Der Gaspartialdruck in der Probe war damit starken Veränderungen unterworfen. Dies wirkte sich besonders auf die ektoenzymatischen Aktivitäten in Proben aus, die aus mikrooxischen oder anoxischen Bereichen stammten.

Enzymbestimmungen im fein abgestuften Sauerstoffgradienten der Chemokline sollten daher unter Beibehaltung des *in situ* Gaspartialdruckes durchgeführt werden. Da zum Zeitpunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine *in situ* Techniken zur Erfassung der ektoenzymatischen Aktivitäten (EEA) bekannt waren, wurden in Vorversuchen die methodischen Grundlagen für eine lichtleitergestützte fluorimetrische *in situ*-EEA-Messung geschaffen.

Die Methodik war speziell für die Bestimmung der EEA in der Chemokline des Mikrokosmos konzipiert. Das Prinzip der lichtleitergestützten EEA-Messung beruhte auf der Übertragung des Anregungslichtes (364 nm) aus einem umgebauten Spektralfluorimeter (Kontron SFM-25) über einen Lichtleiter (Quarz: Fa. Laser Components oder Kunststoff: Fa. Conrad) in den Mikrokosmos. Dort wurde das vorher über eine Kanüle zugegebene fluorogene MUF-Substrat ektoenzymatisch gespalten. Das von dem abgespaltenen MUF-Molekül emittierte Licht (445 nm) wurde von einem 2. Lichtleiter zum Photomultiplier des Fluorimeters zurückgeleitet und über einen Schreiber ausgegeben (Abb.2.8).

Der Meßbereich der lichtleitergestützten EEA-Messung

Vor der eigentlichen Anwendung der lichtleitergestützten EEA-Messung im Mikrokosmos wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Zunächst wurde der Meßbereich ermittelt, in dem über einen flexiblen Kunststofflichtleiter von 60 cm Länge ($\varnothing = 1\text{ mm}$) abgeleitete Fluoreszenzsignale, von dem Fluorimeter noch detektierbar waren.

Für diesen Zweck wurde der Fluoreszenzfarbstoff MCA (4-Methylcoumarinyl-7-Amid) in H_2O dest. gelöst und in einer linearen Konzentrationsreihe von $1.5\text{-}27\ \mu\text{M l}^{-1}$ verdünnt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte, indem die Lichtleiter in die Gefäße mit den unterschiedlichen MCA-Konzentrationen getaucht wurden. Eine Vergleichsmessung wurde mit dem Mikrotiterplatten-Fluorimeter "Fluoroscan II" durchgeführt.

Ableitung von Fluoreszenzsignalen aus einem Modellgradienten

Bevor in der Chemokline des Mikrokosmos *in situ* Aktivitäten extrazellulärer Enzyme erfaßt werden konnten, mußte in einem Modellgradienten die Funktionsfähigkeit des Messprinzips getestet werden.

Zu diesem Zweck wurde eine 30 cm hohe Plexiglasröhre ($\varnothing = 5\text{ cm}$) mit Seewasser ($S = 15$) befüllt und mit Süßwasser überschichtet (Abb. 2.8-8). An der sich ausbildenden Dichtesprungschicht wurde mit Hilfe einer Kanüle 0.5 ml einer 25 mM MUF-Lösung (in Cellosolve gelöst, Fa. Sigma) eingespritzt. Das MUF bildete an der Dichtesprungschicht einen Konzentrationsgradienten aus, der nach Anregung mit einer UV-Lampe sichtbar wurde (Abb. 2.8-9, Foto 2).

Für die Messung des Konzentrationsgradienten wurden zwei Lichtleiter (Abb. 2.8-3) mit dem Anregungslicht (Abb. 2.8-1, 364 nm) und ein weiterer für die Ableitung des emittierten Lichtes (Abb. 2.8-5) zu einem Sensorkopf zusammengefaßt (Abb.2.8-4). Der Sensorkopf war auf einem Schlitten befestigt (Abb. 2.8-6), der von einem Elektromotor (Abb. 2.8-7) angetrieben wurde. Der Sensorkopf wurde so von außen an der Wand der Plexiglasröhre entlanggeführt. Dabei wurden die MUF-Moleküle in der Plexiglasröhre zu einer Fluoreszenz angeregt. Das emittierende Licht wurde an den Photomultiplier (Abb.2.8-2) des Fluorimeters abgeleitet und in relativen Fluoreszenzeinheiten von einem xy-Schreiber aufgezeichnet (Abb.2.8-10).

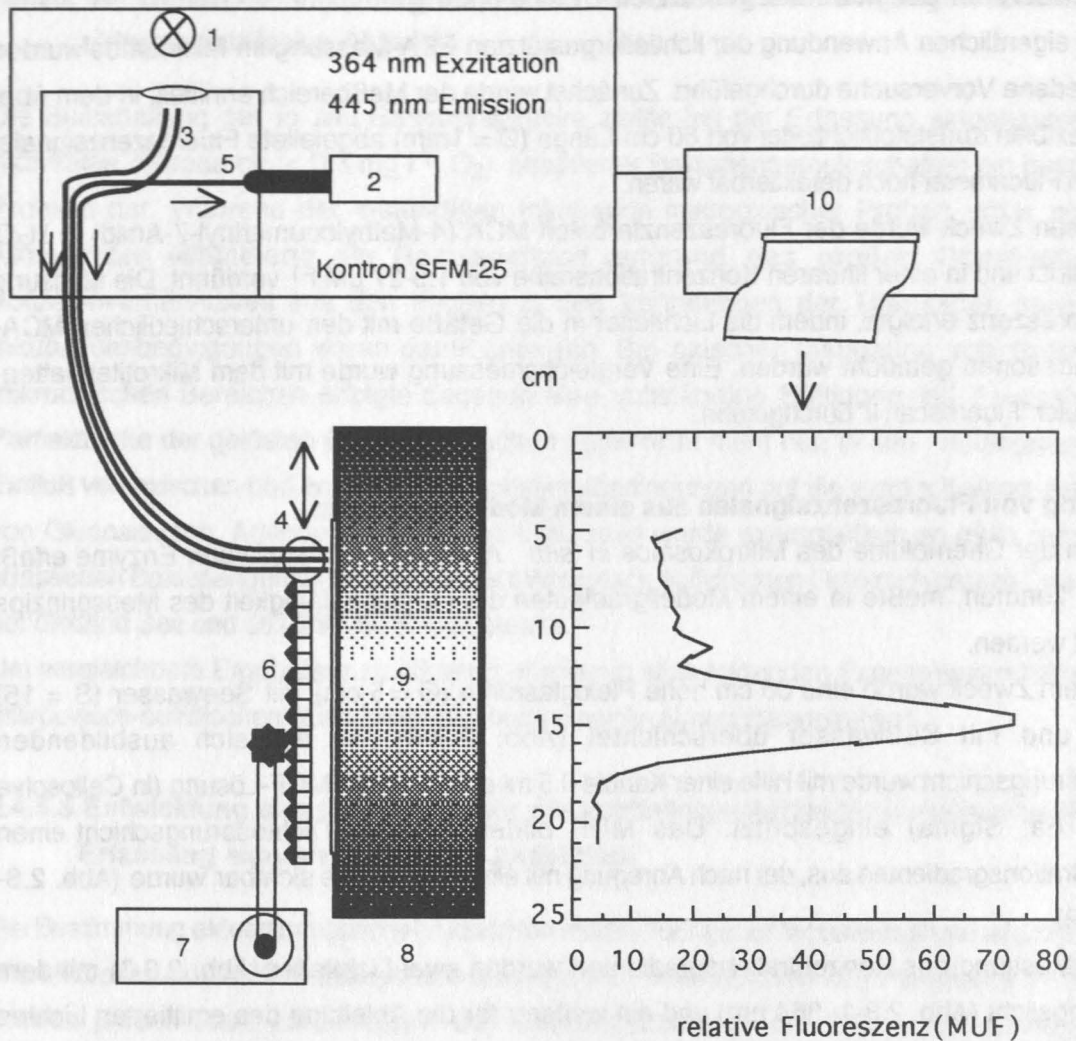


Abb. 2.8: Versuchsaufbau zur Aufzeichnung von Fluoreszenzsignalen (Foto 2) aus einem Modellgradienten.

1: Anregungslicht (364 nm); 2: Photomultiplier; 3: Lichtleiter mit Anregungslicht; 4: Sensorkopf; 5: Emittierendes Licht (445nm); 6: beweglicher Schlitten; 7: Elektromotor; 8: Plexiglasröhre; 9: MUF-Gradient; 10: xy-Schreiber

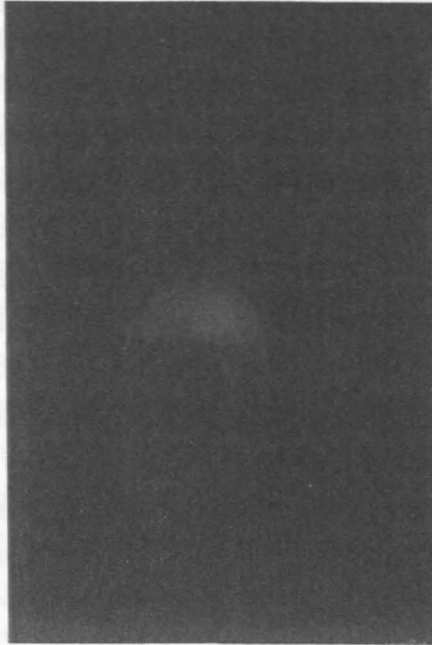


Foto 2: Durch eine UV-Lampe zur Fluoreszenz angeregtes MUF in einem Modellgradienten.

2.4.5.4 Lichtleitergestützte *in situ* Bestimmung der relativen Aktivitäten der Esterasen in der Chemokline des Mikrokosmos

Da sich die lichtleitergestützte *in situ* Messung durch eine geringe Sensitivität auszeichnete, wurde für eine erste *in situ* Bestimmung der relativen Aktivitäten der Esterasen im Mikrokosmos ein Substratanalog eingesetzt, welches sehr schnell ektoenzymatisch gespalten wurde. Die Spaltung von MUF-Butyrat durch unspezifische Esterasen setzte innerhalb weniger Stunden ausreichende Mengen fluorogener MUF Moleküle frei, so daß eine meßbare Signalintensität gewährleistet war.

Mit Hilfe einer Kanüle wurden 5 ml einer 25 mM MUF-Butyrat-Lösung (in Methyl-Cellosolve gelöst) gleichmäßig in der Chemokline des Mikrokosmos über einen Bereich von 90 cm verteilt. Da nur eine einzige Substratkonzentration eingesetzt wurde, entsprach die Messung einer "ein Punkt" Bestimmung. Die Messung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Hierfür wurde der Sensorkopf, wie im Vorversuch, von außen an der Wand des Mikrokosmos entlang über den Bereich der Chemokline geführt. Das Fluoreszenzsignal wurde an das Fluorimeter weitergeleitet und von einem xy-Schreiber in Form relativer Fluoreszenzeinheiten aufgezeichnet.

2.4.6 Die mikrobielle heterotrophe Aktivität

Die Aufnahme gelöster organischer Verbindungen durch Bakterien folgt der Michaelis-Menten Kinetik (Reaktion 1. Ordnung; Reichardt, 1978). Aus der linearen Umformung einer solchen Aufnahmekinetik, dem Lineweaver-Burk Plot, können unter anderem die maximale Aufnahmegeschwindigkeit (V_{\max}) und die Turnoverzeit bzw. die Turnoverrate (Tr) bestimmt werden (Wright und Hobbie, 1966; Gocke, 1977). V_{\max} bezeichnet das Potential einer mikrobiellen Gemeinschaft, eine spezifische Verbindung zu nutzen, während Tr die Aufnahme des natürlich vorhandenen Substratpools in Prozent pro Tag angibt. In der vorliegenden Arbeit

wurden die Umsetzungen der radioaktiven Monomere von C¹⁴-Glucose als universelle C-Quelle und von H³-Leucin als Proteinbaustein erfaßt. Die Bestimmungen erfolgten nach der "single concentration method" (Wright und Hobbie, 1966; Williams und Askew, 1968; Gocke, 1977) Während der Expedition 1993 in die Gotland See erfolgten die Inkubationen in 50 ml Schliffflaschen. Die Proben aus dem sulfidischen Bereich der Chemokline wurden unter einer N₂-Atmosphäre nach dem Überlaufverfahren abgefüllt. Da während der Expedition 1994 alle Proben aus dem Bereich der ehemaligen Chemokline oxisch waren, wurden die Ansätze auf 20 ml reduziert und die Inkubationen erfolgten unter oxischen Bedingungen in Plastikvials. Die Inkubationen für die Tr-Bestimmungen erfolgten nach Zugabe von 0.002 µCi ml⁻¹ (3 Parallelen, 1 Blindwert) für 2-4 Stunden unter *in situ* Temperaturen. Nach dem Abstoppen der Reaktionen mit 0.1 - 0.3 ml Formol (37 %) wurden die Proben auf 0.2 µm Membranfilter (0.25 mm Zellulose-Nitrat- oder Zellulose-Acetat-Filter, Fa. Sartorius) filtriert. Anschließend wurde mit 0.45 µm vorfiltriertem Seewasser oder einer partikelfrei-filtrierten, isotonischen Kochsalzlösung nachgewaschen und die Filter in den Scintillationscocktail überführt. Nach 1-2 Tagen wurden die Zerfälle pro Minute (dpm) im Scintillationszähler ermittelt.

Während der Untersuchungen im Mikrokosmos wurde mit reduzierten Probenvolumina gearbeitet. Die Inkubationen erfolgten in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Zugabe von 0.01 µCi / 2 ml Probe (3 Proben, 1 Blindwert). Die Befüllung der Reaktionsgefäße erfolgte unter einer Ar-Atmosphäre. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0.05 ml Formol (37 %) gestoppt. Nach Zentrifugation (10 000 x g, 10 Min.) und abziehen des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße 2 mal mit je 1 ml isotonischer Na-Lösung gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde erneut abzentrifugiert. Danach wurden die Gefäße mit je 2 ml Scintillationscocktail aufgefüllt und nach 1-2 Tagen im Scintillationszähler gemessen.

Die Tt bzw. Tr von Glucose und Leucin wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Tt [h] = cpm_{ZU} \times t \times (cpm_S - cpm_B)^{-1}$$

$$Tr [\% d^{-1}] = 24 \times 100 Tt^{-1}$$

cpm_{ZU} : Menge der zur Probe gegebenen radioaktiven Substanz in 'counts' pro Minute (cpm);

cpm_S - cpm_B : Menge der von den Bakterien aufgenommenen radioaktiven Substanz in cpm, abzüglich des Blindwertes;

t: Inkubationszeit [h].

2.4.7 Denaturierende Gel Gradienten Elektrophorese (DGGE)

Die von Muyzer et al. (1993) modifizierte DGGE-Technik (Fischer und Lerman, 1979) stellt einen neuen Ansatz für die direkte Bestimmung der genetischen Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften dar. Die extrahierte und gereinigte, genomische Gesamt-DNA der natürlichen bakteriellen Gemeinschaften der Gotland See, des Mikrokosmos und von Einzelisolaten diente hierbei als Ausgangs-DNA (template) für die PCR (Polymerase Chain Reaction; Saiki et al., 1985). Mit zwei universellen Primern, welche an die konservativen Regionen 341 und 534 der

16S rDNA des "templates" binden (Medlin et al., 1988), wird in der PCR-Reaktion die variable Region V3 amplifiziert. Nach der PCR liegen gleich lange DNA-Fragmente vermehrt (amplifiziert) vor. Wird beispielsweise die DNA einer Reinkultur als "template" in die PCR eingesetzt, so haben alle amplifizierten Fragmente die gleiche Sequenz. Handelt es sich um eine mikrobielle Gemeinschaft, so entspricht die Anzahl der Fragmente mit unterschiedlichen Sequenzen der Anzahl der genetisch unterscheidbaren taxonomischen Gruppen (für den Bereich der V3 Region). In der anschließenden Denaturierenden Gel Gradienten Elektrophorese (DGGE; Muyzer et al., 1993). werden die Fragmente dann sequenzspezifisch in einzelne Banden aufgetrennt, so daß einzelne taxonomische Gruppen im Gel einzelne Banden bilden. Man erhält so einen Eindruck von der genetischen Diversität einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft. Veränderungen im Bandenmuster können als Hinweis auf eine Umstrukturierung der Artenzusammensetzung innerhalb einer Gemeinschaft interpretiert werden.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente wird erreicht, indem ein linearer Anstieg der Denaturierungsbedingungen in einem Polyacrylamid Gel erzeugt wird. Als denaturierende Chemikalien dienen Harnstoff und Formamid (Fa. Sigma). Beide bewirken in definierten Konzentrationen die Denaturierung doppelsträngiger DNA-Fragmente im Gel.

Die Trennung im Gel beruht auf der im Vergleich zur intakten DNA, reduzierten elektrophoretischen Mobilität teilweise denaturierter DNA Moleküle im Polyacrylamid Gel. Die Denaturierung der Fragmente vollzieht sich in den sogenannten Schmelzbereichen. Dies sind Gelbereiche mit Denaturierungsbedingungen, die ein Schmelzen (Denaturieren) von DNA-Doppelsträngen mit gleichen Schmelztemperaturen bewirken. Erreicht ein DNA Doppelstrang seinen Schmelzbereich im Gel, so findet ein Übergang von der helicalen zu einer teilweise geschmolzenen Struktur statt. Dies hat zur Folge, daß die elektrophoretische Mobilität praktisch vollständig zum Erliegen kommt. Da die Schmelztemperatur der Doppelstränge abhängig von der Sequenzvariation ist, kommen DNA Stränge mit unterschiedlichen Sequenzen auch in verschiedenen Bereichen des Gels zum Stillstand.

Um in der Praxis ein definierteres Schmelzverhalten und damit eine klarere Trennung von DNA-Fragmenten auch auf dem Niveau eines einzelnen Basenpaares zu erhalten, wird eine 40 Basenpaare lange, GC reiche Region (GC-Klammer) an das 5'-Ende eines Primers eingeführt. Damit ist theoretisch eine Trennung von DNA-Fragmenten bis zum Artniveau möglich (Muyzer et al., 1993)

Die DGGE-Analyse setzt sich aus folgenden drei Einzelschritten zusammen:

- 1.) Extraktion und Reinigung bakterieller genomischer Gesamt-DNA
- 2.) PCR-Amplifikation charakteristischer Sequenzabschnitte (V3-Region der 16S rDNA)
- 3.) Trennung der amplifizierten Fragmente in der DGGE

2.4.7.1 Extraktion und Reinigung genomischer Gesamt-DNA aus bakteriellen Gemeinschaften und Einzelisolaten

Die Extraktion und Reinigung der genomischen bakteriellen Gesamt-DNA aus Einzelisolaten und bakteriellen Gemeinschaften folgte einem QIAGEN - Protokoll (Fa. Diagen).

Für Extraktionen und Reinigungen genomischer Gesamt-DNA aus den bakteriellen Gemeinschaften des Mikrokosmos wurde 50 ml Probenwasser abzentrifugiert (15 Min., 15 000 x g), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Quiagen-Lysepuffer resuspendiert (siehe Anhang).

Gesamt-DNA Extraktionen aus mikrobiellen Gemeinschaften der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994 wurden an 4l Filtraten auf PV-Filter (0.2µm, Fa. MILLIPORE) vorgenommen. Die Filter wurden in kleine Stücke zerschnitten und wie oben resuspendiert.

DNA Extraktionen aus Einzelisolaten erfolgten, indem Einzelkolonien direkt von der Agarplatte abgeimpft, in 2 ml Eppendorfhütchen überführt und wie oben resuspendiert wurden.

Nach Durchlaufen des Quiagen-Protokolls lag die DNA hochrein vor und konnte direkt der PCR unterzogen werden.

2.4.7.2 Verwendete Primer und die mit der PCR amplifizierten Bereiche

Mit der PCR wurde die variable Region V3 der 16S rDNA amplifiziert (Abb. 2.9).

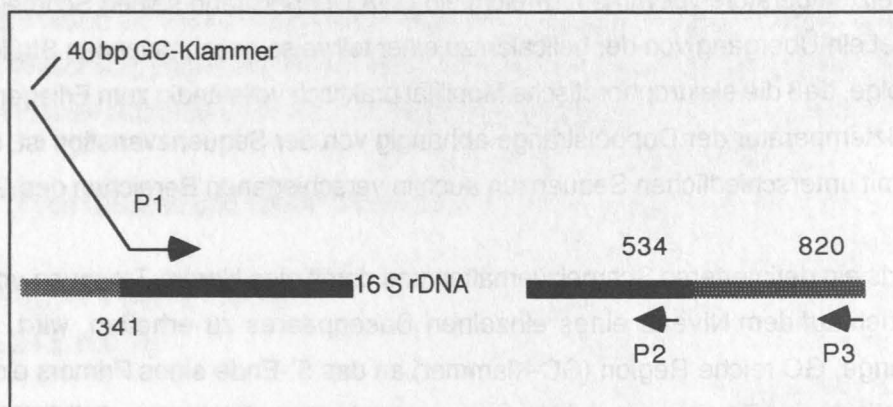


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der rDNA Region, die mit den Primern P1, P2 und P3 mit der PCR amplifiziert wurde.

Primer P1 bindet an dem 5'-Ende eine 40 Basenpaar (bp) lange GC-reiche Nucleotidsequenz (GC-Klammer).

Die mit der Primerkombination P1 und P2 amplifizierten Bereiche der 16S rDNA entsprachen den Positionen 341 und 543 in *E. coli*. Der amplifizierte Bereich der 16S rDNA hatte eine Länge von 193 bp. Zusammen mit der GC-Klammer erreichten die Fragmente eine Länge von 233 bp. Die mit der Primerkombination P1 und P3 amplifizierten Fragmente hatten insgesamt eine Länge von 519 bp.

Sequenzen der verwendeten Primer: siehe Anhang

2.7.4.3 "Touchdown"- PCR (Don und Cox, 1991)

Um die "template" DNA zu denaturieren, wurden die PCR-Ansätze im Thermozykler (MJ-Research, Fa. Biozyme) zunächst für 5 Min. auf 94 °C erhitzt. Dann folgte eine Erniedrigung auf 80 °C und die Zugabe von 0.25 U *Taq* DNA Polymerase. Diese sog. "hot start technique" wurde eingesetzt, um die unspezifische Bindung der Primer an die DNA möglichst gering zu halten. Es folgte eine schrittweise Erniedrigung der Temperatur auf 65 °C für 1 Minute. Diese Temperatur lag etwa 10 °C oberhalb der optimalen Bindungstemperatur ("annealing" Temperatur) der Primer an die "template" DNA. Nach jedem Zyklus wurde die Temperatur um 0.5 °C erniedrigt, bis der "touch down" von 55 °C erreicht war. Bei dieser Temperatur wurden noch weitere 10 Zyklen durchgeführt. Diese Vorgehensweise sollte die Bildung von Nebenprodukten während der Amplifikation zusätzlich unterdrücken.

Die Primer Elongation ("extension") erfolgte bei 72 °C für 3 Minuten.

Die Kontrolle der Amplifikationsprodukte erfolgte nach elektrophoretischer Trennung in einem 1.5% (wt/vol) NuSieve Agarose Gel (Fa. Biozym) in 1x TAE -Puffer (pH 7.4, siehe Anhang) und anschließender Färbung in einer Ethidiumbromid-Lösung unter einem Transilluminator (Fa. Bachofer, 312 nm).

Zusammensetzung der PCR: siehe Anhang

2.4.7.4 Aufbau des Gradienten Gels

Für den Aufbau eines linearen Denaturierungsgradienten mit Denaturierungsbedingungen von 15% bis 55% im Polyacrylamidgel wurden die 8% Acrylamidlösungen (Lösungen A und B, siehe Anhang) in folgenden Verhältnissen gemischt.

Für 15% Denaturierungsbedingungen:

In 50 ml Röhrchen auf Eis mischen: 2.4 ml Lösung A

10.6 ml Lösung B

6 µl TEMED, 45 µl APS (20%)

Für 55% Denaturierungsbedingungen:

In 50 ml Röhrchen auf Eis mischen: 8.9 ml Lösung A

4.1 ml Lösung B

6 µl TEMED, 45 µl APS (20%)

Für 0% Denaturierungsbedingen im Abschlußgel:

In 50 ml Röhrchen auf Eis mischen : 6 ml Lösung B

3 µl TEMED, 21 µl APS (20%)

TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin, Sigma)

APS (Ammonium Persulfat, Sigma)

Das Gießen des Gradienten Gels erfolgte mit einem Gradientenmischer (GM-40, Fa. C.B.S. Scientific Company, Inc.). Dazu wurde die Lösung mit 55% Denaturierungsbedingungen in die

rechte Vertiefung und die Lösung mit 15% Denaturierungsbedingungen in die linke Vertiefung des Gradientenmischers gegossen und anschließend mit einer peristaltischen Pumpe (2 ml Min.⁻¹) aus dem Gradientenmischer in die Gelkammer (1 mm Geldicke) gepumpt. Zuletzt wurde die 0% Lösung als Abschlußgel in die Kammer gefüllt und der Kamm eingesetzt. Die Polymerisationszeit betrug 60 Minuten.

2.4.7.5 Die Elektrophorese

Nach Ablauf der Polymerisationszeit und Ziehen des Kammes wurden die PCR-Produkte auf das Gel aufgetragen (5 µl PCR-Produkt, 5 µl Milli-Q Wasser, 5 µl gel loading solution). Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 60 °C in 0.5x TAE-Puffer (Fa. C.B.S. Scientific Company, Inc.) durchgeführt. Nach 4 Stunden erfolgte die Färbung des Gels für 15 Minuten in einem Milli-Q Wasserbad mit Ethidiumbromid (0.5 mg l⁻¹) und eine 10 minütige Entfärbung in einem Milli-Q Wasserbad. Die Photographie (Polaroid-Film 667) des Gels wurde auf einem Transilluminator (Fa. Bachofer, 312 nm) mit einer Sofortbildkamera vorgenommen. Nach dem Einscannen der Polaroidphotos mit einem Flachbettscanner in den Computer folgte die Weiterverarbeitung mit einer Bildverarbeitungssoftware ("photoshop", Fa. Microsoft).

2.4.7.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Qualität der Trennung von Isolaten aerober heterotropher Saprophyten durch die DGGE wurde für lange (519 bp) und kurze DNA-Fragmente (223 bp) getestet .

Aus Einzelisolaten aerober heterotropher Saprophyten aus dem mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Chemokline des Mikrokosmos wurde die genomische Gesamt-DNA extrahiert, gereinigt und mit der PCR amplifiziert. Die PCR-Amplifikationen erfolgten mit den Primerkombinationen P1 und P2 (233bp: kurzes Fragment) sowie mit der Primerkombination P1 und P3 (519 bp: langes Fragment).

Mit verschiedenen Isolaten und einer Bakteriengemeinschaft aus der Gotland See wurden Auftrennungen im DGGE-Gel vorgenommen. Die Amplifikation und Trennung kurzer Fragmente (233 bp) bis zum Artniveau war bereits durch Muyzer et al. (1993) dokumentiert. Die Amplifikation längerer Fragmente (519bp) hatte den Vorteil, daß mehr Sequenzvariationen zu erwarten waren und damit vermutlich eine bessere Trennung der Fragmente erreicht werden konnte.

2.5 Mikrobielle Untersuchungen in Chemoklinen

2.5.1 Adaptationen der mikrobiellen Gemeinschaft an die Bedingungen in der Chemokline des Mikrokosmos

Nach der Unterschichtung der Experimentalsäulen mit sulfidischem Wasser und der Ausbildung der Chemokline setzte die Adaptation der mikrobiellen Gemeinschaften an die neuen Bedingungen in der Chemokline des Mikrokosmos ein.

Der Verlauf dieser Anpassungsphase wurde nach Aufbau des Gradienten während der ersten

zwei Wochen, nach 4 Wochen und nach 2-3 Monaten über die Veränderungen der Sauerstoff- und Sulfidwerte in der Chemokline verfolgt. Gleichzeitig wurden die Reaktionen der bakteriellen Gemeinschaft auf die neuen Bedingungen in der Chemokline anhand ihrer Zellzahl- und zellulären Biomasseänderungen verfolgt. Die Auswirkungen der Chemokline auf die Teilungsfähigkeit der Bakterien wurde durch die Bestimmung der "Total Viable Direct Counts" (TVDC) erfaßt.

Die Probenahmen wurden in 5 Tiefenhorizonten des Mikrokosmos in Abständen von 2 bis 4 cm mit Hilfe der Magnetprober durchgeführt (Abb. 2.3-A,B).

2.5.2 Die mikrobielle Gemeinschaft in der Chemokline des Mikrokosmos

Um die Adaptation der mikrobiellen Gemeinschaft an die Bedingungen in der Chemokline zu gewährleisten, ging den Untersuchungen im Mikrokosmos eine 4 wöchige Etablierungsphase voraus. Vor und während der gesamten Untersuchungsphase wurden dem Mikrokosmos von außen keine zusätzlichen organischen oder anorganischen Nährstoffe zugeführt. Um erste Hinweise über potentielle kausale Beziehungen zwischen der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft und der Funktion der Einzelkomponenten zu erhalten, wurden die Keimzahlen heterotropher NO_3^- -reduzierender Bakterien sowie aerober heterotropher Saprophyten mit bakteriellen Aktivitätsparametern in der Chemokline in Beziehung gesetzt.

Im Mikrokosmos wurden Proben mit Hilfe der Magnetprober aus 6 Tiefen innerhalb der Chemokline entnommen. Diese Tiefen lagen in einem Abstand von jeweils 5 cm über einen Bereich von 30 cm innerhalb der Chemokline (Abb. 2.3A).

Mit Hilfe des Gefrierschöpfers wurden gleichzeitig kleinskalige Probenahmen im cm-Maßstab in der oxisch-sulfidischen Grenzschicht des Mikrokosmos vorgenommen. Hierbei wurden sowohl die Keimzahlen von aeroben heterotrophen Saprophyten als auch von autotrophen und heterotrophen schwefeloxidierenden Bakterien erfaßt. Als Begleitparameter wurde die Konzentration elementaren Schwefels nach Chan (Chan und Suzuki, 1993) bestimmt. Durch die Messung der optischen Dichte (OD = 540 nm) wurde die Lage der Trübungszone in der oxisch-sulfidischen Grenzschicht bestimmt.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

- Sauerstoff und Sulfidkonzentrationen
- Konzentrationen elementaren Schwefels
- extrazelluläre Aktivitäten der Amino-peptidasen
 - α -Glucosidasen
 - β -Glucosidasen
 - Esterasen
- Turnoverraten von C^{14} -Glucose
- bakterielle Sekundärproduktion (BSP) mit H^3 -Leucin
- Gesamtbakterienzahlen
- Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten
- Keimzahlen heterotropher und autotropher Schwefeloxidierer
- MPN-Zahlen anaerober heterotropher NO_3^- -reduzierender Bakterien

2.5.3 Die mikrobielle Gemeinschaft in der Chemokline der Gotland See 1993

In dieser Untersuchung sollte festgestellt werden, wie sich die wechselnden oxisch-sulfidischen Bedingungen in der Chemokline der Gotland See in den Abundanzen und Aktivitäten der mikrobiellen Gemeinschaften im Tiefenprofil widerspiegeln. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit Messungen in Beziehung gesetzt, die vergleichend an einer Chemokline im Mikrokosmos durchgeführt wurden. Die Vergleichsmessungen dienten zur Verifizierung des Mikrokosmos als Modellsystem zur Simulation von Chemoklinen im Freiwasser.

Vor der Probennahme innerhalb der Chemokline der Gotland See im April 1993 wurde die vertikale Lage und Ausdehnung des oxisch-anoxischen Übergangsbereiches an Bord des F.S. Alkor mit Hilfe einer Sauerstoffsonde (Kieler Multisonde) festgestellt. Die Probennahmen erfolgten mit 5 l Niskinschöpfern am Seriendraht. Die Schöpfer wurden in Abständen von 2.5 m in 6 Tiefen im Bereich der Chemokline (120-135 m) positioniert. Das Abfüllen der Proben aus den Schöpfern erfolgte unter Stickstoffbegasung. Probenwasser zur Bestimmung von ektoenzymatischen Aktivitäten wurde luftblasenfrei in 50 ml Glasspritzen aufgezogen, in eine Anaerobenkammer überführt und dort weiterverarbeitet. Material welches zur Bestimmung von Turnoverraten mittels radioaktiv markierter Monomere vorgesehen war wurde nach dem Überlaufverfahren in 50 ml Schliffflaschen abgefüllt. Probenwasser zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahlen wurde in 100ml Flaschen abgefüllt und mit Formol fixiert (2 % vol/vol). Proben für die Sauerstoff- und Sulfidbestimmungen wurden ebenfalls nach dem Überlaufverfahren in Winkler-Flaschen abgefüllt.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

- Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen
- extrazelluläre Aktivitäten der Aminopeptidasen
 - α -Glucosidasen
 - β -Glucosidasen
 - Esterasen
- Turnoverraten von C¹⁴-Glucose
 - H³-Leucin
- Gesamtbakterienzahlen
- zelluläre Biomassen

2.5.4 Die taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften und deren ektoenzymatischen Potentiale in der Chemokline des Mikrokosmos unter dem Einfluß von Durchmischung, Stagnation und Eutrophierung

Mit diesem Experiment sollten charakteristische Veränderungen in der taxonomischen Struktur mikrobieller Gemeinschaften in der Chemokline des Mikrokosmos über mehrere Wochen mit Änderungen des ektoenzymatischen Potentials in Beziehung gesetzt werden. Diese Veränderungen wurden hervorgerufen, indem das bisher statische System der Chemokline im Mikrokosmos durch Turbulenzen im mikrooxisch-sulfidischen Bereich teilweise aufgehoben

wurde.

Außerdem wurde der Einfluß von allochthonem organischem Material auf die ektoenzymatische Aktivität und die taxonomische Struktur einer oligotrophen Gemeinschaft in der Chemokline untersucht.

Das über 6 Wochen dauernde Experiment bestand aus 4 aufeinanderfolgenden Sukzessionsperioden.

Die Stagnationsperiode: Hier sollte die Struktur und die Aktivität einer mikrobiellen Gemeinschaft in einer Chemokline unter stagnierenden Bedingungen untersucht werden. 2-3 Monate nach der Etablierung einer Chemokline war der stagnierende, oxisch-anoxische Übergangsbereich im Mikrokosmos durch eine Trübungszone gekennzeichnet (Foto 1a). Dem System wurde von außen kein zusätzliches organisches Material zugeführt.

Die Durchmischungsperiode: Um den Einfluß von durchmischungsbedingten Oxidations-Reduktionseffekten auf die Aktivität und die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft der Chemokline zu simulieren, wurde in der oxisch-sulfidischen Grenzschicht des Mikrokosmos eine leichte Turbulenz erzeugt, die zu einer Reoxidation sulfidischen Wassers in dieser Zone führte. Die Turbulenz wurde mit einer Siebplatte ($\varnothing = 7$ cm) erzeugt, die über einen Faden mit einem Elektromotor verbunden war. Die Drehung des Elektromotors resultierte in einer Pendelbewegung der Siebplatte, die sich mit 2.5 cm min^{-1} in der oxisch-sulfidischen Grenzschicht auf und ab bewegte (Abb. 2.10). Diese durch Turbulenz erzeugte Störung endete nach 5 Tagen.

Die Restablierungsperiode: Im Anschluß an die turbulente Phase setzte eine 28 tägige Stagnationsperiode ein, die zu einer erneuten Restabilisierung der Grenzschicht führte. Sie endete am 33. Tag. Damit wurde den mikrobiellen Gemeinschaften die Möglichkeit gegeben, sich wieder auf die Ausgangssituation einzustellen.

Die Eutrophierungsperiode: Bis zu dieser Phase stellte der Mikrokosmos ein geschlossenes System dar. Der einzige Kohlenstoff- und Energielieferant war die chemoautotrophe Produktion an der oxisch-anoxischen Grenzschicht. Durch die Zugabe von allochthonem organischem Material wurde das System von einem oligotrophen in einen eutrophen Zustand überführt. Erwartet wurden drastische Veränderungen der ektoenzymatischen Aktivitätsmuster sowie eine vollständige Umstellung der taxonomischen Strukturen, wie sie eventuell nach der Sedimentation einer Planktonblüte zu erwarten sind.

Am Ende der 28-tägigen Restabilisierungsperiode (33. Tag) wurde gelöstes organisches Material in Form eines Algenextraktes über eine Spritze gleichmäßig in der Chemokline des Mikrokosmos verteilt (100 ml Extrakt aus 5 g Trockengewicht der Alge *Enteromorpha sp.*).

Für die Probennahme wurden 5 Magnetprober in 10 cm Abständen oberhalb und unterhalb des oxisch-sulfidischen Grenzbereiches des Mikrokosmos positioniert. Eine weitere Probennahmestelle befand sich direkt innerhalb der Trübungszone des oxisch-sulfidischen Grenzbereiches.

Die Probennahme erfolgte simultan in 5 Tiefenhorizonten.

Während des 6 wöchigen Experimentes wurden in der Chemokline des Mikrokosmos Veränderungen der genetischen Diversität mit Hilfe der DGGE-Technik verfolgt. Für diesen Zweck

wurden pro Tiefe 50 ml Wasser abzentrifugiert und wie unter 2.4.7 beschrieben einer DGGE-Analyse unterzogen.

Um festzustellen, ob grampositive Kontaminanten im Mikrokosmos vorhanden waren, wurde die amplifizierte DNA von *Micrococcus sp.* und *Aureobacter sp.* als interner Standard in die DGGE eingesetzt.

Neben diesen grampositiven Organismen wurde auch die amplifizierte DNA von *Shewanella putrefaciens* (*S. putrefaciens*-Wildtyp) als interner Standard in die DGGE eingesetzt.

Übereinstimmungen der Bandenhöhen zwischen den Standards und den Banden im DGGE-Muster der mikrobiellen Gemeinschaften dienen als Hinweise, ob die als Standards eingesetzten Organismen in den mikrobiellen Gemeinschaften des Mikrokosmos vertreten waren.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

- Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen
- extrazelluläre Aktivitäten der α - Glucosidasen
 - β -Glucosidasen
 - Esterasen (Substrat: MUF-Heptanoat)
- Keimzahlen auf TCBS-Agar

Da als Reaktion auf die Zugabe des organischen Materials eine selektive Anreicherung von copiotrophen Bakterien zu erwarten war, wurden Keimzahlen auf TCBS-Agar bestimmt.

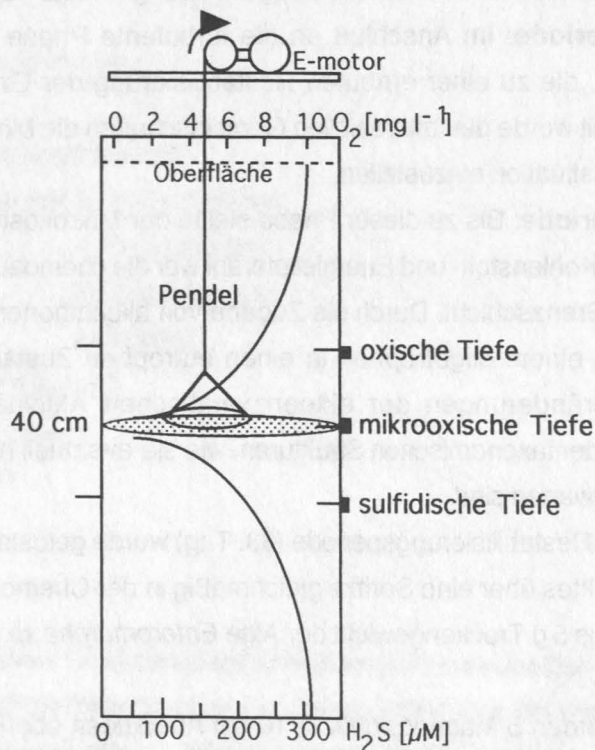


Abb. 2.10: Schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Erzeugung von Turbulenzen im mikrooxischen Bereich der Chemokline des Mikrokosmos.

2.5.5 Die taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften und deren Aktivitäten in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994

Die hydrographische Situation der Gotland See unterschied sich im Juni 1994 deutlich vom Zustand der Chemokline im April 1993. Weitere Einströme dichten und sauerstoffreicheren Nordseewassers drangen bis in das Gotlandbecken vor und führten zu einer Oxidation des sulfidischen Tiefenwassers. Das Sauerstoffprofil zeigte von 85 - 130 m Tiefe noch einen Verlauf, der an die ehemalige Chemokline erinnerte. Um zu klären, in welcher Weise die Reoxidation sulfidischen Tiefenwassers die taxonomische Struktur und die Aktivität einer mikrobiellen Gemeinschaft der Chemokline beeinflusste, wurden Veränderungen der genetischen Diversitäten, die im Tiefenprofil des Sauerstoffgradienten auftraten mit ektoenzymatischen Aktivitäten, den Turnoverraten radioaktiver Monomere sowie mit den Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten in Beziehung gesetzt.

In 5 m Abständen wurden aus 85 - 130 m Tiefe in 5 l Niskin-Schöpfern Proben gezogen. Anoxische Abfüll- und Inkubationstechniken wurden nicht eingesetzt, da alle Proben oxisch waren.

Aus jedem der insgesamt 10 Schöpfer wurden je 4 l über eine Druckfiltrationsanlage auf 0.2 μm GV-Filter (Fa. MILLIPORE) abfiltriert und anschließend tiefgefroren (-20 °C). Im Labor erfolgte später die Zerkleinerung der Filter und die Extraktion und Reinigung der bakteriellen genomischen Gesamt-DNA. Diese DNA wurde als Ausgangsmaterial für die PCR und die folgenden DGGE-Analysen eingesetzt.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

- Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen
- extrazelluläre Aktivitäten der α -Glucosidasen
- β -Glucosidasen
- Amino-peptidasen
- Turnoverraten von C¹⁴-Glucose
- H³-Leucin
- Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten
- Gesamtbakterienzahlen

2.6 Mikrobielle Untersuchungen im Gradostaten

Die Folge einer mehrwöchigen Stagnation war die bereits erwähnte Ausbildung einer stabilen Trübungszone in der oxisch-sulfidischen Grenzschicht des Mikrokosmos. Der Stofftransport durch diese Grenzschicht beruhte ausschließlich auf Diffusionsprozessen. In natürlichen Chemoklinen sind Bakterien jedoch wechselnden Redox-Bedingungen ausgesetzt, da die Lage der Chemokline in der Wassersäule Veränderungen unterworfen ist (Rheinheimer et al. 1989). Wechselnde Sauerstoff- und Sulfidverhältnisse beeinflussen dabei die taxonomische Struktur und die biochemische Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaften (Hoppe et al., 1990). Durchmischungsexperimente können in natürlichen Chemoklinen jedoch nicht kontrolliert und

reproduzierbar durchgeführt werden. Um die Wirkungen von Oxidations- und Reduktionsprozessen auf die Aktivität und die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften der Chemokline unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können, wurde ein "Gradostatenansatz" gewählt (Lovit und Wimpenny, 1981; Wimpenny, 1989; Wimpenny und Abdollahi, 1991). Der Gradostat vermittelt zwischen dem stabilen, auf reinen Diffusionsprozessen beruhenden Gradienten des Mikrokosmos und dem durch instabile Perioden gekennzeichneten System der Freiwasser-Chemokline der Gotland See.

In der Grundversion des Gradostaten ("tubing coupled gradostat"; Wimpenny 1989) stehen ein oxisches und ein anoxisches Reservoir über fünf Kulturgefäße miteinander in Verbindung. Die Verbindungen werden durch Tygonschläuchen hergestellt (Abb. 2.11). Peristaltische Pumpen (P) transportieren kontinuierlich Flüssigkeit von dem tiefer gelegenen Gefäß V5 bis zum erhöht stehenden Gefäß V1. Die Gefäße sind zusätzlich mit einem Überlauf (W) miteinander verbunden, so daß überschüssige Flüssigkeit kaskadenartig von Gefäß V1 in Gefäß V5 zurückfließen kann. Oxisches Wasser aus dem Reservoir R1 und sulfidisches Wasser aus dem Reservoir R2 werden so durchmischt, daß sich in den Gefäßen V1-V5 ein linearer oxisch-sulfidischer Gradient ausbildet. Überschüssige Flüssigkeit wird in die Auffanggefäße Rec1 und Rec2 gepumpt.

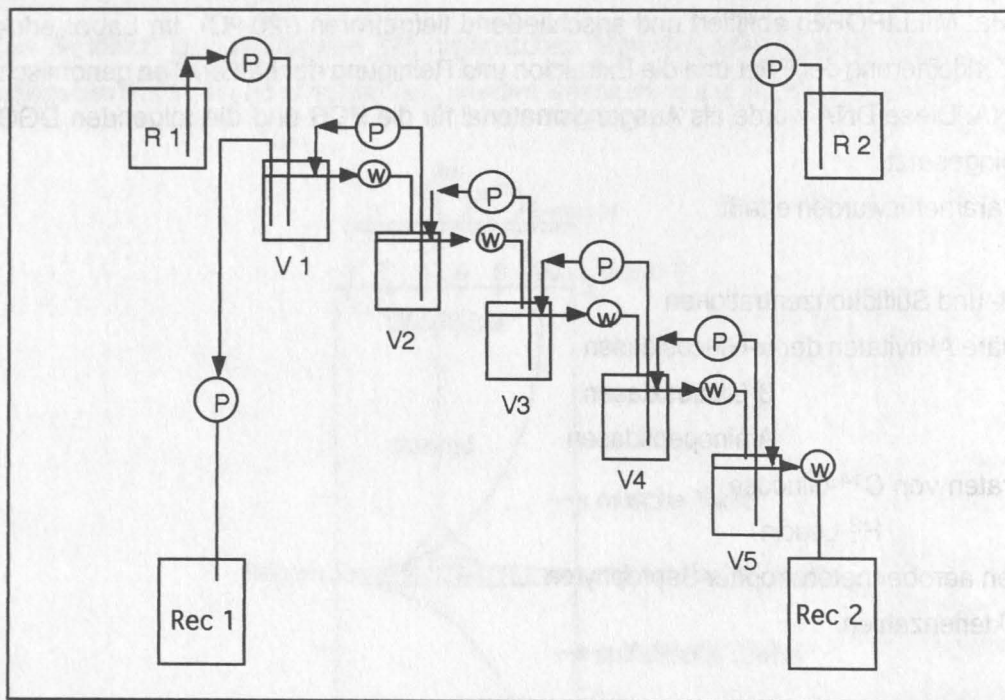


Abb. 2.11: Schematische Darstellung des Gradostaten ("tubing coupled gradostat"; Wimpenny, 1989). Rec1 und Rec2: Auffanggefäße; R1 und R2: Reservoirs; V1-V5: Gefäße 1-5; W: Überlauf; P: peristaltische Pumpe

2.6.1 Durchmischungsexperimente im Gradostaten mit mikrobiellen Gemeinschaften der Chemokline der Gotland See

Um die Wirkung von Oxidations- und Reduktionsprozessen auf die Aktivitäten und die Abundanzverteilungen natürlicher Gemeinschaften aus der Chemokline untersuchen zu können, wurde im Juli 1992 während einer dreiwöchigen Expedition in die Gotland See Wasser aus dem

oxischen ($0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$, 110 m Tiefe) und dem sulfidischen Bereich ($35 \mu\text{M H}_2\text{S}$, 150 m Tiefe) der Wassersäule im Gradostaten durchmischt. Das Reservoir R1 des Gradostaten (Abb.2.11) wurde mit dem oxischen und das Reservoir R 2 mit dem sulfidischen Wasser befüllt. Die Reservoirs (R1, R2), sowie die Auffanggefäße (Rec1, Rec2) bestanden aus 3 l fassenden gasundurchlässigen Kunststoffbeuteln. Der Gradostat war in der Größe verkleinert (Volumen der Gefäße = 300 ml), so daß er in einer Anaerobenkammer (Fa. Grenchen) an Bord von F.S. Alkor betrieben werden konnte. Die Durchflußrate (D) des Gradostaten betrug während des Experimentes $D = 1.7 \text{ d}^{-1}$. Nach einer 3 tägigen Vorlaufzeit wurden folgende Variablen in den 5 Versuchsgefäßen erfaßt:

- Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen
- Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten (ZoBell-Agar)
- Keimzahlen anaerober heterotropher Saprophyten (ZoBell-Agar)
- Keimzahlen extrem copiotropher Bakterien (TCBS-Agar)
- TVDC ("Total Viable Direct Counts")
- Gesamtbakterienzahlen(GBZ)
- Zellvolumina
- zelluläre Biomassen
- extrazelluläre Aktivitäten der α -Glucosidasen

2.6.2 Durchmischungsexperimente im Gradostaten mit *Shewanella putrefaciens*

Instabile oxisch-sulfidische Verhältnisse innerhalb der Chemokline stellen extreme Anforderungen an die physiologischen Adaptationsfähigkeit einzelner Organismen. *Shewanella putrefaciens* kommt möglicherweise eine Schlüsselrolle im Kohlenstoff-Stickstoff Kreislauf innerhalb der Chemokline der Gotland See zu (Brettar und Höfle, 1993). Dieser Organismus ist in der Lage, sowohl Sauerstoff als auch Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen und auf wechselnde Redoxverhältnisse mit schnellen Änderungen der Wachstumsrate zu reagieren (Brettar und Höfle, 1993). Die Mechanismen von Sauerstoff und Sulfid abhängigen Enzyminduktionseffekten wurden in Gradostatenexperimenten anhand dieses "Schlüsselorganismus" untersucht.

Die DSM (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen) lieferte den Typenstamm *Shewanella putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) in gefriergetrocknetem Zustand. Die Anzucht erfolgte in Flüssigmedium (ZoBell, S = 15) mit anschließender Vereinzelung auf ZoBell-Agarplatten nach dem "3 Strich Verfahren". 200 ml ZoBell-Flüssigmedium wurden mit einer isoliert liegenden Kolonie beimpft. Nach einer 2 tägigen Inkubationzeit wurde der Kulturüberstand abzentrifugiert ($5000 \times g$, 20 Minuten) und das Pellet in einer sterilen NaCl-Lösung (S = 15) resuspendiert. Nach Wiederholung dieses Vorganges waren die Zellen ausreichend von Resten des Mediums befreit.

Bei Experimenten mit *Shewanella*-Reinkulturen wurde das Gefäßsystem des Gradostaten zunächst mit gealtertem Seewasser befüllt (S = 15) und autoklaviert (30 Minuten, $120 \text{ }^\circ\text{C}$). Die Abkühlung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre, so daß nach etwa 1 Stunde der Sauerstoff aus

dem System angetrieben war. Anschließend wurde der Gradostat in der Anaerobenkammer unter Formiergas (95 %N₂, 5 %H₂; Fa. Messer Griesheim) zusammengebaut.

Für die Befüllung des oxischen Reservoirs (R1) wurden 3 Liter Wasser aus dem oxischen Bereich des Mikrokosmos entnommen (0.3 mg O₂ l⁻¹). Das sulfidische Reservoir (R2) wurde mit Wasser aus dem sulfidischen Bereich des Mikrokosmos befüllt und hatte eine H₂S-Konzentration von 300 µM. Beide Reservoirs wurden anschließend über sterile Filtervorsätze (Minisart NML, 0.2 µm; Fa. Sartorius) mit dem Gradostaten verbunden, so daß oxisches (R1) und sulfidisches (R2) Wasser sterilfiltriert in das Gefäßsystem gelangen konnten. Der Wechsel der Filtervorsätze wurde täglich durchgeführt. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine gleichmäßige Inokulation der 5 Versuchsgefäße mit der gewaschenen Zellsuspension. Die Zelldichte lag bei etwa 5 x 10⁶ Zellen ml⁻¹. Nachdem sich bei einer Durchmischungsrate von D = 1.7 d⁻¹ ein Sauerstoff-Sulfid-Gradient im Gradostaten eingestellt hatte, wurden folgende Variablen über mehrere Tage hinweg in den 5 Versuchsgefäßen bestimmt.

- Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen
- Keimzahlen von *Shewanella putrefaciens* (ZoBell-Agar)
- extrazelluläre Aktivitäten der α-Glucosidasen
 - β-Glucosidasen
 - Aminopeptidasen
 - Esterasen
- Turnoverraten von C¹⁴-Glucose und H³-Leucin

2.7 Charakterisierungen von Isolaten

2.7.1 Biochemische Charakterisierungen anhand von Membran-Fettsäuremustern

Während dieser Untersuchung wurden aerobe heterotrophe Bakterien aus der Chemokline des Mikrokosmos auf ZoBell- und TCBS-Agarplatten isoliert. Nach Vereinzeln und Reinigung wurden diese Isolate biochemischen Charakterisierungen anhand der Zusammensetzung ihrer Membran-Fettsäuremuster mit dem "Microbial Identification System" (MIS; Paisley, 1994) unterzogen.

Das MIS bestand aus einem Gaschromatographen (Fa. Hewlett-Packard) mit einem angeschlossenen Computer System als Steuereinheit. Nach der Fettsäuremethylveresterung aus den Bakterienzellen (Protokoll: siehe Anhang) wurde eine kleine Menge des Extraktes automatisch in den Gaschromatographen injiziert. Über eine Kapillarsäule wurden die Fettsäuremethylester getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert. Die Daten des Chromatogrammes wurden an den Computer weitergeleitet, dessen Software eine Datenbank-Bibliothek mit standardisierten Fettsäuremustern verschiedener bekannter Bakterien-Referenzstämme enthielt. Ein statistischer Algorithmus verglich Peakhöhe- und Fläche sowie die verschiedenen Retentionszeiten des zu charakterisierenden Chromatogramms mit Einträgen in der Bibliothek.

Die Übereinstimmungen zwischen dem Fettsäuremuster eines bekannten Referenzstammes in

der Bibliothek und dem Fettsäuremuster der zu charakterisierenden Art wurden in Form eines Ähnlichkeitskoeffizienten (Similaritäts-Index) wiedergegeben. Die Interpretation der Similaritäts-Indizes folgte den Empfehlungen von Paisley (1994) Bakterienisolate mit einem Index >0.5 zeigten demnach eine gute Übereinstimmung mit dem Referenzstamm in der Bibliothek. Ein Index zwischen 0.3 und 0.5 stellte noch eine gute Übereinstimmung dar. Bei dem Isolat handelte es sich jedoch um einen atypischen Stamm. Bei Werten <0.3 lag der entsprechende Vergleichstamm in der Bibliothek nicht vor. Das Isolat zeigte jedoch eine enge Verwandtschaft mit einem von dem Programm alternativ angebotenen Referenzstamm.

Die Ähnlichkeiten zwischen den Fettsäuremustern der verschiedenen Arten wurden in Form eines Dendrogrammes graphisch dargestellt. Die euklidische Distanz (ED) gab den räumlichen Abstand zwischen zwei Isolaten nach Vergleich ihrer Fettsäuremuster an.

2.7.2 Charakterisierung mit api-Systemen

Die Systeme api 20 E und 20 NE (Fa. bioMerieux) wurden zur biochemischen Charakterisierung von Isolaten eingesetzt, die aus dem Mikrokosmos auf TCBS-Agar isoliert wurden (Austin und Lee, 1992).

Das eingesetzte api 20 E ist ein miniaturisiertes System zur Identifizierung von Enterobacteriaceen und anderen einfachen, gramnegativen Stäbchen mit Hilfe von 23 standardisierten biochemischen Reaktionen.

Api 20 NE ist ein standardisiertes System mit 8 konventionellen und 12 Assimilations-Reaktionen zur Identifizierung von gramnegativen Stäbchen, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceen gehören, wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* usw.



3 ERGEBNISSE

3.1 Methodische Vorversuche

3.1.1 Ektoenzymatische Aktivitätsbestimmungen unter oxischen und anoxischen Inkubationsbedingungen

Es sollte geklärt werden, ob geringe Änderungen der Sauerstoffkonzentrationen während der Inkubation von Proben aus mikrooxischen und anoxischen Bereichen der Chemokline einen Einfluß auf die ektoenzymatischen Aktivitäten ausüben.

In der Chemokline der Gotland See wurde 1993 in 135 m Tiefe eine Sauerstoffkonzentration von $0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ gemessen. Eine vergleichbare mikrooxische Situation lag im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich der Chemokline des Mikrokosmos vor. Es wurde vorausgesetzt, daß bei diesen Sauerstoffkonzentrationen eine mikroaerob adaptierte mikrobielle Gemeinschaft vorlag. Die Hmax-Bestimmungen der α -Glucosidasen, β -Glucosidasen und Aminopeptidasen erfolgten nach oxischer und anoxischer Inkubation. Es zeigte sich, daß die Hmax-Werte der anoxischen Inkubationen gegenüber den oxischen Inkubationen erhöht waren (Abb. 3.1a). Für die α -Glucosidasen lag die Erhöhung bei 18 % im Mikrokosmos und bei 51 % in der Gotland See. Für die β -Glucosidasen erreichte die Erhöhung 159 % im Mikrokosmos und 59 % in der Gotland See. Die Aminopeptidasen waren gegenüber der aeroben Inkubation im Mikrokosmos durchschnittlich um 36% erhöht, gegenüber 39 % in der Gotland See. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Beibehaltung der *in situ* Sauerstoffkonzentrationen für die Versuche unbedingt erforderlich war.

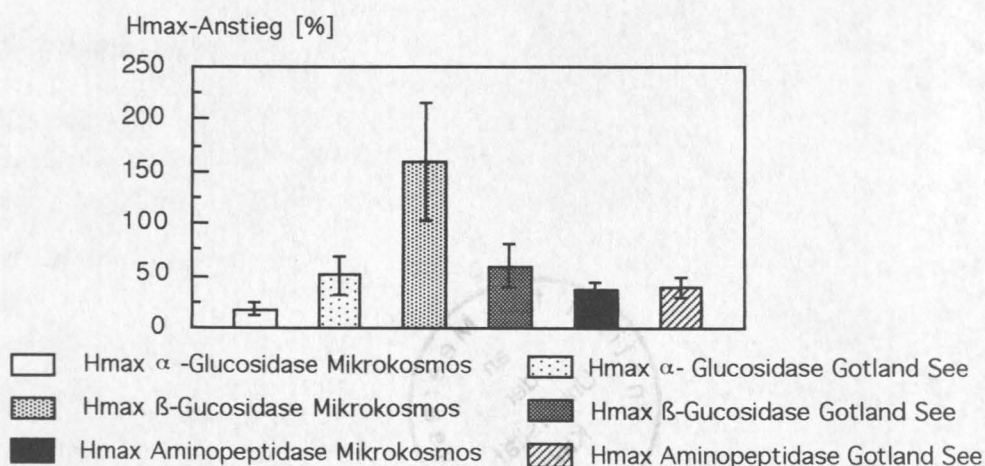


Abb. 3.1a: Die prozentualen Erhöhungen der ektoenzymatischen Aktivitäten (α -Glucosidasen, β -Glucosidasen und Aminopeptidasen) bei anaeroben Inkubationen gegenüber aeroben Inkubationen. Dargestellt für Proben aus dem mikrooxischen Bereich ($0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See.

Die Aktivitäten der extrazellulären Aminopeptidasen, die nach anoxischer Inkubation unter einer Ar -Atmosphäre gemessen wurden, zeichneten sich gegenüber den oxischen Inkubationen durch wesentlich größere Streuungen der Einzelmesswerte aus. Der Standardfehler der

Einzelmessungen lag nach oxischer Inkubation bei 4.5 % (n = 15). Für anoxische Inkubationen erreichte der Wert 20 % (n = 15; Abb.3.1b).

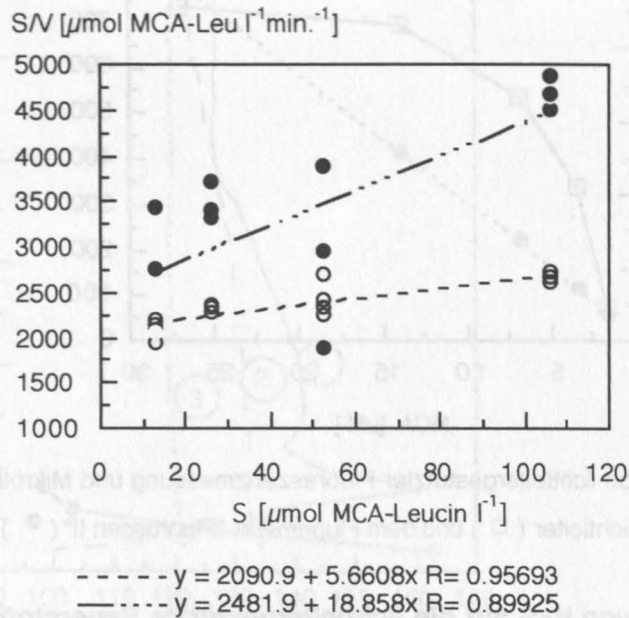


Abb. 3.1: Hydrolyse von MCA-Leucin durch extrazelluläre Aminopeptidasen im mikrooxischen Bereich der Chemokline der Gotland See (135 m Tiefe, $0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$), nach oxischer (○) und anoxischer (●) Inkubation. Die Linearisierung der Enzym-Substrat-Kinetik erfolgte nach Eadie-Hofstee.

3.1.2 Der Meßbereich der lichtleitergestützten EEA-Messung

Um die lichtleitergestützte EEA-Messung zukünftig auch für quantitative Untersuchungen einsetzen zu können, mußte zunächst der Meßbereich überprüft und eine Eichgerade erstellt werden.

Das Mikrotiterplatten-Fluorimeter "Fluoroscan II" zeichnete sich durch einen Meßbereich aus, der vom μ -molaren bis in den nano-molaren Bereich linear verlief (Werte hier nicht mehr dargestellt, Abb. 3.2). Die mit dem Lichtleiter durchgeführte Messung zeichnete sich durch einen nichtlinearen Verlauf aus. Konzentrationen $< 1.5 \mu\text{M}$ MCA konnten mit dem Kunststofflichtleiter nicht mehr detektiert werden. Damit lag die Sensitivität der lichtleitergestützten Fluoreszenzmessung in diesem Messaufbau deutlich unter der des "Fluoroscan II".

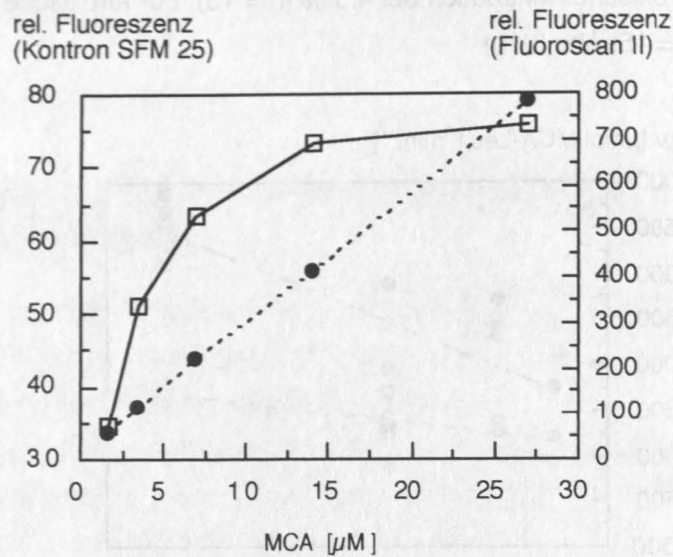


Abb. 3.2: Vergleich von lichtleitergestützter Fluoreszenzmessung und Mikrotiterplatten Fluorimeter. Über einen Kunststofflichtleiter (\square) und dem Fluorimeter "Fluoroscan II" (\bullet) gemessen.

3.1.3 Der Einfluß von H_2S auf die lichtleitergestützte Sauerstoffmessung

Um das Prinzip der lichtleitergestützten Sauerstoffmessung auch in Chemoklinen einsetzen zu können, wurde die Resistenz der Sauerstoffsonde gegenüber Sulfid getestet.

Da Sauerstoff hemmend auf die Emission der Sauerstoffsonde wirkte, war bei Annäherung der Sonde an den oxisch-sulfidischen Übergangsbereich ein Anstieg der relativen Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.3). Bereits bei einer Sulfidkonzentration von $< 100 \mu\text{M}$ H_2S trat jedoch ein leichter Rückgang der Fluoreszenz ein. Im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich erreichte die relative Fluoreszenz zunächst ein Maximum, da hier kein Sauerstoff mehr vorlag. Nach Kontakt mit $> 100 \mu\text{M}$ H_2S war jedoch eine starke Erniedrigung der Fluoreszenz zu verzeichnen. Dieser Rückgang war nicht reversibel, so daß die Sonde bereits nach dem ersten Kontakt mit H_2S kein ausreichendes Emissionssignal mehr lieferte. Nach dem zweiten Kontakt mit H_2S war die relative Fluoreszenz der Sonde gleich null.

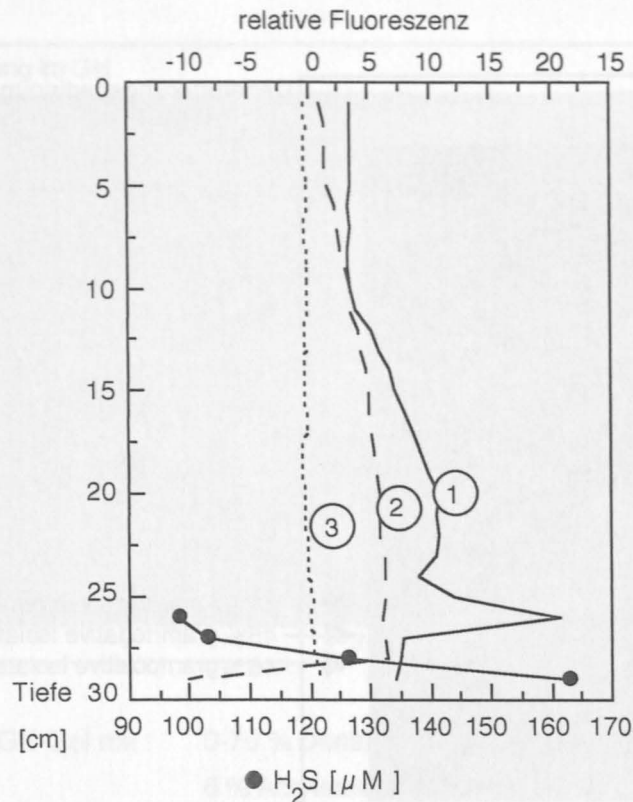


Abb. 3.3: Fluoreszenzprofile einer lichtleitergestützten Sauerstoffsonde in der Chemokline des Mikrokosmos.

- 1: Fluoreszenzprofil mit einer neuen Sauerstoffsonde.
- 2: Fluoreszenzprofil nach 1 x Kontakt mit 100 μM H₂S.
- 3: Fluoreszenzprofil nach 2 x Kontakt mit 100 μM H₂S.

3.1.4 Die Auftrennung von Einzelisolaten mit der DGGE

Verschiedene Vertreter gramnegativer (*Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas putida*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *E. coli*) und grampositiver Bakterien (*Aureobacterium sp.*, *Clavibacter michiganense*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*) wurden mit der DGGE aufgetrennt. Um die Qualität der Trennung von kurzen (233bp) und langen (519bp) DNA-Fragmenten im DGGE-Gel vergleichen zu können, wurden die entsprechenden Fragmente mit zwei verschiedenen Primerkombinationen in der PCR amplifiziert.

Die Auftrennung von kurzen (233bp) DNA-Fragmenten mit der DGGE

Die 233bp langen DNA-Fragmente jeder einzelnen Art bildeten im Gel eine einzelne Bande. Die Banden aller gramnegativer und grampositiver Arten waren im DGGE-Gel auf drei Bereiche verteilt (Abb. 3.4). Die DNA-Fragmente der gramnegativen Isolate denaturierten bei etwa 45 % Denaturierungsbedingungen im DGGE-Gel. Die Banden lagen alle in einer Höhe. Die grampositiven Isolate bildeten ihre Banden bei etwa 46% Denaturierungsbedingungen. Auch hier lagen die Banden alle in einer Höhe. Die DNA-Fragmente von *Pseudomonas putida* (gramnegativ) zeigten ein von den übrigen Isolaten abweichendes Denaturierungsverhalten. Sie bildeten eine einzige Bande bei 44% Denaturierungsbedingungen.

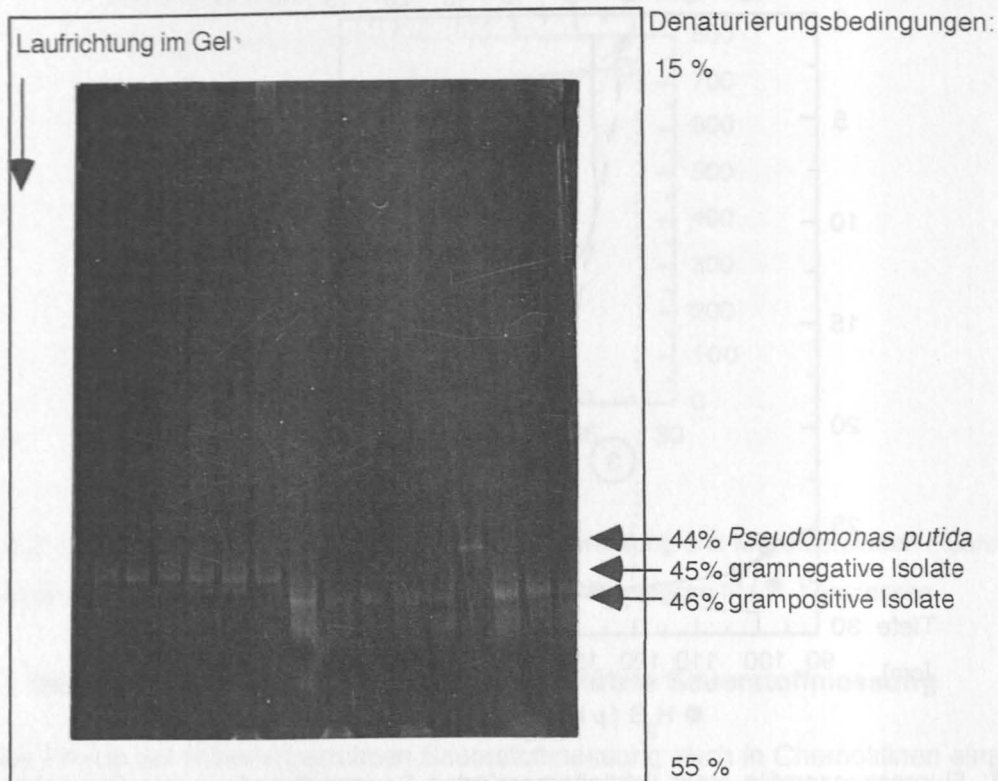


Abb. 3.4: DGGE-Gel mit: 15-55 % Denaturierungsbedingungen
8 % Acrylamid/Bis-Acrylamid
0.5 x TAE-Puffer
4 Stunden Laufzeit bei 200 Volt und 60 °C

Die Auftrennung von langen (519bp) DNA-Fragmenten mit der DGGE

Die langen DNA-Fragmente mit 519 bp denaturierten im Bereich von 17-44 % Denaturierungsbedingungen und bildeten hier Banden im DGGE-Gel (Abb. 3.5). Damit wurde eine wesentlich bessere Auftrennung von Isolaten erreicht als mit den kurzen (233bp) DNA-Fragmenten. Durch die längeren Fragmente wurde zwar eine bessere Auflösung der Einzelisolate erreicht, der große Nachteil lag jedoch in der Ausbildung von 2 bis 3 Banden pro Isolat. Die Misch-DNA einer mikrobiellen Gemeinschaft aus der Chemokline der Gotland See 1994 zeigte hingegen eine Auftrennung in nur wenige Banden.



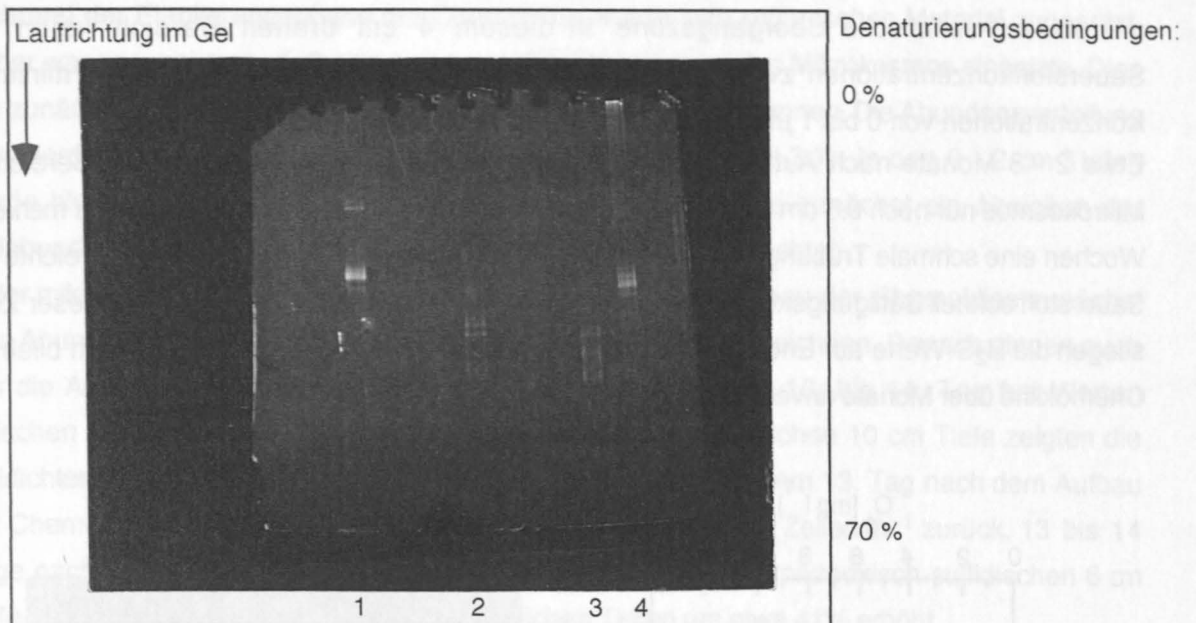


Abb. 3.5: DGGE-Gel mit : 0-70 % Denaturierungsbedingungen
 6 % Acrylamid/Bis-Acrylamid
 0.5 x TAE - Puffer
 7 Stunden Laufzeit bei 100 Volt und 60°C

- 1: uncharakterisiertes Isolat
 2: *Clavibacter michiganense*
 3: *E. coli*
 4: mikrobielle Gemeinschaft aus der Chemokline der Gotland See 1994

Da die Bildung von Doppelbanden die Interpretation der DGGE-Gele erschwerte, wurden alle folgenden Untersuchungen mit 233bp langen Fragmenten (Primer P1 und P2) durchgeführt.

3.2 Die Chemokline im Mikrokosmos

3.2.1 Die Entwicklung der Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen im Mikrokosmos nach Aufbau der Chemokline

Nach dem Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos setzte eine über mehrere Wochen andauernde Stabilisierungsphase ein. Die Entwicklung dieser Phase wurde anhand der Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen verfolgt.

Etwa 24 Stunden nach Unterschichtung des mikrooxygenen Wasserkörpers ($0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) mit sulfidischem Wasser ($100 \mu\text{M H}_2\text{S}$) waren erste Anzeichen für eine Stabilisierung der Chemokline festzustellen (Abb. 3.6). Die Sauerstoffwerte gingen von $1.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ in 0 cm Tiefe bis auf $0.08 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$, in 2 cm Tiefe zurück. Die höchsten Sulfidkonzentrationen wurden in 10 cm Tiefe mit $52 \mu\text{M H}_2\text{S}$ gemessen.

12 Tage nach Aufbau der Chemokline war in 0 cm Tiefe ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration

von 1.3 auf 3.7 mg O₂ l⁻¹ zu beobachten (Abb. 3.6). In den 2 - 6 cm Tiefen entwickelte sich eine mikrooxisch-sulfidische Übergangszone. In diesem 4 cm breiten Bereich lagen die Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0.08 - 0.04 mg O₂ l⁻¹. Sulfid erreichte hier minimale Konzentrationen von 0 bis 1 μM H₂S und stieg in 10 cm Tiefe auf 35 μM an.

Etwa 2 - 3 Monate nach Aufbau der Chemokline war der mikrooxisch-sulfidische Bereich im Mikrokosmos nur noch 0.5 cm breit (6 cm Tiefe, Abb. 3.6). Hier bildete sich im Laufe von mehreren Wochen eine schmale Trübungszone aus (Foto 3). Oberhalb dieser Trübungszone erreichte der Sauerstoff schnell Sättigungskonzentrationen von 11 bis 12.6 mg O₂ l⁻¹. Unterhalb dieser Zone stiegen die H₂S-Werte auf Endkonzentrationen bis zu 325 μM H₂S an. In dieser Form blieb die Chemokline über Monate unverändert.

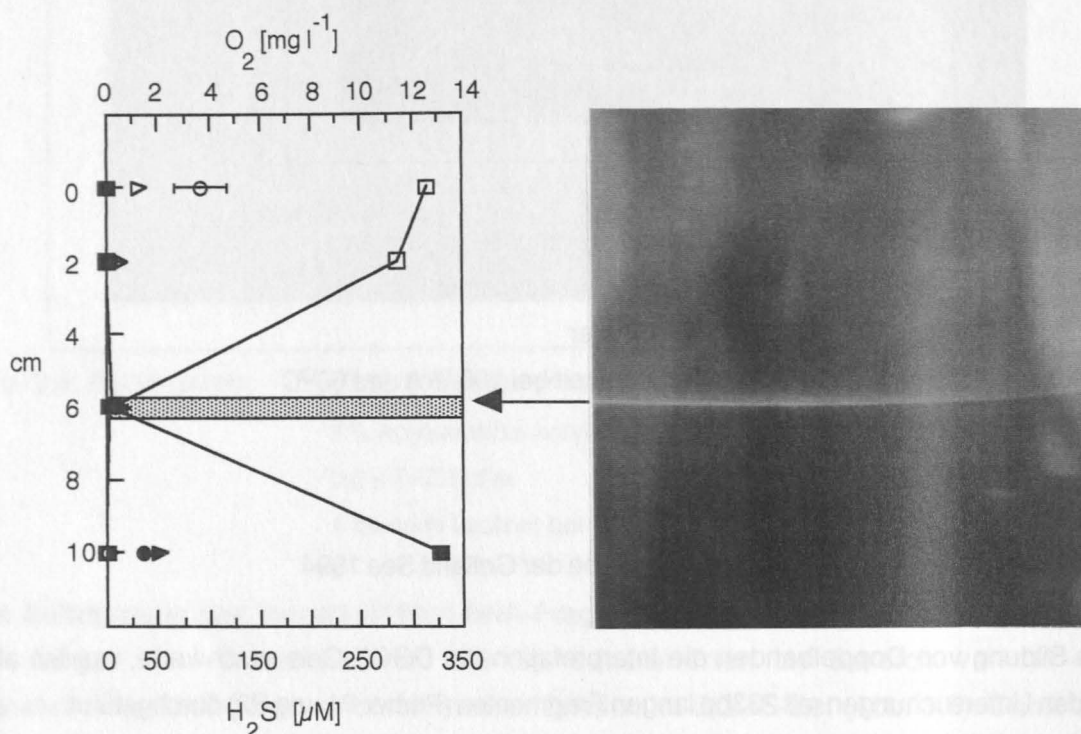







Abb. 3.6: Die Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen in der Chemokline des Mikrokosmos im Bereich der Trübungszone ();

24 Stunden nach Aufbau der Chemokline: O₂ (), H₂S ()

12 Tage nach Aufbau der Chemokline: O₂ (), H₂S ()



2-3 Monate nach Aufbau der Chemokline: O₂ (), H₂S ()

Foto 3: Die Trübungszone in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.2.2 Die Entwicklung der Gesamtbakterienzahlen und der zellulären Biomassen im Mikrokosmos nach Aufbau der Chemokline

Da die Bildungsphase einer Freiland-Chemokline *in situ* nicht untersucht werden konnte, wurde dieser Prozess über die Entwicklung der Gesamtbakterienzahlen und der zellulären Biomassen nach dem Aufbau einer Chemokline im Mikrokosmos über einen Zeitraum von zwei Wochen verfolgt.

Die Gesamtbakterienzahlen nach Aufbau der Chemokline

Während der Etablierungsphase der Chemokline wurde kein organisches Material zugesetzt. Daher war anzunehmen, daß eine langsame Oligotrophierung des Mikrokosmos einsetzte. Dies war zunächst in einer allgemeinen Abnahme der Zelldichten zu erkennen. Die Abundanzverteilung war allerdings in den 0 - 10 cm Tiefen sehr unterschiedlich (Abb. 3.7). In den 0 - 2 cm Tiefen wurde bis zum 10 - 12 Tag nach dem Aufbau der Chemokline zunächst ein Absinken der Zellabundanzen von 2.7 - 3.0 auf 0.8 - 1.4 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} beobachtet.

In der mikrooxisch-sulfidischen 6 cm Tiefe war ein Tag nach Aufbau der Chemokline zunächst eine Abundanzhöhung von 2.7 auf 3.1 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} zu verzeichnen. Danach gingen auch hier die Abundanzen zurück und pendelten sich zwischen dem 10. bis 14. Tag bei Werten zwischen 2.3 - 2.4 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} ein. Lediglich in der sulfidischen 10 cm Tiefe zeigten die Zelldichten bis zum 10. - 12. Tag keine starken Änderungen. Ab dem 13. Tag nach dem Aufbau der Chemokline gingen hier die Werte aber von 2.3 auf 1.7 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} zurück. 13 bis 14 Tage nach Aufbau der Chemokline waren die Zelldichten in der mikrooxisch-sulfidischen 6 cm Tiefe gegenüber den oxischen und den sulfidischen Tiefen um etwa 41% erhöht.

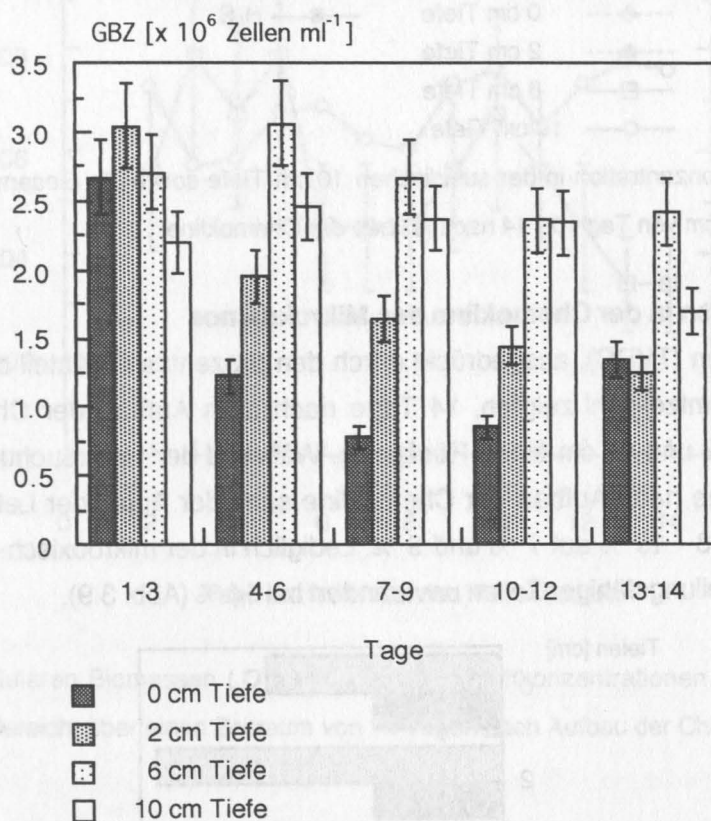


Abb. 3.7: Der Verlauf der Gesamtbakterienzahlen (GBZ, jeweils über 3 Tage gemittelt) im Tiefenbereich von 0 - 10 cm, über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Aufbau der Chemokline.

Die Gesamtbakterienzahlen ab dem 10. Tag nach Aufbau der Chemokline

Ab dem 10. Tag nach dem Aufbau der Chemokline zeichnete sich in den Gesamtbakterienzahlen eine neue Tendenz ab (Abb. 3.8). Während in den oxischen Tiefen von 0 bis 2 cm die Zelldichten 1.7 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} nicht überstiegen, war im mikrooxisch-sulfidischen 6 cm Bereich ein kontinuierlicher Anstieg von 1.6 auf 2.6 $\times 10^6$ Zellen ml^{-1} zu beobachten.

Im sulfidischen 10 cm Bereich korrespondierten die Änderungen der Zelldichten mit dem Verlauf der

H₂S Konzentrationen. Diese schwankten zwischen 57 und 35 μM H₂S, mit abnehmender Tendenz.

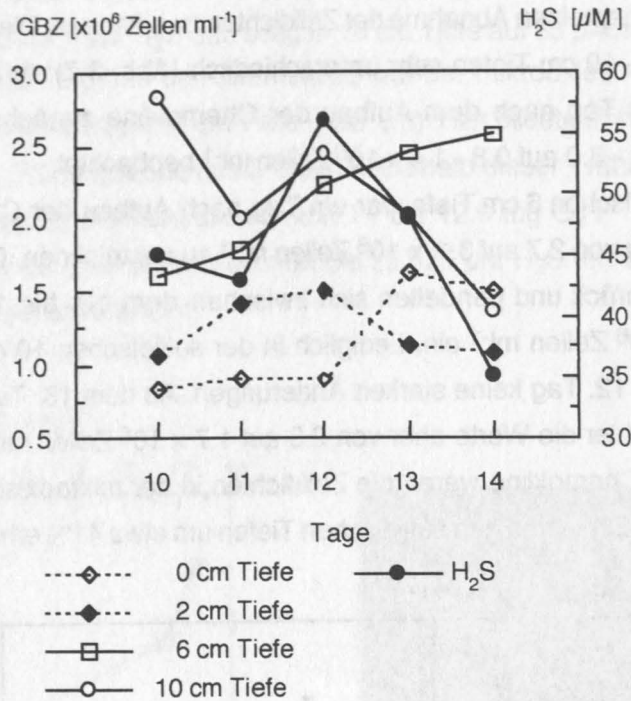


Abb. 3.8: Die H₂S-Konzentration in der sulfidischen 10 cm Tiefe sowie die Gesamtbakterienzahlen in den Tiefen von 0 - 10 cm von Tag 10 - 14 nach Aufbau der Chemokline

Die Lebendzellzahlen in der Chemokline des Mikrokosmos

Die Lebendzellzahlen (TVDC), ausgedrückt durch den prozentualen Anteil der teilungsfähigen Zellen an der Gesamtzellzahl zeigten, 14 Tage nach dem Aufbau der Chemokline in den Tiefenbereichen 0, 2 und 10 cm einen Rückgang. Während der Untersuchungsphase von 24 Stunden bis 12 Tage nach Aufbau der Chemokline sank der Anteil der Lebendzellzahlen in diesen Tiefen von 13 - 19 % auf 7 % und 9 %. Lediglich in der mikrooxisch-sulfidischen 6 cm Tiefe lag der Anteil teilungsfähiger Zellen unverändert bei 14 % (Abb. 3.9).

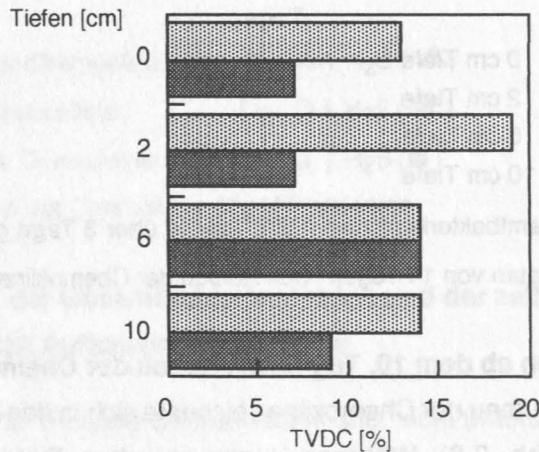


Abb. 3.9: Die prozentualen Anteile der Lebendzellzahlen (TVDC) an den Gesamtzellzahlen in den Tiefen von 0 bis 10 cm im Mikrokosmos; 24 Stunden (▨) und 12 Tage (■) nach Aufbau der Chemokline.

Die zellulären Biomassen und die Sauerstoffkonzentrationen im mikrooxygen-sulfidischen Bereich der Chemokline

Die zellulären Biomassen zeigten vom 6. bis zum 11. Tag nach dem Aufbau der Chemokline einen korrespondierenden Verlauf mit den Sauerstoffkonzentrationen (Abb.3.10). Mit dem Rückgang des Restsauerstoffs von 0.08 auf 0.03 mg O₂ l⁻¹ stieg die zelluläre Biomasse von Tag 3 - 13 um insgesamt 35 % an. In den oxischen und sulfidischen Tiefen waren keine Beziehungen zwischen der Entwicklung der zellulären Biomassen und den Sauerstoffkonzentrationen festzustellen (nicht dargestellt).

Die H₂S-Konzentration sank während des 14 tägigen Untersuchungszeitraumes in der mikrooxygen-sulfidischen 6 cm Tiefe von 15 auf 1 µM H₂S. Es wurden keine Koinzidenzen mit den zellulären Biomassen beobachtet (Abb. 3.11).

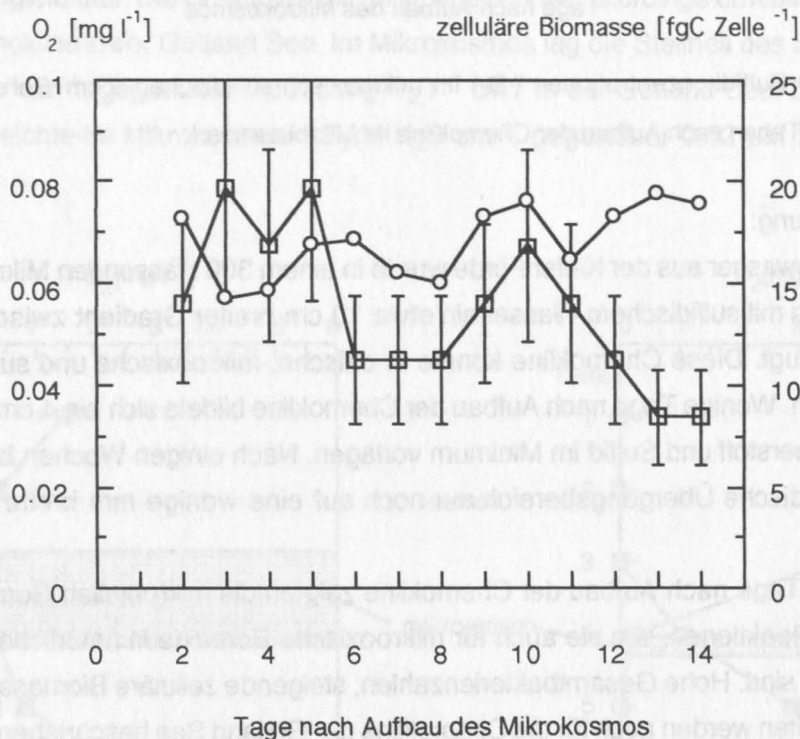


Abb.3.10: Die zellulären Biomassen (○) und die Sauerstoffkonzentrationen (□) im mikrooxygen-sulfidischen 6 cm Bereich, über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Aufbau der Chemokline.

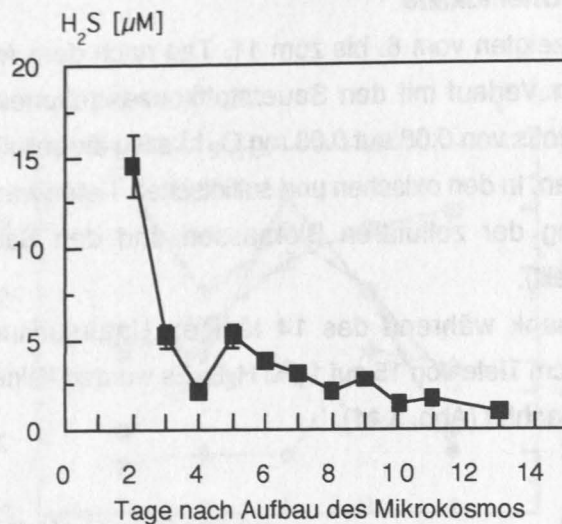


Abb. 3.11: Die Sulfidkonzentrationen (■) im mikrooxygen-sulfidischen 6 cm Bereich, über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos.

Zusammenfassung:

Mit Oberflächenwasser aus der Kieler Förde wurde in einem 300 l fassenden Mikrokosmos durch Unterschichtung mit sulfidischem Wasser ein etwa 10 cm breiter Gradient zwischen Sauerstoff und Sulfid erzeugt. Diese Chemokline konnte in oxische, mikrooxygenische und sulfidische Zonen unterteilt werden. Wenige Tage nach Aufbau der Chemokline bildete sich ein 4 cm breiter Bereich aus, in dem Sauerstoff und Sulfid im Minimum vorlagen. Nach einigen Wochen bis Monaten war der oxisch-sulfidische Übergangsbereich nur noch auf eine wenige mm breite Trübungszone begrenzt.

Bereits wenige Tage nach Aufbau der Chemokline zeigten die mikrobiellen Gemeinschaften im Mikrokosmos Reaktionen, wie sie auch für mikrooxygenische Bereiche in natürlichen Chemoklinien charakteristisch sind. Hohe Gesamtbakterienzahlen, steigende zelluläre Biomassen und erhöhte Teilungsfähigkeiten werden auch für die Chemokline der Gotland See beschrieben.

Gleichzeitig stehen im sulfidischen Bereich des Mikrokosmos über Wochen ansteigende Sulfidkonzentrationen phasenweise mit dem Verlauf der Gesamtbakterienzahlen in Beziehung

3.3 Vergleichende Untersuchungen in der Chemokline der Gotland See und im Mikrokosmos

4 Wochen nach Aufbau der Chemokline wurden die bakteriellen Gemeinschaften anhand ihrer Abundanzen und Aktivitäten in 6 Tiefen des Mikrokosmos charakterisiert (Abb. 2.3-A). Die Ergebnisse wurden mit Messungen aus der Chemokline der Gotland See im Tiefenbereich von 120 - 135 m verglichen.

3.3.1 Die Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen

In der Chemokline der Gotland See gingen die O_2 -Konzentrationen im Tiefenbereich von 120-135 m von 1.5 mg l^{-1} auf 0 mg l^{-1} zurück (Abb. 3.12a). Die H_2S -Konzentration lag in 123 m Tiefe bei $<0.1 \mu\text{M}$ und erreichte $12 \mu\text{M}$ in 135 m Tiefe. Mit zunehmender Tiefe stieg die H_2S Konzentration weiter an.

Vier Wochen nach Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos lag der höchste Sauerstoffwert in der Tiefe 1 mit $5 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1}$ im oberen Bereich (Abb.3.12b). Der mikrooxygen-sulfidische Übergangsbereich ($0.5 - 0 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1}$) erstreckte sich in den Tiefen 4 - 5 über eine Breite von 4 cm. Das H_2S -Maximum erreichte im unteren Bereich des Mikrokosmos, der Tiefe 6, eine Konzentration von $22 \mu\text{M } H_2S$.

Der Verlauf des Sauerstoff-Sulfidprofils im Mikrokosmos war mit der Chemokline der Gotland See im April 1993 vergleichbar. Die Chemokline im Mikrokosmos war allerdings erheblich steiler als die natürliche Chemokline in der Gotland See. Im Mikrokosmos lag die Steilheit des Sauerstoffprofils bei $0.5 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, gegenüber $0.0015 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in der Gotland See. Die Steilheit des Sulfidprofils erreichte im Mikrokosmos $1.2 \mu\text{M } H_2S \text{ cm}^{-1}$, gegenüber $0.02 \mu\text{M } H_2S \text{ cm}^{-1}$ in der Gotland See.

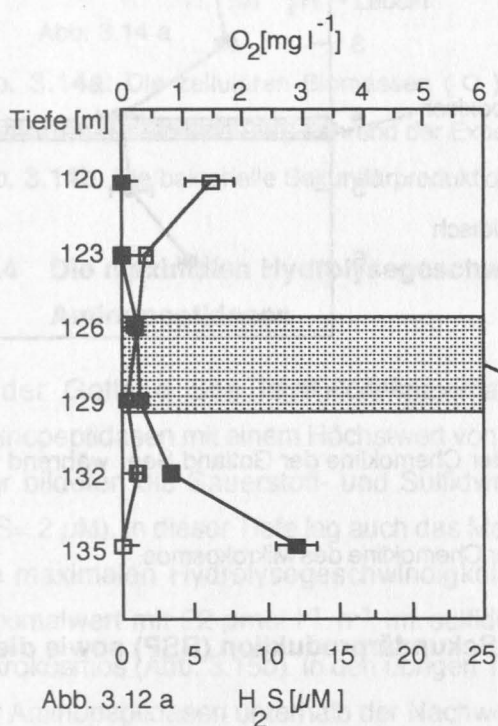


Abb. 3.12 a

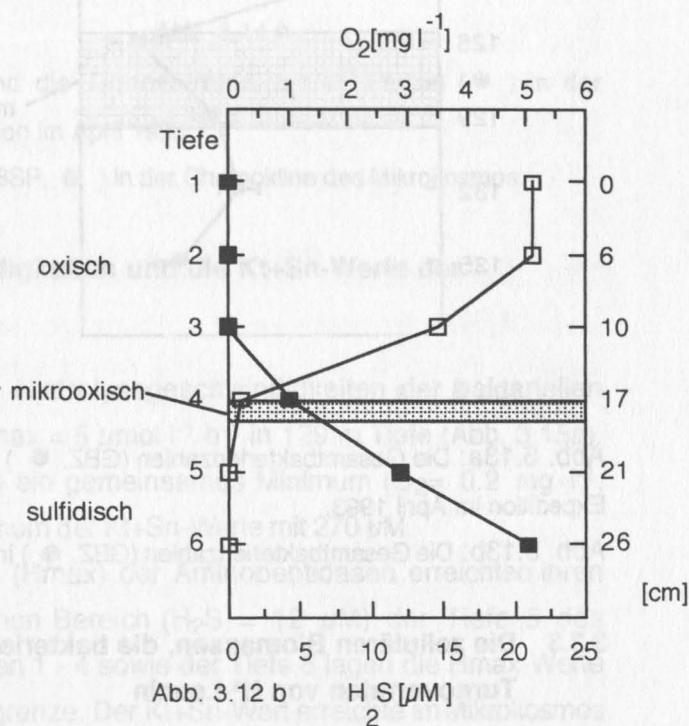


Abb. 3.12 b

Abb. 3.12a: Die Sauerstoff- (\square) und Sulfidkonzentrationen (\blacksquare) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.12b: Die Sauerstoff- (\square) und Sulfidkonzentrationen (\blacksquare) in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.3.2 Die Gesamtbakterienzahlen

In der Gotland See erreichten die Gesamtbakterienzahlen (GBZ) in 126 m Tiefe, im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich, einen Höchstwert von 1.7×10^6 Zellen ml^{-1} ($\text{O}_2 = 0.2 \text{ mg l}^{-1}$ und $\text{H}_2\text{S} = 2 \mu\text{M}$). Einer leichten Erniedrigung in 129 m Tiefe folgte ein erneuter Anstieg der GBZ ab 132 m Tiefe auf 1.4×10^6 Zellen ml^{-1} in 135 m (Abb.3.13a).

Im Mikrokosmos zeigten die Gesamtbakterienzahlen (GBZ) von Tiefe 1 bis 3 zunächst einen Rückgang der Abundanzen von 0.75 auf 0.55×10^6 Zellen ml^{-1} (Abb.3.13b). Beim Übergang in den mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Tiefe 4 ($\text{O}_2 = 0.2 \text{ mg l}^{-1}$ und $\text{H}_2\text{S} = 4 \mu\text{M}$) folgte jedoch eine Verdopplung der Abundanzen auf 1.15×10^6 Zellen ml^{-1} . Danach gingen die Zelldichten wieder bis auf 0.75×10^6 Zellen ml^{-1} in Tiefe 6 zurück.

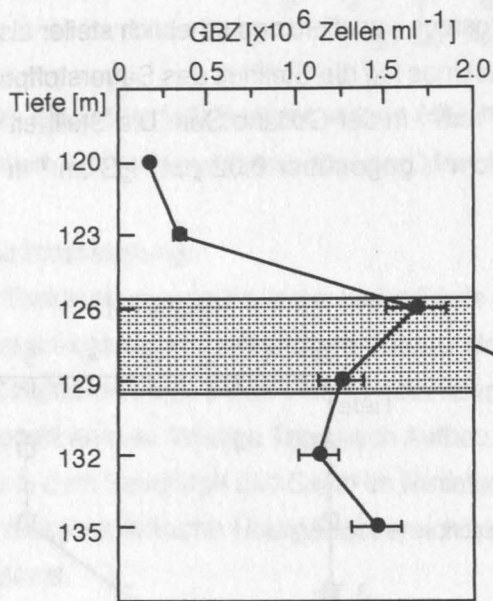


Abb. 3.13 a

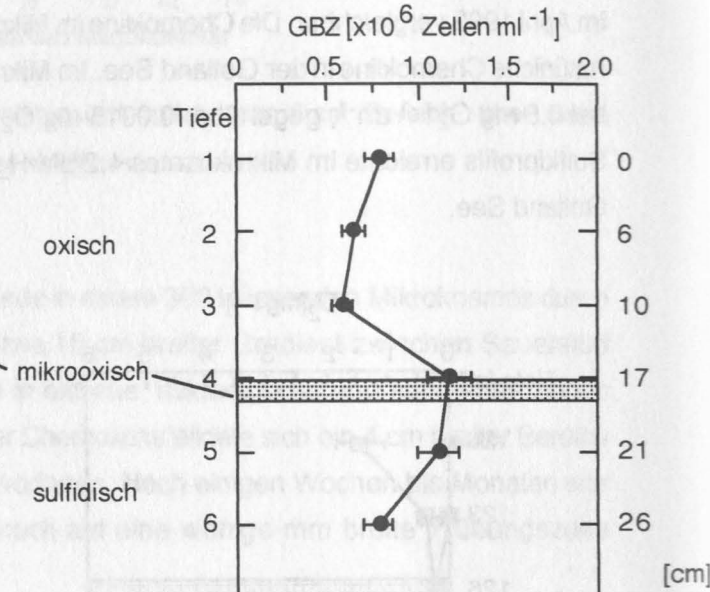


Abb. 3.13 b

Abb. 3.13a: Die Gesamtbakterienzahlen (GBZ, ●) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.13b: Die Gesamtbakterienzahlen (GBZ, ●) in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.3.3 Die zellulären Biomassen, die bakterielle Sekundärproduktion (BSP) sowie die Turnoverraten von H^3 -Leucin

In der Gotland See zeigten die zellulären Biomassen ihr Maximum mit $18 \text{ fgC Zelle}^{-1}$ in 129 m Tiefe (Abb. 3.14a). In diesem mikrooxisch-sulfidischen Bereich lagen Sauerstoff und Sulfid im Minimum vor. Die zellulären Biomassen korrespondierten deutlich mit dem Verlauf der Turnoverraten (Tr) von H^3 -Leucin. Deren Höchstwert lag mit $\text{Tr} = 130\% \text{ d}^{-1}$ ebenfalls in 129 m Tiefe. In den übrigen Tiefen waren die Tr-Werte vernachlässigbar niedrig.

In den oxischen Tiefen 1-2 des Mikrokosmos lag die BSP bei $0.3 \mu\text{gC l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Abb.3.14b). Mit sinkender Sauerstoffkonzentration und steigender Sulfidkonzentration war ein Anstieg der BSP zu beobachten. In der mikrooxischen Tiefe 4 und der sulfidischen Tiefe 5 erreichte die BSP ihre

Maximalwerte mit $1.3\text{-}1.4 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Danach folgte ein leichter Rückgang auf $1.1 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der sulfidischen Tiefe 6.

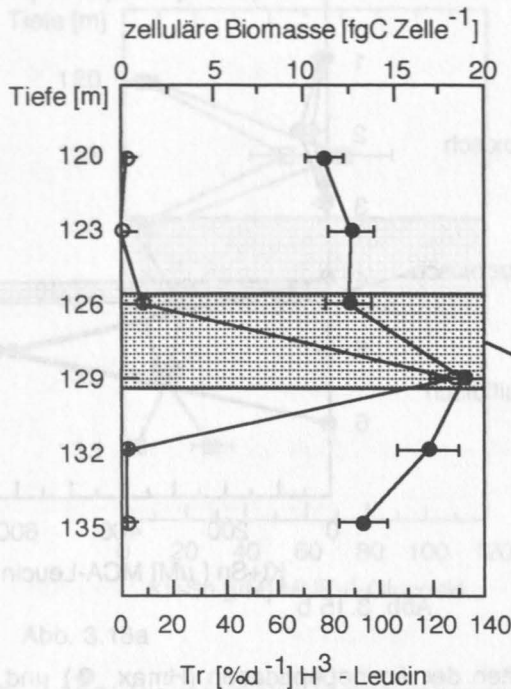


Abb. 3.14 a

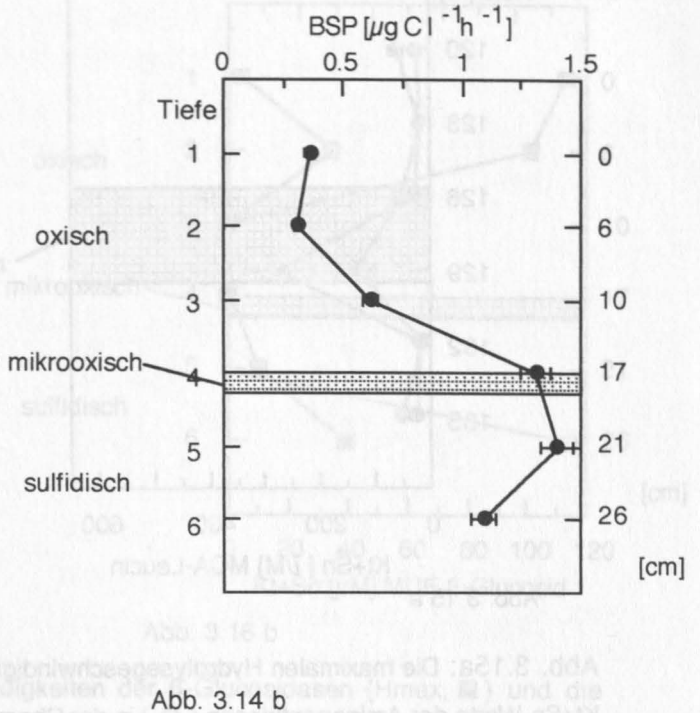


Abb. 3.14 b

Abb. 3.14a: Die zellulären Biomassen (○) und die Turnoverraten von H^3 -Leucin (●) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.14b: Die bakterielle Sekundärproduktion (BSP, ●) in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.3.4 Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten und die Kt+Sn-Werte der Aminopeptidasen

In der Gotland See lagen die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der bakteriellen Aminopeptidasen mit einem Höchstwert von $H_{\text{max}} = 5 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in 129 m Tiefe (Abb. 3.15a). Hier bildeten die Sauerstoff- und Sulfidwerte ein gemeinsames Minimum ($\text{O}_2 = 0.2 \text{ mg l}^{-1}$; $\text{H}_2\text{S} = 2 \mu\text{M}$). In dieser Tiefe lag auch das Maximum der Kt+Sn-Werte mit $270 \mu\text{M}$.

Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) der Aminopeptidasen erreichten ihren Maximalwert mit $22 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im sulfidischen Bereich ($\text{H}_2\text{S} = 12 \mu\text{M}$) der Tiefe 5 des Mikrokosmos (Abb. 3.15b). In den übrigen Tiefen 1 - 4 sowie der Tiefe 6 lagen die H_{max} -Werte der Aminopeptidasen unterhalb der Nachweisgrenze. Der Kt+Sn-Wert erreichte im Mikrokosmos mit $650 \mu\text{M}$ seinen Höchstwert in der Tiefe 5 ($\text{H}_2\text{S} = 4 \mu\text{M}$). In den übrigen Tiefen des Mikrokosmos und der Gotland See blieben die Kt+Sn-Werte vernachlässigbar niedrig.

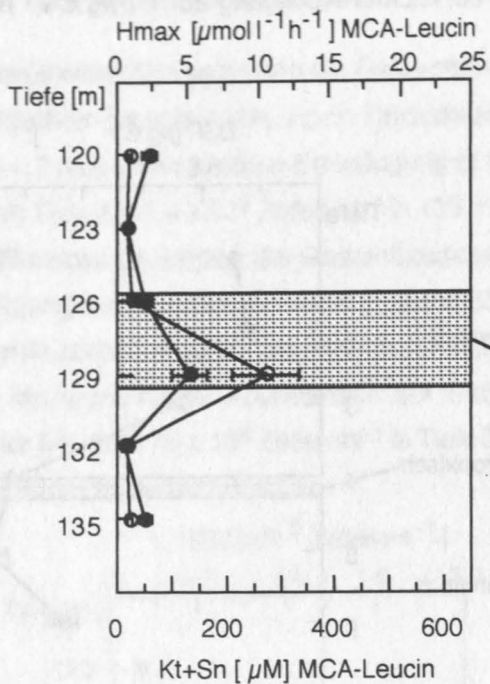


Abb. 3.15 a

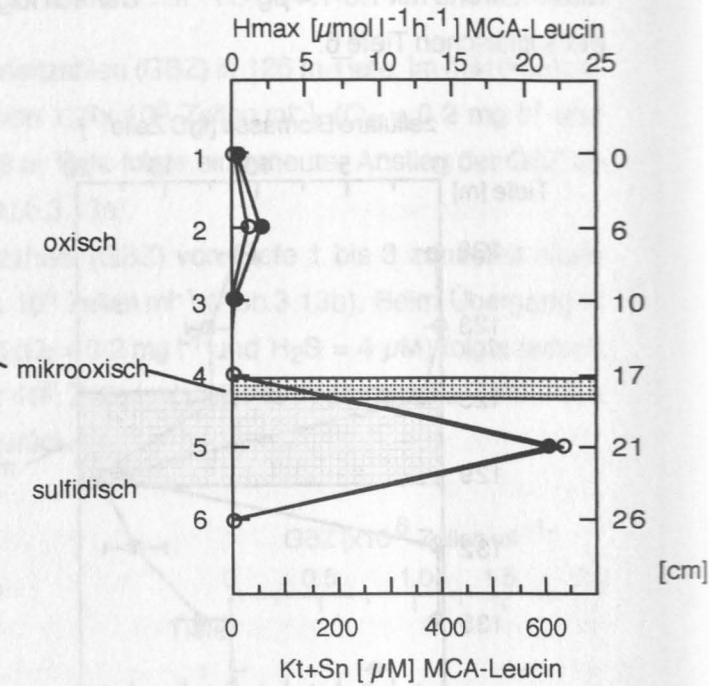


Abb. 3.15 b

Abb. 3.15a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Aminopeptidasen (H_{max} , ●) und die $Kt+Sn$ -Werte der Aminopeptidasen (○) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.15b: Der Verlauf der maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max} , ●) und die $Kt+Sn$ -Werte (○) der Aminopeptidasen in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.3.5 Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten und die $Kt+Sn$ -Werte der β -Glucosidasen

Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) der β -Glucosidasen erreichten den höchsten Wert ($H_{\text{max}} = 0.16 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$) im mikrooxischen Bereich ($0.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) der Gotland See in 123 m Tiefe (Abb. 3.16a). Die niedrigsten H_{max} -Werte fielen mit einem Sauerstoffminimum ($0.1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) in 129 m Tiefe zusammen und wurden anschließend von einem leichten Anstieg bis den sulfidischen Bereich auf $H_{\text{max}} = 0.06 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($12 \mu\text{M H}_2\text{S}$) gefolgt. Die $Kt+Sn$ -Werte fielen mit ihren Maxima mit den H_{max} -Werten im mikrooxischen Bereich von 123 m Tiefe zusammen. Im Mikrokosmos zeigten die β -Glucosidasen ihre maximalen Aktivitäten (H_{max}) mit $0.23 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ im oxischen Bereich der Chemokline (Tiefen 1 - 2, $5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$). Die niedrigsten Werte lagen im mikrooxischen Bereich (Tiefen 4 - 5) mit einem leichten Anstieg in der sulfidischen Tiefe 6 auf $H_{\text{max}} = 0.07 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$. Noch ausgeprägter war hier der Anstieg des $Kt+Sn$ -Wertes. Der Anstieg der H_{max} -Werte im Oxischen und der erneute Anstieg im sulfidischen Bereich der Chemoklinen war für die Gotland See und den Mikrokosmos charakteristisch.

Die Maxima der Glucosidasen und Aminopeptidasen lagen innerhalb der Chemokline der Gotland See 5 m voneinander getrennt. Während die Glucosidasen im oxischen Bereich der Chemokline ihre Höchstwerte aufwiesen (Abb. 3.16a-b), lagen die Maximalwerte der Aminopeptidasen im mikrooxisch-sulfidischen Bereich (Abb. 3.15a-b).

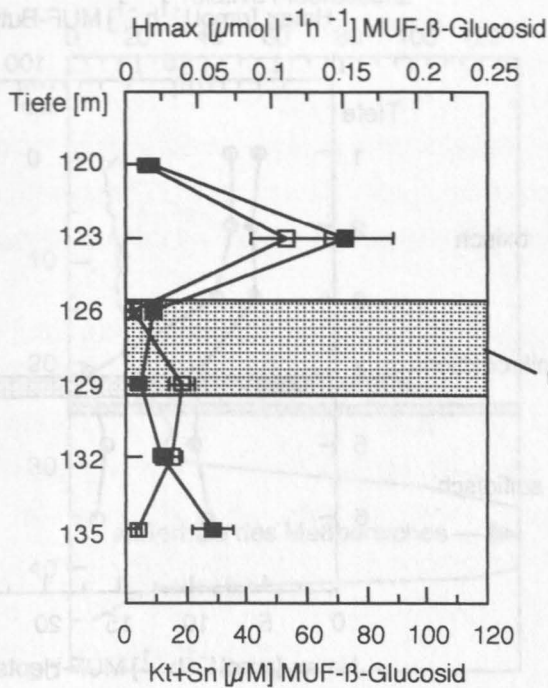


Abb. 3.16a

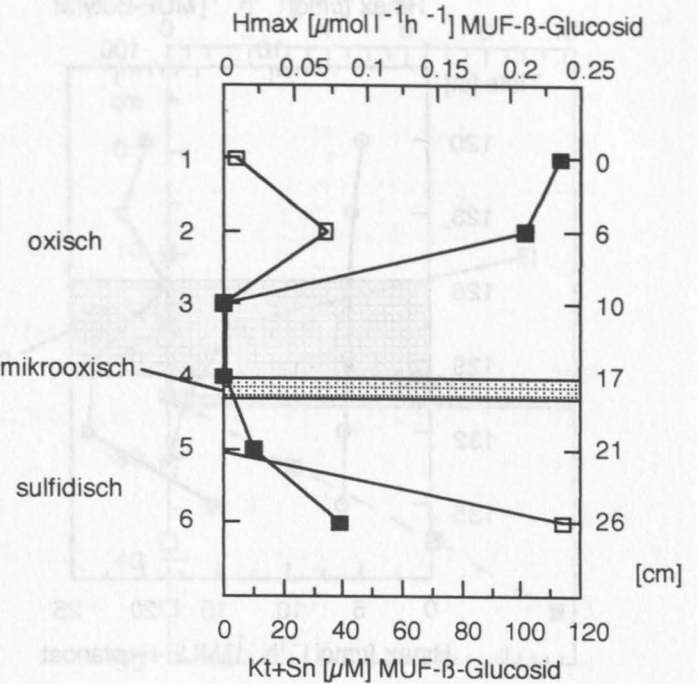


Abb. 3.16 b

Abb. 3.16a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der β -Glucosidasen (H_{\max} , ■) und die Kt+Sn-Werte (□) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.16b: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{\max} , ■) und die Kt+Sn-Werte □ der β -Glucosidasen in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.3.6 Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Esterasen

Die mit Hilfe des Substratanalogs MUF-Heptanoat erfaßten H_{\max} -Werte der extrazellulären Esterasen zeigten beim Übergang vom oxischen in den anoxischen Bereich der Chemokline einen fast linearen Anstieg von 4.5 bis 7 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Abb.3.17a). Zusätzlich wurde MUF-Butyrat als ein alternatives Substrat für die Esterasen eingesetzt. Auch hier war beim Übergang vom oxischen in den anoxischen Bereich nach einer leichten Erniedrigung in 126 m Tiefe ein Anstieg der H_{\max} -Werte zu beobachten. Ab 132 m Tiefe sanken die Werte jedoch wieder von 150 auf 20 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ab. Die höchsten Werte fielen in 129 - 132 m Tiefe mit der maximalen Aktivität der Aminopeptidasen zusammen (Abb.3.15a).

Im oxischen Bereich des Mikrokosmos waren niedrige H_{\max} -Werte der Esterasen zu verzeichnen (MUF-Butyrat, 3 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$; MUF-Heptanoat, 7 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$; Abb. 3.17b). Diese wurden beim Übergang in die sulfidischen Tiefen von einem starken Anstieg gefolgt (MUF-Butyrat, 8 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$; MUF-Heptanoat, 16 $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$). Im Mikrokosmos lag der H_{\max} -Wert für das Substratanalog MUF-Butyrat jedoch um mehr als eine Größenordnung unter den Werten die in der Gotland See bestimmt wurden (Abb.3.17a).

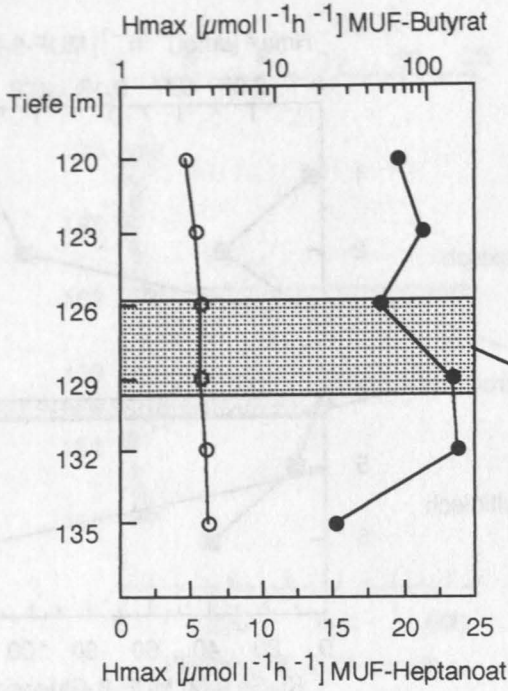


Abb. 3.17 a

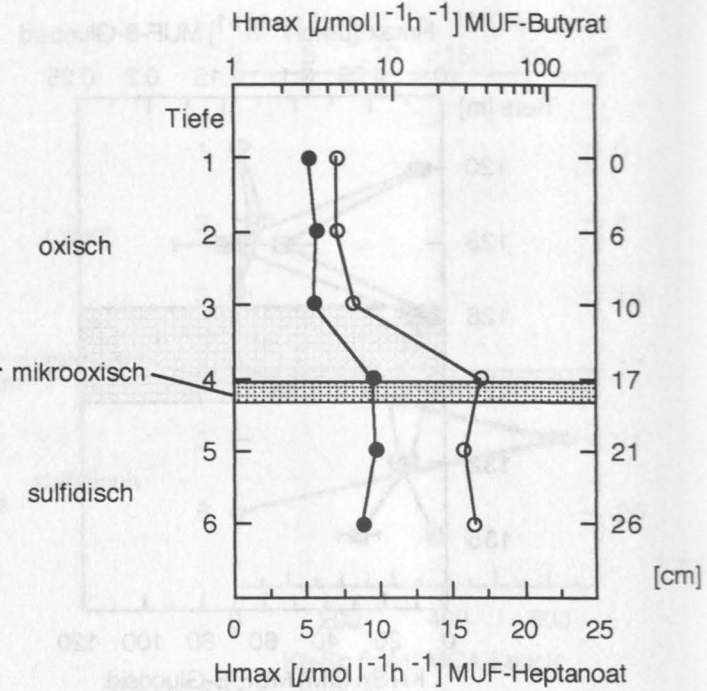


Abb. 3.17 b

Abb. 3.17a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) der Esterasen, für das Substrat MUF-Butyrat (●) und das Substrat MUF-Heptanoat (○) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.17b: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) der Esterasen in der Chemokline des Mikrokosmos. Als Substratanaloga kamen MUF-Heptanoat (○) und MUF-Butyrat (●) zum Einsatz.

***In situ* Aktivitäten der Esterasen in der Chemokline des Mikrokosmos**

Die Erfassung der *in situ* Aktivitäten der Esterasen erfolgte mit Hilfe von MUF-Butyrat als Substratanalog. Das aufgezeichnete Aktivitätsprofil zeigte mit sinkender Sauerstoffkonzentration und beim Übergang in den sulfidischen Bereich deutlich einen langsamen Anstieg der Enzymaktivität (Abb. 3.18a-b). Direkt unterhalb der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht, welche durch eine Trübungszone markiert wurde (Abb. 3.18b), erfolgte der sprunghafte Anstieg der Aktivität, der aus dem Meßbereich des Gerätes herausführte. Mit weiter ansteigender Sulfidkonzentration ging die Aktivität jedoch wieder auf den Anfangswert des oxischen Bereiches der Chemokline zurück.

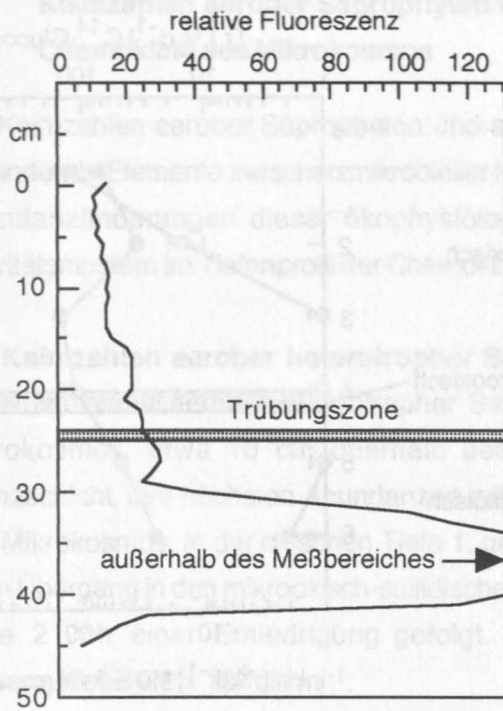


Abb. 3.18a

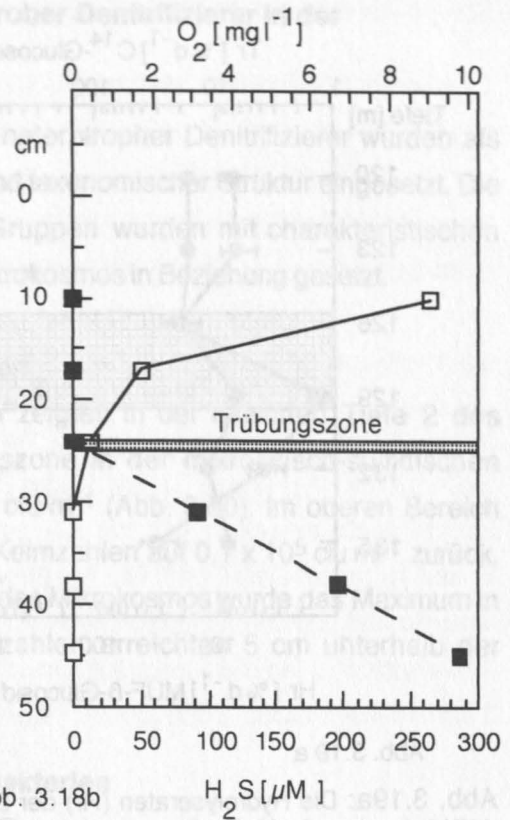


Abb. 3.18b

Abb. 3.18a: Das Tiefenprofil der relativen *in situ* Aktivitäten der Esterasen (relative Fluoreszenzeinheiten) über den Tiefenbereich von 0 - 45 cm in der Chemokline des Mikrokosmos.

Abb. 3.18b: Die O_2 - (□) und H_2S - (■) Konzentrationen im Mikrokosmos zwei Monate nach Aufbau der Chemokline. Die Trübungszone markiert den mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich.

3.3.7 Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und die Turnoverraten von C^{14} -Glucose

Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen zeigten zunächst im mikrooxischen Bereich bei 126 m und $0.25 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1}$ ein Maximum von $20 \% \text{ d}^{-1}$, welches mit dem Höchstwert der Turnoverrate von C^{14} -Glucose ($Tr = 20 \% \text{ d}^{-1}$) zusammenfiel (Abb. 3.19a). Beide Variablen zeigten einen parallelen Verlauf und erreichten bei 129 m gemeinsam ihren niedrigsten Wert mit $1 - 6 \% \text{ d}^{-1}$. Mit zunehmender Tiefe folgte ein Anstieg der Hydrolyserate, der für die Turnoverrate von C^{14} -Glucose ab 132 m in einer Erniedrigung mündete. Die Hydrolyserate der β -Glucosidasen stieg dagegen bis 135 m weiter an auf $Hr = 33 \% \text{ d}^{-1}$.

In den oxischen Tiefen 1 - 2 ($5 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1}$) des Mikrokosmos zeigten die Turnoverraten von C^{14} -Glucose und die Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidasen zunächst noch einen parallelen Verlauf (Abb. 3.19b). Beim Übergang in den mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Tiefen 3 - 5 war Hr jedoch nicht mehr detektierbar. Erst in der sulfidischen Tiefe 6 ($22 \mu\text{M } H_2S$) war wieder ein leichter Anstieg der Hydrolyserate von 0 auf $2 \% \text{ d}^{-1}$ zu verzeichnen. Das Maximum der Turnoverrate von C^{14} -Glucose in der oxischen Tiefe 3 des Mikrokosmos ($3 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1}$; $Tr = 149 \% \text{ d}^{-1}$) wurde beim Übergang in die sulfidische Zone von einer kontinuierlichen Erniedrigung gefolgt. Im Mikrokosmos lagen die maximalen Turnoverraten etwa eine Größenordnung über den Werten in der Gotland See.

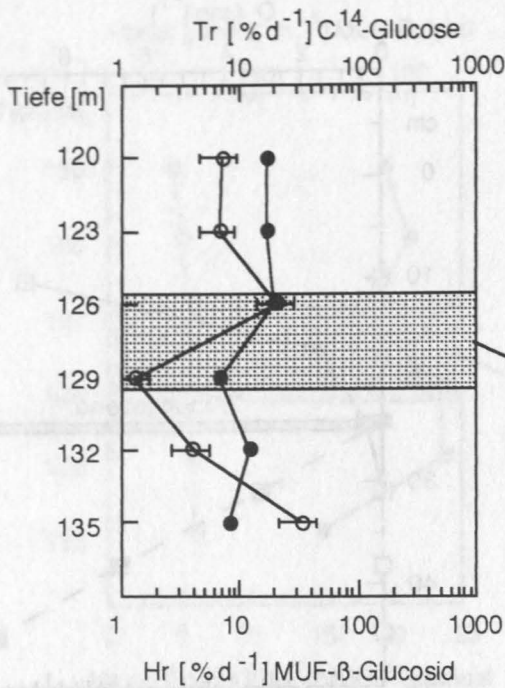


Abb. 3.19 a

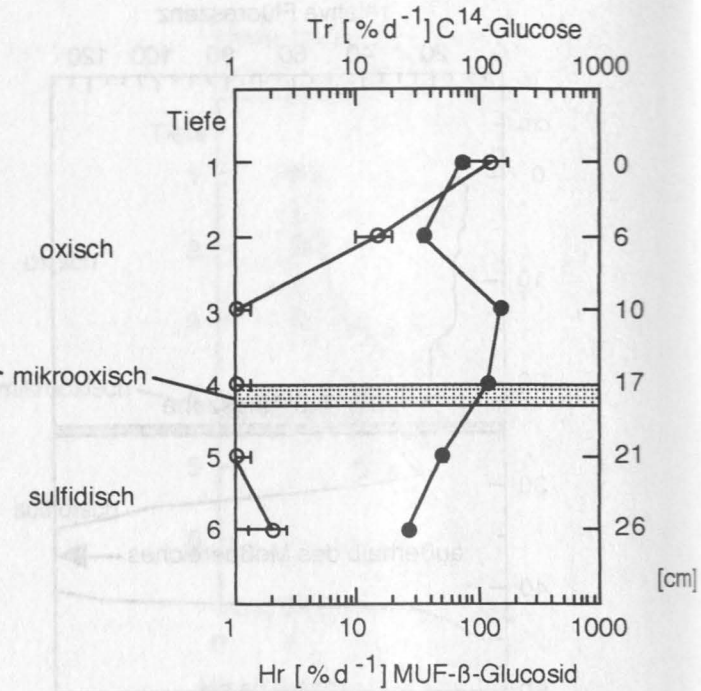


Abb. 3.19 b

Abb. 3.19a: Die Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidasen (O) und die Turnoverraten (Tr) von C^{14} -Glucose (●) in der Chemokline der Gotland See, während der Expedition im April 1993.

Abb. 3.19b: Die Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidasen (O) und die Turnoverraten (Tr) von C^{14} -Glucose (●) in der Chemokline des Mikrokosmos.

Zusammenfassung:

Es konnte gezeigt werden, daß die hier als Chemokline definierten Tiefenbereiche im Tiefenwasser der Gotland See während der Expedition im April 1993 (120 -135 m Tiefe) und im Mikrokosmos (Tiefe 1 - 6, 0 - 26 cm) zwei deutlich voneinander abgegrenzte mikrobielle Aktivitätszonen aufwiesen. Ein oxisch-mikrooxischer Bereich wurde von der Hydrolyse und der Aufnahme glycosidischer Verbindungen dominiert. Ein anoxisch-sulfidischer Bereich wurde von einem Anstieg der Esteraseaktivität beherrscht und wies die höchsten Aktivitäten der Aminopeptidasen bei gleichzeitig erhöhten Kt+Sn-Werten auf. Diese wiederum korrespondierten mit den Maxima der zellulären Biomassen, sowie mit der bakteriellen Sekundärproduktion.

Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen koinzidierten im oxischen Bereich der Chemokline der Gotland See eher mit den Gesamtbakterienzahlen als mit den zellulären Biomassen. Nach einem deutlichen Rückgang der ektoenzymatischen Aktivitäten der β -Glucosidasen im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich zeigten die Werte unter sulfidischen Bedingungen wieder einen leichten Anstieg. Die Turnoverraten von C^{14} -Glucose gingen jedoch beim Übergang in den sulfidischen Bereich kontinuierlich zurück.

3.4 Keimzahlen aerober Saprophyten und anaerober Denitrifizierer in der Chemokline des Mikrokosmos

Die Keimzahlen aerober Saprophyten und anaerober heterotropher Denitrifizierer wurden als verbindende Elemente zwischen mikrobieller Funktion und taxonomischer Struktur eingesetzt. Die Abundanzänderungen dieser ökophysiologischen Gruppen wurden mit charakteristischen Aktivitätsmustern im Tiefenprofil der Chemokline des Mikrokosmos in Beziehung gesetzt.

Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten

Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten zeigten in der oxischen Tiefe 2 des Mikrokosmos, etwa 10 cm oberhalb der Trübungszone in der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht, ihre höchsten Abundanzen mit 0.7×10^5 cfu ml⁻¹ (Abb. 3.20). Im oberen Bereich des Mikrokosmos, in der oxischen Tiefe 1, gingen die Keimzahlen auf 0.1×10^5 cfu ml⁻¹ zurück. Beim Übergang in den mikrooxisch-sulfidischen Bereich des Mikrokosmos wurde das Maximum in Tiefe 2 von einer Erniedrigung gefolgt. Die Keimzahlen erreichten 5 cm unterhalb der Trübungszone 0.2×10^5 cfu ml⁻¹.

Die Keimzahlen heterotropher denitrifizierender Bakterien

In allen Tiefenbereichen des Mikrokosmos wurden NO₃⁻-reduzierende Bakterien durch MPN-Zählungen nachgewiesen (Abb.3.20). Im oxischen Bereich der Chemokline, 17 cm oberhalb der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht, waren die Keimzahlen mit 800-2000 MPN ml⁻¹ am niedrigsten. 10 cm oberhalb dieser Schicht ($2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) wurden 7000 MPN ml⁻¹ erreicht. Die höchsten Zahlen wurden 4 cm unterhalb der Grenzschicht, im sulfidischen Bereich ($12 \mu\text{M H}_2\text{S}$), mit 1.9×10^5 MPN ml⁻¹ bestimmt. Mit zunehmender Tiefe ($20 \mu\text{M H}_2\text{S}$) gingen die Abundanzen auf 0.65×10^5 MPN ml⁻¹ zurück.

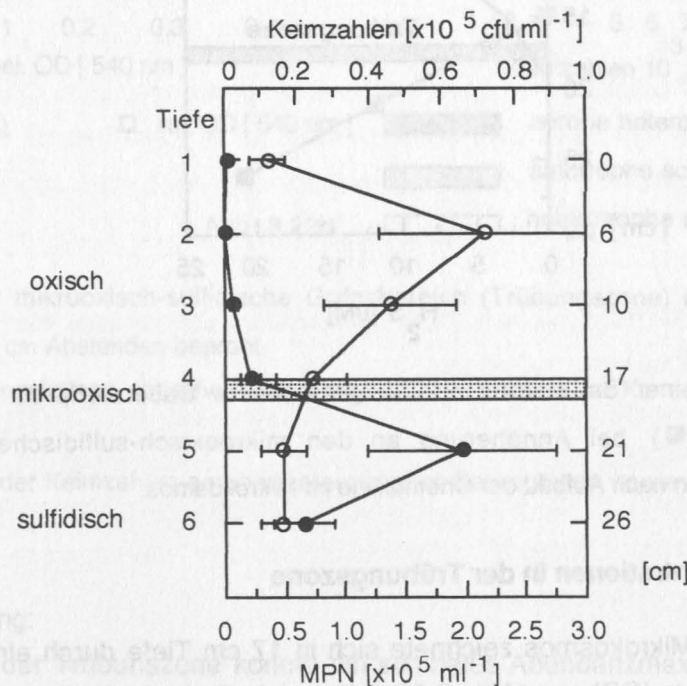


Abb. 3.20: Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten (O) und die Abundanzen (MPN-Zahlen) NO₃⁻-reduzierender Bakterien (●) in der Chemokline des Mikrokosmos.

3.5 Die mikrooxisch-sulfidische Grenzschicht im Mikrokosmos

Chemoautotrophe Bakterien sind auf das gleichzeitige Vorhandensein von Sauerstoff und Sulfid angewiesen. In der Chemokline des Mikrokosmos waren diese Voraussetzungen auf eine nur wenige mm breite Trübungszone im oxisch-sulfidischen Grenzbereich beschränkt. Mit Hilfe einer kleinskaligen Probennahmetechnik (Gefrierschöpfer) wurden die Keimzahlen heterotropher und autotropher schwefeloxidierender Bakterien in diesem Bereich quantifiziert.

3.5.1 Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen

Etwa 4 Wochen nach Aufbau einer neuen Chemokline im Mikrokosmos lag die Sauerstoffkonzentration 17 bis 10 cm (0 - 7 cm Tiefe) oberhalb der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht zwischen 5.0 und 5.8 mg O₂ l⁻¹. 5 cm oberhalb der Grenzschicht folgte eine Erniedrigung auf 2 mg O₂ l⁻¹. Bei Annäherung an die Grenzschicht auf 2 cm (15 cm Tiefe) war ein lineares Absinken der O₂-Konzentration auf 0.7 mg O₂ l⁻¹ zu beobachten. In 17 cm Tiefe (in der Trübungszone) lag die Sauerstoffkonzentration bei 0.2 mg O₂ l⁻¹. Die H₂S-Konzentration stieg 3 cm unterhalb dieser Zone (20 cm Tiefe) auf 12 μM H₂S an (Abb.3.21).

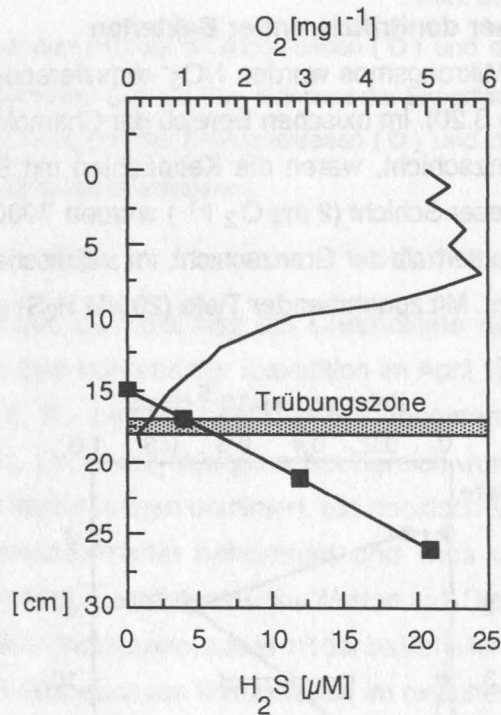


Abb. 3.21: Das mit einer Sauerstoffsonde aufgezeichnete Sauerstoffprofil (—) sowie die Sulfidkonzentrationen (■) bei Annäherung an den mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich (Trübungszone) 4 Wochen nach Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos.

3.5.2 Schwefelkonzentrationen in der Trübungszone

Die Trübungszone im Mikrokosmos zeichnete sich in 17 cm Tiefe durch einen Anstieg der relativen optischen Dichte (OD) aus (Abb. 3.22a). 1 cm oberhalb dieser Zone befand sich das Maximum der Konzentration elementaren Schwefels mit 8 μM S⁰. Die durchschnittliche Schwefelkonzentration lag 2 cm oberhalb und unterhalb der Trübungszone bei 6 μM S⁰.

3.5.3 Keimzahlen heterotropher- und autotropher Schwefeloxidierer

Bei den hier bestimmten Keimzahlen war mit einer Unterschätzung um bis zu 85 % zu rechnen, da die Probennahme mit dem Gefrierschöpfer durchgeführt wurde. Hier kam es nur auf den Vergleich der Keimzahlen im Bereich der Trübungszone an. In 27 cm Tiefe (1 cm unterhalb der Trübungszone) bildeten die Keimzahlen autotropher schwefeloxidierender Bakterien ein ausgeprägtes Maximum mit 7.7×10^3 cfu ml⁻¹, welches von einem Maximum heterotropher schwefeloxidierender Bakterien mit 1.7×10^3 cfu ml⁻¹ begleitet wurde (Abb. 3.22b). In den übrigen Tiefen wurden keine Keimzahlen schwefeloxidierender Bakterien quantifiziert. Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten zeigten in 24 cm Tiefe (2 cm oberhalb der Trübungszone) ihr Minimum mit 1.0×10^3 cfu ml⁻¹, welches von einem kontinuierlichen Anstieg auf 6.5×10^3 cfu ml⁻¹ in 28 cm Tiefe (2 cm unterhalb der Trübungszone) gefolgt wurde.

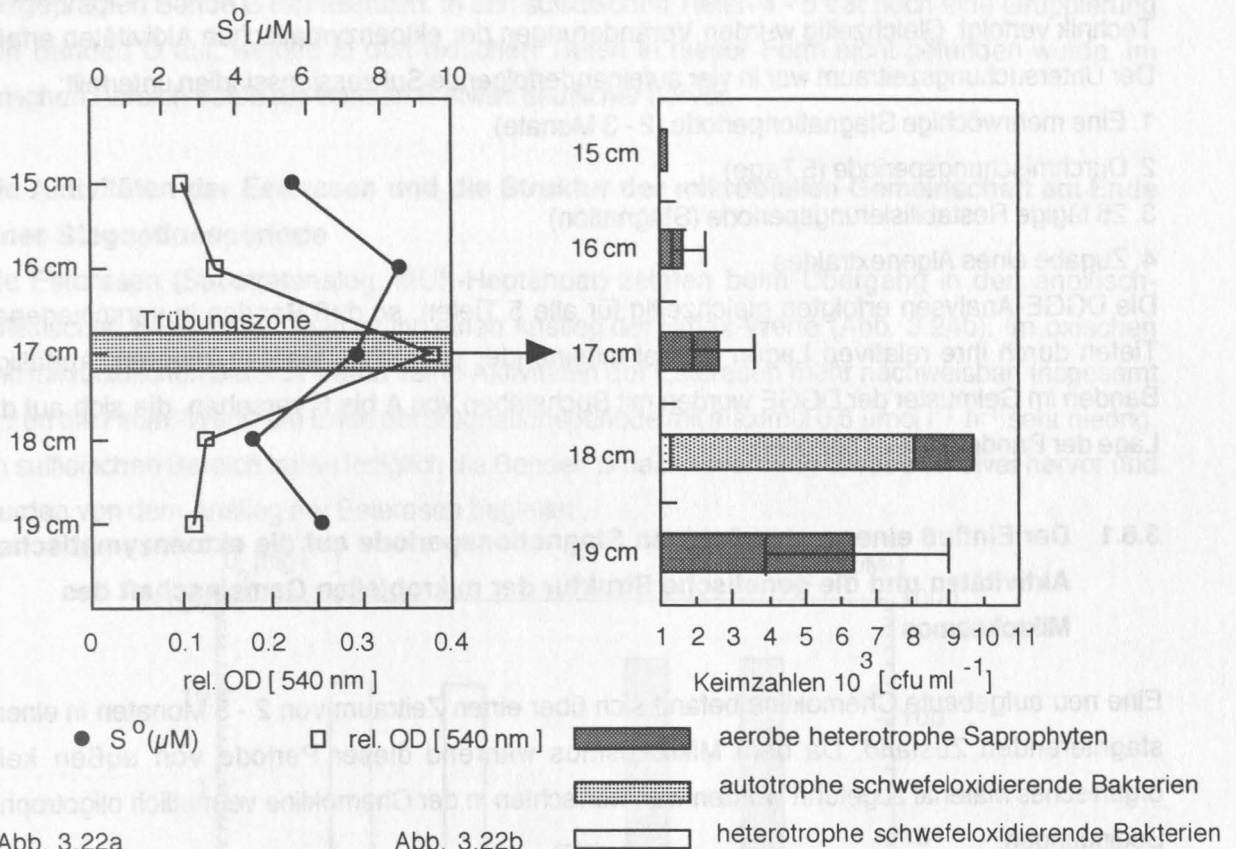


Abb. 3.22a

Abb. 3.22b

Abb. 3.22: Der mikrooisch-sulfidische Grenzbereich (Trübungszone) in der Chemokline im Mikrokosmos, in 1 cm Abständen beprobt.

a: Der Verlauf der relativen optischen Dichte (rel. OD, □) sowie die Konzentrationen elementaren Schwefels (S⁰, ●)

b: Die Verteilung der Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten sowie auto- und heterotropher Schwefeloxidierer.

Zusammenfassung:

1 cm unterhalb der Trübungszone konnte ein schmales Abundanzmaximum autotropher und heterotropher schwefeloxidierender Bakterien von der Aktivitätszone denitrifizierender Bakterien abgegrenzt werden. Die Abundanzmaxima denitrifizierender Bakterien sowie die erhöhten

mikrobiellen Aktivitäten (Aminopeptidasen, Esterasen und BSP) traten im sulfidischen Tiefenbereich auf. Aerobe heterotrophe Saprophyten zeigten ihre absoluten Höchstwerte gemeinsam mit den maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der β -Glucosidasen im oxischen Bereich der Chemokline. Gleichzeitig konnte 2 cm unterhalb des mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereiches ein erneuter Anstieg der Keimzahler aerober heterotropher Saprophyten beobachtet werden.

3.6 Die Genetische Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos und deren ektoenzymatische Aktivitäten

Die Strukturveränderungen mikrobieller Gemeinschaften im oxischen, mikrooxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline des Mikrokosmos wurden über 6 Wochen mit der DGGE-Technik verfolgt. Gleichzeitig wurden Veränderungen der ektoenzymatischen Aktivitäten erfaßt. Der Untersuchungszeitraum war in vier aufeinanderfolgende Sukzessionsstadien unterteilt:

1. Eine mehrwöchige Stagnationsperiode (2 - 3 Monate)
2. Durchmischungsperiode (5 Tage)
3. 26 tägige Restabilisierungsperiode (Stagnation)
4. Zugabe eines Algenextraktes

Die DGGE-Analysen erfolgten gleichzeitig für alle 5 Tiefen, so daß Banden in verschiedenen Tiefen durch ihre relativen Lagen im Gel miteinander verglichen werden konnten. Auffällige Banden im Gelmuster der DGGE wurden mit Buchstaben von A bis F versehen, die sich auf die Lage der Banden im Gel bezogen.

3.6.1 Der Einfluß einer mehrwöchigen Stagnationsperiode auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos

Eine neu aufgebaute Chemokline befand sich über einen Zeitraum von 2 - 3 Monaten in einem stagnierenden Zustand. Da dem Mikrokosmos während dieser Periode von außen kein organisches Material zugeführt worden war, herrschten in der Chemokline vermutlich oligotrophe Bedingungen.

Die Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen in der Chemokline des Mikrokosmos nach einer mehrwöchigen Stagnationsperiode

Nach einer 2 - 3 monatigen Stagnationsperiode lagen die Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen im mikrooxisch-sulfidischen Bereich des Mikrokosmos (Tiefe 3, Trübungszone) bei $O_2 = 0.19 \text{ mg l}^{-1}$ und $H_2S = 7 \mu\text{M}$ (Abb. 3.23). 10 cm oberhalb der Trübungszone, im oxischen Bereich, erreichte die Sauerstoffkonzentration 11.4 mg l^{-1} . 10 cm unterhalb der Trübungszone, im sulfidischen Bereich, lag die H_2S -Konzentration bei $327 \mu\text{M}$.

Die Aktivitäten der Glucosidasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft am Ende einer Stagnationsperiode

Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) der α - und β -Glucosidasen waren am Ende der Stagnationsperiode in der Chemokline des Mikrokosmos stark erniedrigt (Abb. 3.24a). Die H_{max} -Werte der α -Glucosidasen erreichten in den oxischen (Tiefe 1 - 2) und den sulfidischen Tiefen (Tiefe 4 - 5) Werte um $0.001-0.01 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$. Die H_{max} -Werte der β -Glucosidasen lagen zwischen $0.01-0.015 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Die Glucosidasen zeigten ein Aktivitätsmaximum im mikrooxisch-sulfidischen Bereich (Tiefe 3) der Chemokline, mit Werten um $0.022-0.025 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$. Die DGGE-Analyse zeigte eine Bande A, die nur in diesem Bereich gemeinsam mit dem Maximum der Glucosidasen auftrat. Weitere Muster im DGGE-Gel wurden in diesem Bereich durch die Bande B und der etwas schwächer ausgeprägten Bande G repräsentiert. In den sulfidischen Tiefen 4 - 5 trat noch eine Gruppierung von Banden D auf, welche in den oxischen Tiefen in dieser Form nicht gefunden wurde. Im oxischen Bereich traten die Banden E etwas deutlicher hervor.

Die Aktivitäten der Esterasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft am Ende einer Stagnationsperiode

Die Esterasen (Substratanalog: MUF-Heptanoat) zeigten beim Übergang in den anoxisch-sulfidischen Bereich der Chemokline einen Anstieg der H_{max} -Werte (Abb. 3.24b). Im oxischen und mikrooxischen Bereich waren keine Aktivitäten der Esterasen mehr nachweisbar. Insgesamt waren die H_{max} -Werte am Ende der Stagnationsperiode mit maximal $0.6 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ sehr niedrig. Im sulfidischen Bereich traten lediglich die Banden D nach Anfärbung etwas intensiver hervor und wurden von dem Anstieg der Esterasen begleitet.

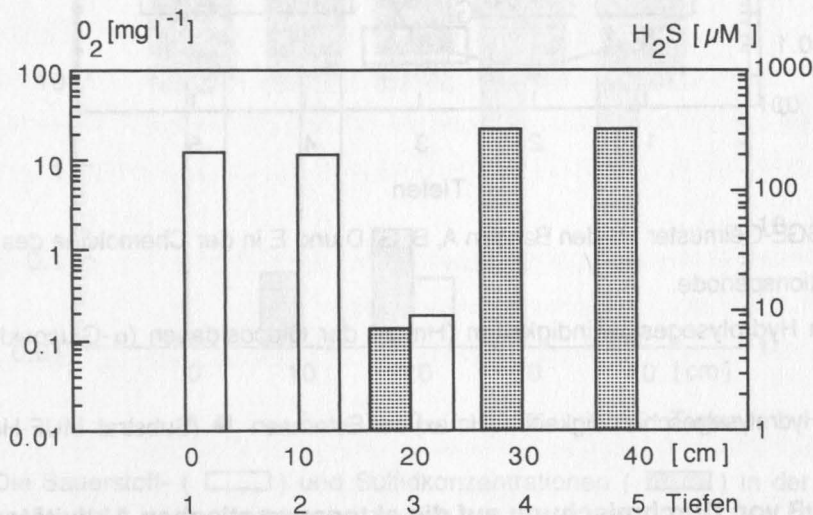




Abb. 3.23: Die Sauerstoff- () und Sulfidkonzentrationen () in der Chemokline des Mikrokosmos nach einer mehrwöchigen Stagnationsperiode

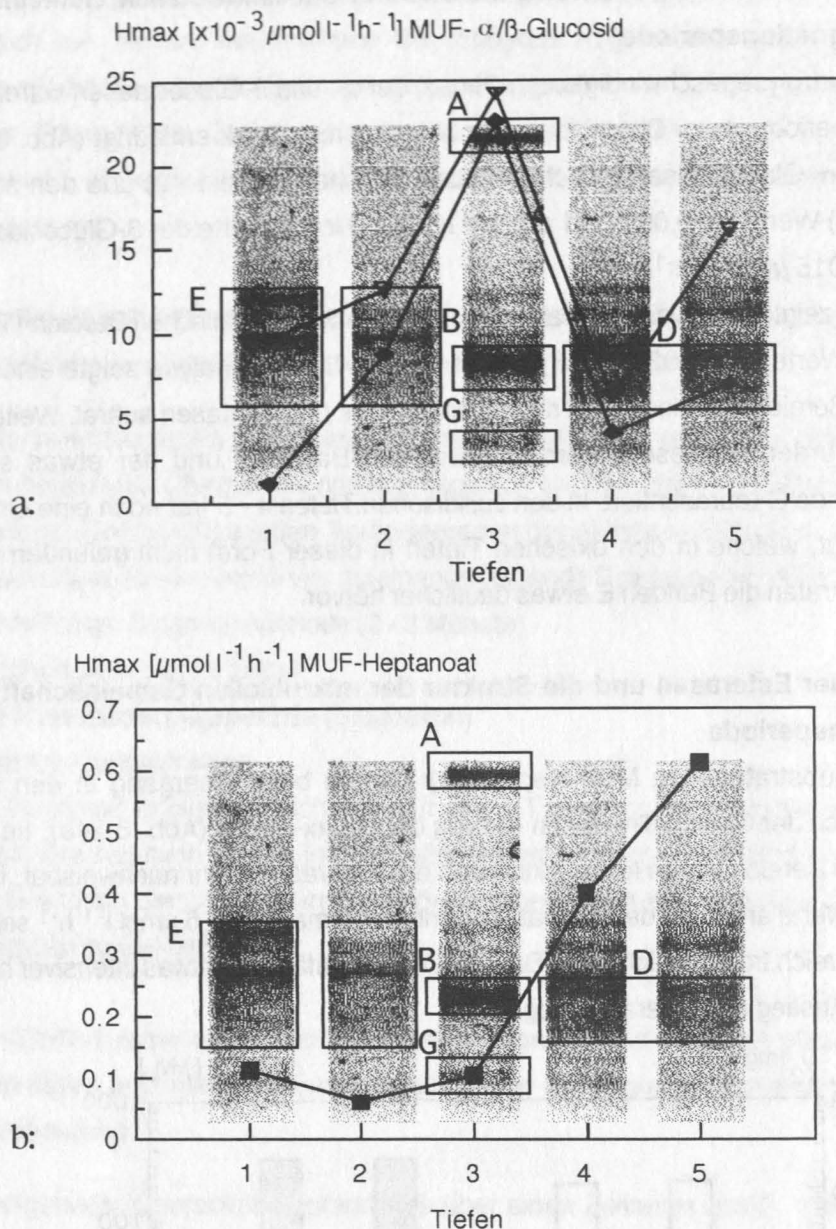


Abb. 3.24: Die DGGE-Gelmuster mit den Banden A, B, G, D und E in der Chemokline des Mikrokosmos nach einer Stagnationsperiode.

a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Glucosidasen (α -Glucosidase \blacklozenge , β -Glucosidase \blacktriangledown)

b: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Esterasen \blacksquare (Substrat: MUF-Heptanoat)

3.6.2 Der Einfluß von Durchmischung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos

Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen während der Durchmischungsperiode

Im mikrooxisch-sulfidischen Bereich des Mikrokosmos führte die 5 tägige Durchmischung zu einer Auflösung der Trübungzone (Abb. 3.25). Im oxischen Bereich (Tiefe 2, $11 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) waren noch $4 \mu\text{M H}_2\text{S}$ detektierbar. Im mikrooxischen Bereich (Tiefe 3, $0.06 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) erreichte die H_2S -Konzentration $10 \mu\text{M}$. Während der Durchmischungsperiode ging die Sulfidkonzentration im sulfidischen Bereich von 327 auf $234 \mu\text{M H}_2\text{S}$ zurück.

Die Aktivitäten der Glucosidasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft am Ende der Durchmischungsperiode

Das Maximum der β -Glucosidase war vom mikrooxischen Bereich der Tiefe 3 in den oxischen Bereich der Tiefe 2 verschoben. Die durch die Reoxidation sulfidischen Wassers hervorgerufene Aktivitätssteigerung der β -Glucosidase erreichte 400 % (von $H_{max} = 0.025 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ in Tiefe 3, auf $0.11 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ in Tiefe 2). Die Aktivität und die Lage des Maximums der α -Glucosidasen wurden während der Durchmischung nicht verändert (Abb. 3.26a).

Nach Anfärbung des DGGE-Gels mit Ethidiumbromid zeigte das Bandenmuster am Ende der Durchmischungsperiode gegenüber der Stagnationsperiode eine deutliche Intensivierung. Im oxischen Bereich der Chemokline war dieser Effekt bei den Banden E und C besonders ausgeprägt. Im mikrooxischen Bereich trat jetzt auch die Bande G intensiver hervor.

Die Aktivitäten der Esterasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft nach der Durchmischungsperiode

Nach der Durchmischungsperiode waren die Aktivitäten der Esterasen in allen Tiefen erhöht (Abb. 3.26b). Besonders in den oxischen Tiefen 1 und 2 erreichte der Anstieg von $H_{max} = 0.1 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ auf $9 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, fast zwei Größenordnungen. Gleichzeitig war das Maximum der Esteraseaktivität vom sulfidischen Bereich in den mikrooxischen Bereich verschoben. Der Anstieg der Esterasen in den oxischen Tiefen 1 und 2 sowie der mikrooxischen Tiefe 3 wurde von einer intensiveren Färbung der Bandenmuster in diesen Bereichen begleitet.

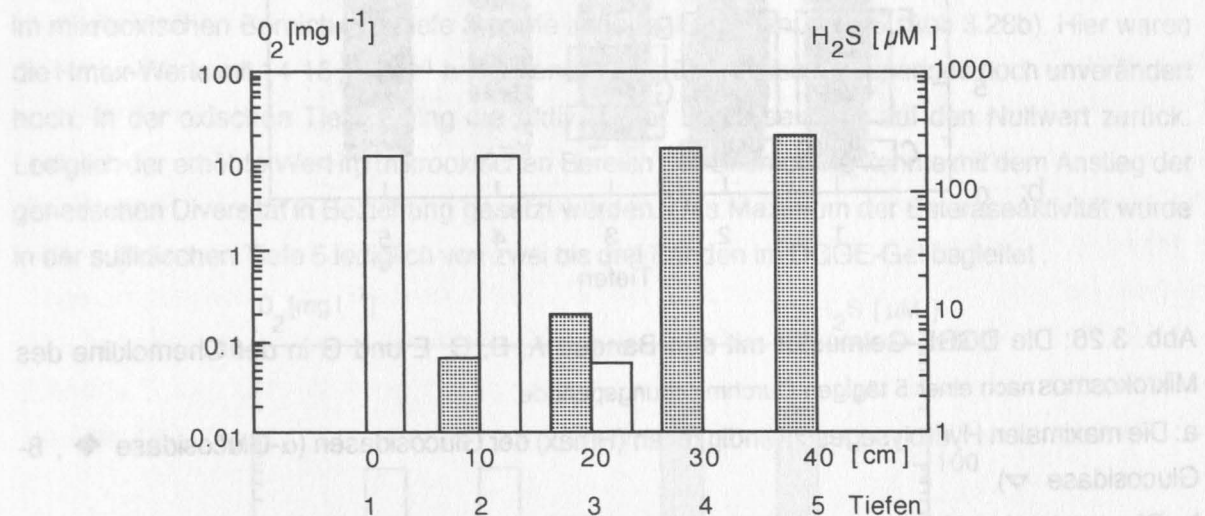




Abb. 3.25: Die Sauerstoff- () und Sulfidkonzentrationen () in der Chemokline des Mikrokosmos nach einer 5 tägigen Durchmischungsperiode.

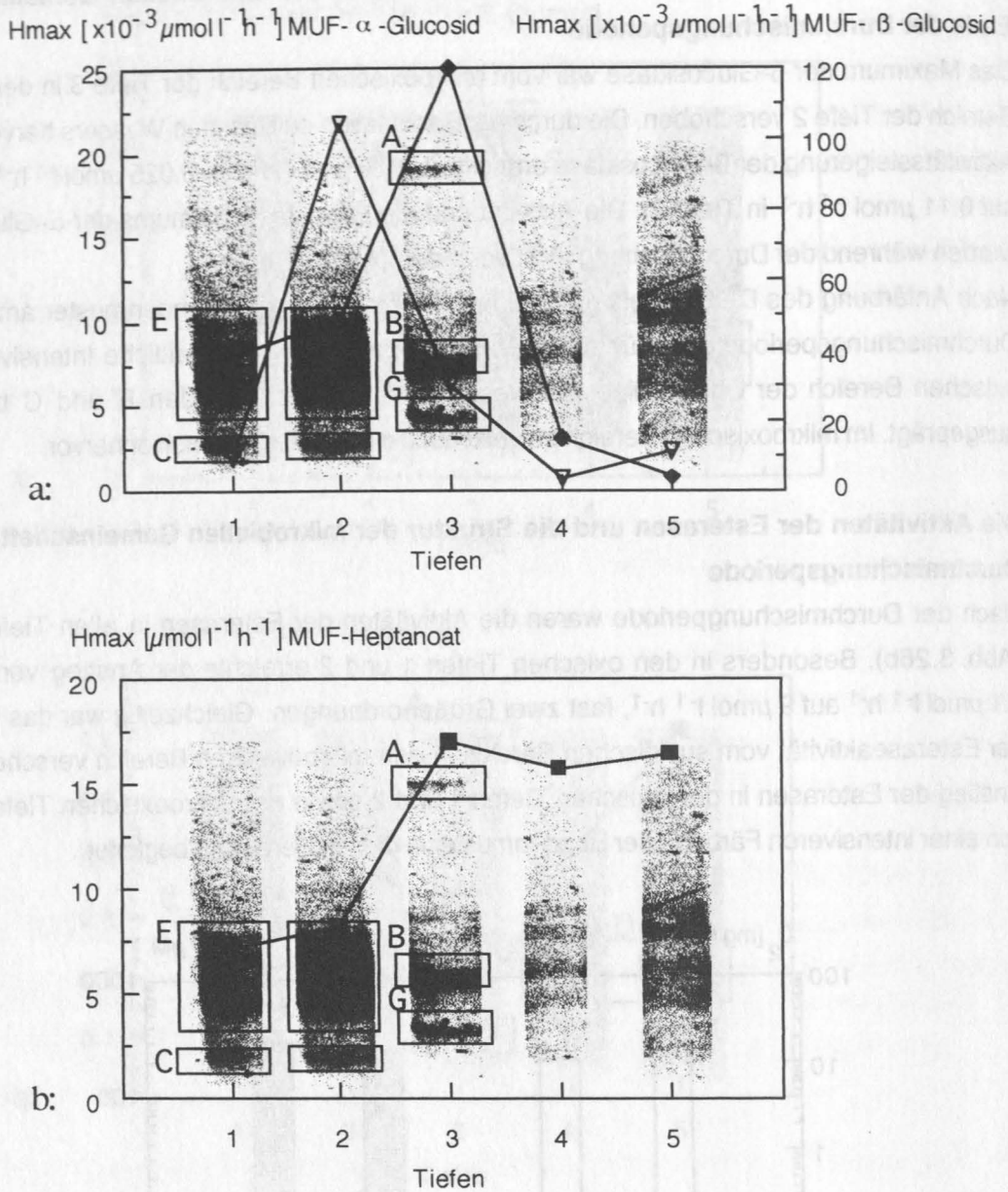


Abb. 3.26: Die DGGE-Gelmuster mit den Banden A, B, C, E und G in der Chemokline des Mikrokosmos nach einer 5 tägigen Durchmischungsperiode.

a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Glucosidasen (α -Glucosidase ◆, β -Glucosidase ▼)

b: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Esterasen ■ (Substrat: MUF-Heptanoat)

3.6.3 Die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Mikrokosmos am Ende einer Restabilisierungsperiode

Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen am Ende einer Restabilisierungsperiode

Die folgende, 26 Tage andauernde Restabilisierungsperiode führte in der mikrooxisch-sulfidischen Tiefe 3 wieder zur Ausbildung einer Trübungszone. 27 Tage nach Ende der Durchmischungsperiode war die Sauerstoffkonzentration in den oxischen Tiefen 1 - 2 von 10.8

mg $O_2\ l^{-1}$ auf 4.4 mg $O_2\ l^{-1}$ erniedrigt (Abb. 3.27). Im mikrooxisch-sulfidischen Bereich lagen Sauerstoff mit 0.34 mg $O_2\ l^{-1}$ und Sulfid mit 38 $\mu M\ H_2S$ in relativ hohen Konzentrationen nebeneinander vor. Die H_2S -Konzentration stieg im sulfidischen Bereich von 234 auf 308 μM an.

Die Aktivitäten der Glucosidasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft am Ende einer Restabilisierungsphase

Das Maximum der extrazellulären β -Glucosidasen war 27 Tage nach dem Ende der Durchmischung wieder in den mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich verschoben (Abb. 3.28a). Hier befand sich auch das Maximum der α -Glucosidasen. Der Hmax-Wert der β -Glucosidasen war mit 0.11 $\mu mol\ l^{-1}\ h^{-1}$ unverändert hoch.

Die mikrooxische Tiefe 3 zeichnete sich mit 7 Banden im DGGE-Gel gegenüber der Durchmischungsperiode mit 5 Banden durch einen Anstieg der genetischen Diversität aus. Auch die Intensität des Bandenmusters hob die mikrooxisch-sulfidische Grenzschicht deutlich von den übrigen Tiefenbereichen ab. Die Bande A war nur noch schwach ausgeprägt. Die Banden B und G waren zwar noch intensiv aber nicht mehr dominierend. Im oxischen (Tiefe 1) und im sulfidischen Bereich (Tiefe 5) waren nur noch wenige Banden erkennbar. Besonders im oxischen Bereich waren die Banden E wieder stark zurückgedrängt.

Die Aktivitäten der Esterasen und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft am Ende einer Restabilisierungsphase.

27 Tage nach dem Ende der Durchmischungsperiode zeigten die Esterasen ihre höchsten Werte im mikrooxischen Bereich der Tiefe 3 sowie in der sulfidischen Tiefe 5 (Abb. 3.28b). Hier waren die Hmax-Werte mit 14-16 $\mu mol\ l^{-1}\ h^{-1}$ gegenüber der Durchmischungsperiode noch unverändert hoch. In der oxischen Tiefe 2 ging die Aktivität der Esterasen fast auf den Nullwert zurück. Lediglich der erhöhte Wert im mikrooxischen Bereich der Chemokline konnte mit dem Anstieg der genetischen Diversität in Beziehung gesetzt werden. Das Maximum der Esteraseaktivität wurde in der sulfidischen Tiefe 5 lediglich von zwei bis drei Banden im DGGE-Gel begleitet.

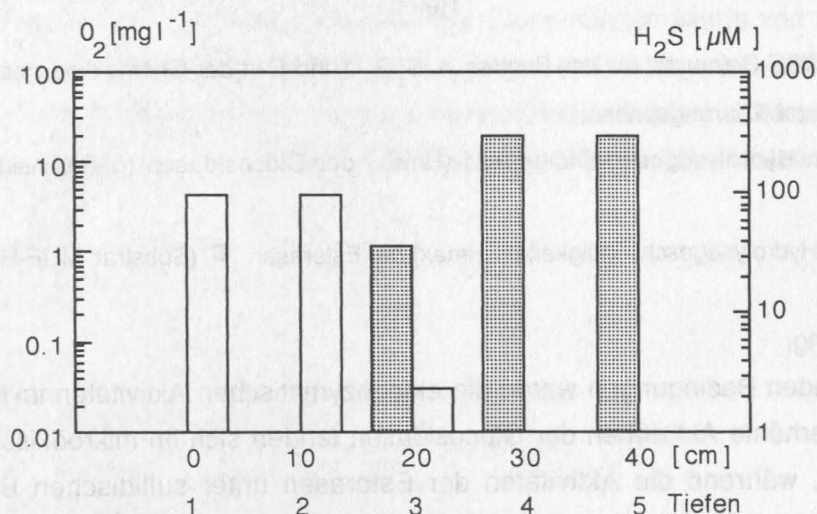




Abb. 3.27: Die Sauerstoff- () und Sulfidkonzentrationen () in der Chemokline des Mikrokosmos am Ende einer Restabilisierungsphase.

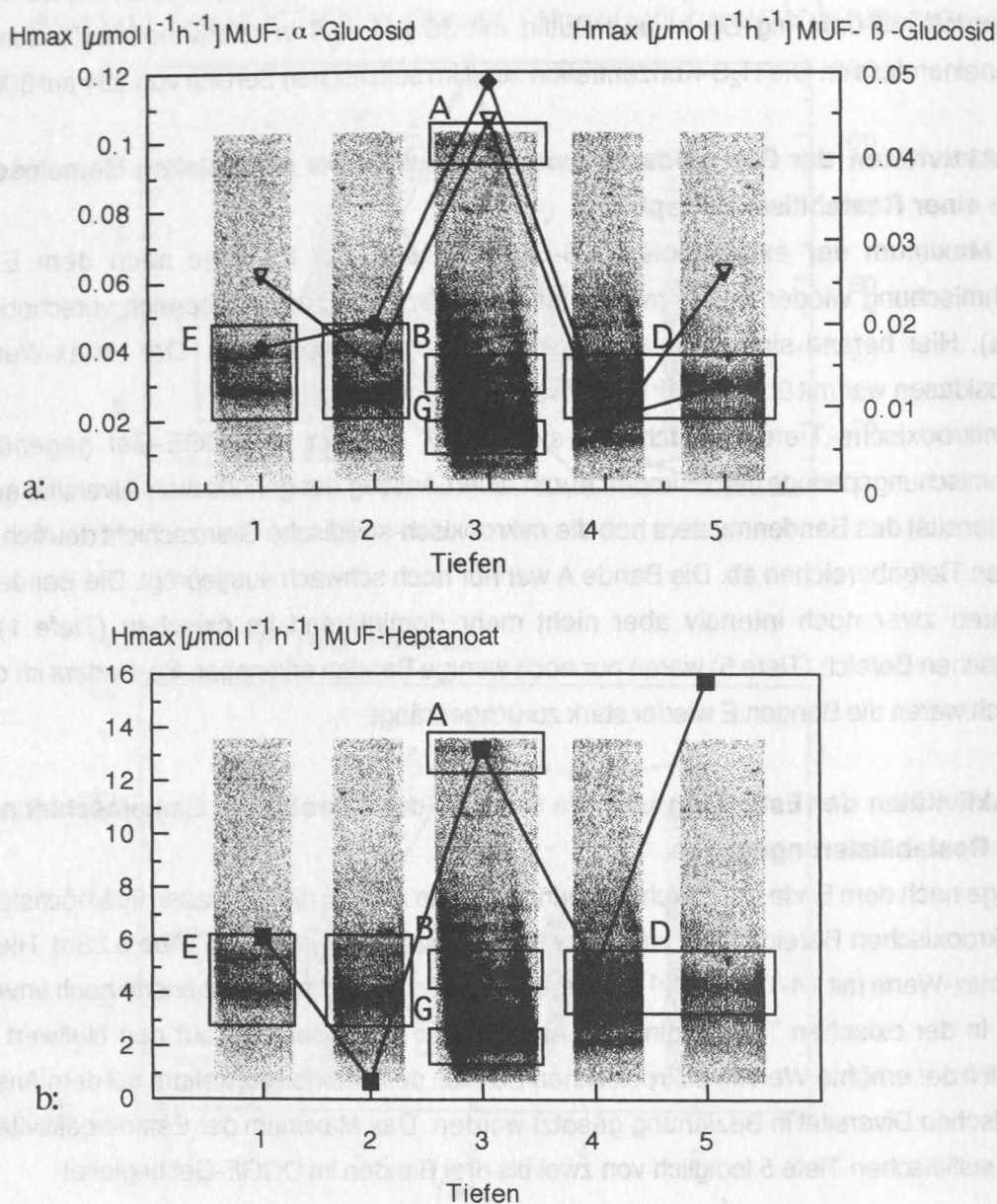


Abb. 3.28: Die DGGE-Gelmuster mit den Banden A, B, G, D und E in der Chemokline des Mikrokosmos am Ende einer Restabilisierungsphase.

a: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Glucosidasen (α -Glucosidase \blacklozenge , β -Glucosidase \blacktriangledown)

b: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der Esterasen \blacksquare (Substrat: MUF-Heptanoat)

Zusammenfassung:

Unter stagnierenden Bedingungen waren die ektoenzymatischen Aktivitäten im Mikrokosmos niedrig. Relativ erhöhte Aktivitäten der Glucosidasen fanden sich im mikrooxischen Bereich (Trübungszone), während die Aktivitäten der Esterasen unter sulfidischen Bedingungen anstiegen. Im mikrooxischen Bereich traten die Banden A und B dominierend hervor, während im oxischen Bereich die Banden E am deutlichsten zu erkennen waren. Im sulfidischen Bereich war die Bandengruppe D intensiver gefärbt.

Die Durchmischung führte zu einer Verschiebung der Aktivitätshorizonte in den oxischen Bereich

der Chemokline. Stark erhöhte Aktivitäten der β -Glucosidasen spiegelten sich in einer intensiveren Färbung der Banden C und E wider. Im mikrooxischen Bereich trat neben den Banden A und B auch eine Bande G dominierend hervor. Gleichzeitig war die Esteraseaktivität stark erhöht und ebenfalls in den oxischen Bereich verschoben.

Am Ende einer erneuten Stagnationsperiode waren die Banden C und E im oxischen Bereich wieder zurückgedrängt, bei gleichzeitig erniedrigter Esteraseaktivität. Die Aktivitäten der β -Glucosidasen waren wieder in den mikrooxischen Bereich verschoben. Außer den Banden A, B und G waren jetzt zusätzliche Banden zu erkennen. Der sulfidische Bereich zeichnete sich durch keine auffälligen Änderungen im Bandenmuster aus.

3.6.4 Der Einfluß von Eutrophierung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die genetische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos

Mit Zugabe eines Algenextraktes in die Chemokline erfolgte eine Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos von einem oligotrophen zu einem eutrophen Systemen. Im Folgenden werden die sukzessiven Veränderungen der genetischen Strukturen der mikrobiellen Gemeinschaften und deren ektoenzymatische Aktivitäten nach Zugabe eines Algenextraktes dargestellt. Die Veränderungen werden für die oxische Tiefe 2, die mikrooxische Tiefe 3, sowie die sulfidische Tiefe 4 exemplarisch über den 6wöchigen Untersuchungszeitraum dargestellt.

Die Glucosidasen und die Veränderung der genetischen Struktur im oxischen Bereich der Chemokline nach Zugabe eines Algenextraktes

Im oxischen Bereich stieg H_{max} der α -Glucosidase 17 Stunden nach Zugabe des Algenextraktes von 0.02 auf $0.05 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ und erreichte 2 Tage später (Tag 35) ein Maximum mit $0.08 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Abb. 3.29). Danach ging die Aktivität wieder kontinuierlich bis Tag 47 auf $0.035 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ zurück. Die β -Glucosidase reagierte nicht sofort auf den Puls organischen Materials. Sie erreichte erst am Tag 42 ihr Maximum (von 0.05 auf $0.42 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$) und sank 5 Tage später wieder ab. Die heftige Reaktion der Glucosidasen wurde von einer drastischen Umstellung der bakteriellen Gemeinschaft in der oxischen Tiefe 2 begleitet. Während die kräftigen Banden E, die sich während der Durchmischungsperiode etabliert hatten, bis Tag 47 stark zurückgingen, tauchte mit dem Anstieg der Glucosidasen (Tag 33-35) eine neue Bande F auf.

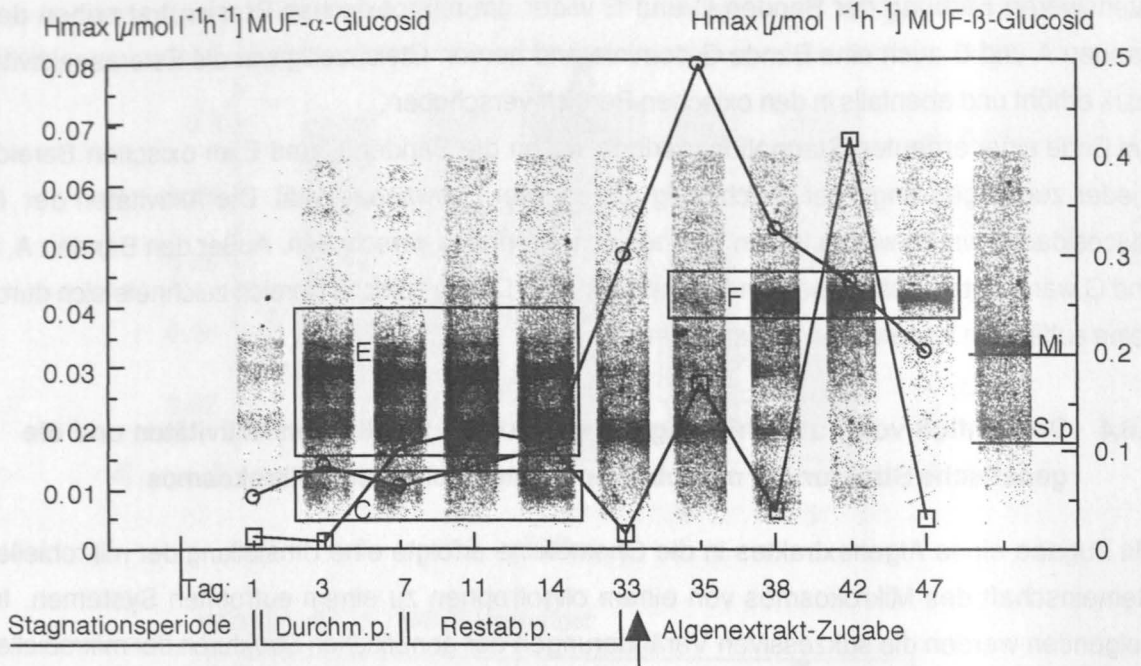
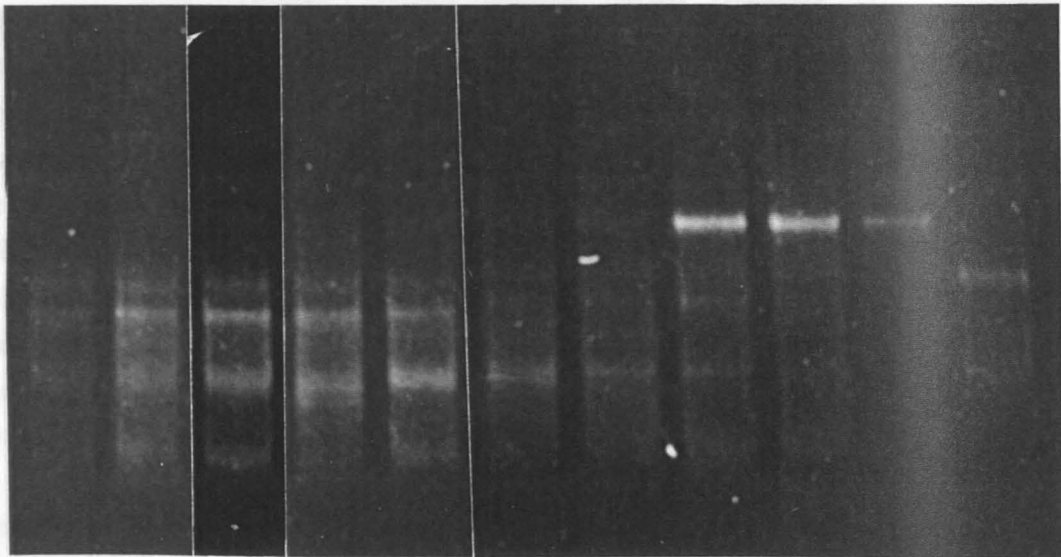


Abb. 3.29: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{\max}) der α - (O) und β - (\square) Glucosidasen während der 6 wöchigen Untersuchungsphase im **oxischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster (Foto 4) mit den Banden E, C, F; am Ende der Stagnationsperiode (Stagn. p., Tag 1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1 - 7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7 - 33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33 - 47).



Tag: 1 3 7 11 14 33 35 38 42 47
 Stagn. p. | Durchm. p. | Restab. p. | \blacktriangle Algenextrakt-Zugabe

Foto 4: DGGE-Analysen während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **oxischen Bereich des Mikrokosmos**

Die Glucosidasen und die Veränderung der genetischen Struktur im mikrooxischen Bereich der Chemokline nach Zugabe eines Algenextraktes

Die Aktivitäten der Glucosidasen zeigten nach der Substratzugabe (ab Tag 33) Schwankungen, die 5 Tage später in einem Maximum (Tag 38) mündeten (α -Glucosidasen von 0.01 auf $0.17 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$, β -Glucosidasen von 0.025 auf $0.29 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$, Abb. 3.30). 5 Tage nach Zugabe des organischen Materials konnte auch anhand des DGGE-Musters eine Veränderung in der Anzahl der Banden festgestellt werden. Sie erhöhte sich von ursprünglich 3 auf 7 Banden (Tag 38). Dieses Muster unterschied sich deutlich von dem oxischen und sulfidischen Bereich am Tag 38. Die Bande G, die sich während der Durchmischungsperiode (ab Tag 11) etablieren konnte löste auch nach Zugabe des Algenextraktes nicht auf. Sie blieb bis Tag 38 dominierend. Im mikrooxischen Bereich lag für die Tage 42 und 47 keine amplifizierte DNA vor.

Abb. 3.30 Die maximalen Hydrolyseaktivitäten (max) der α - (□) und β - (○) Glucosidasen während der 8 wöchigen Untersuchungsphase im mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster (Foto 2) mit den Banden A und G am Ende der Stagnationsperiode (Stagn. p., Tag 1), während der Durchmischungsperiode (Durchm. p., Tag 1-7), der Restabklärungsphase (Restab. p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).

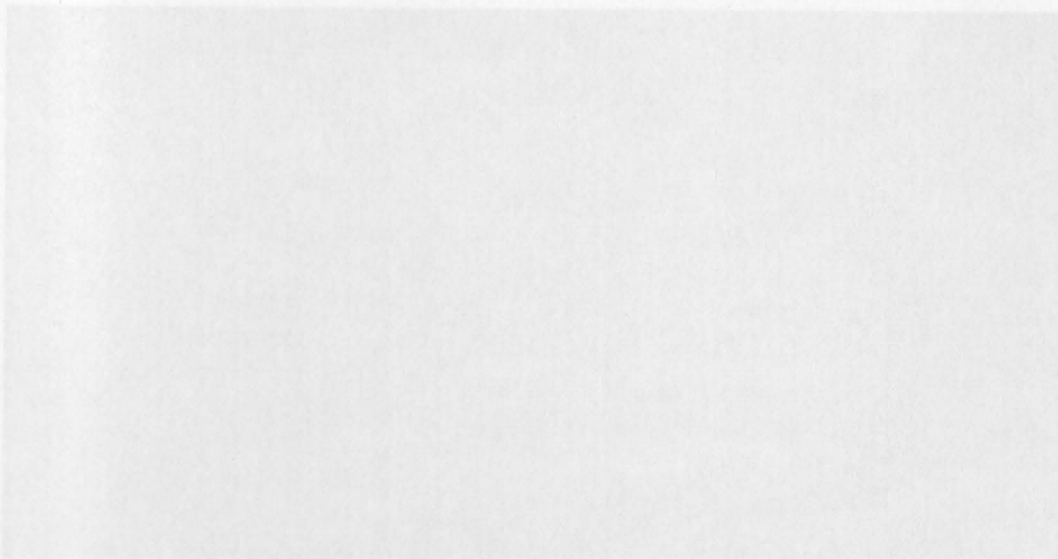


Foto 2: DGGE-Analyse während der 8wöchigen Untersuchungsphase im mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos.

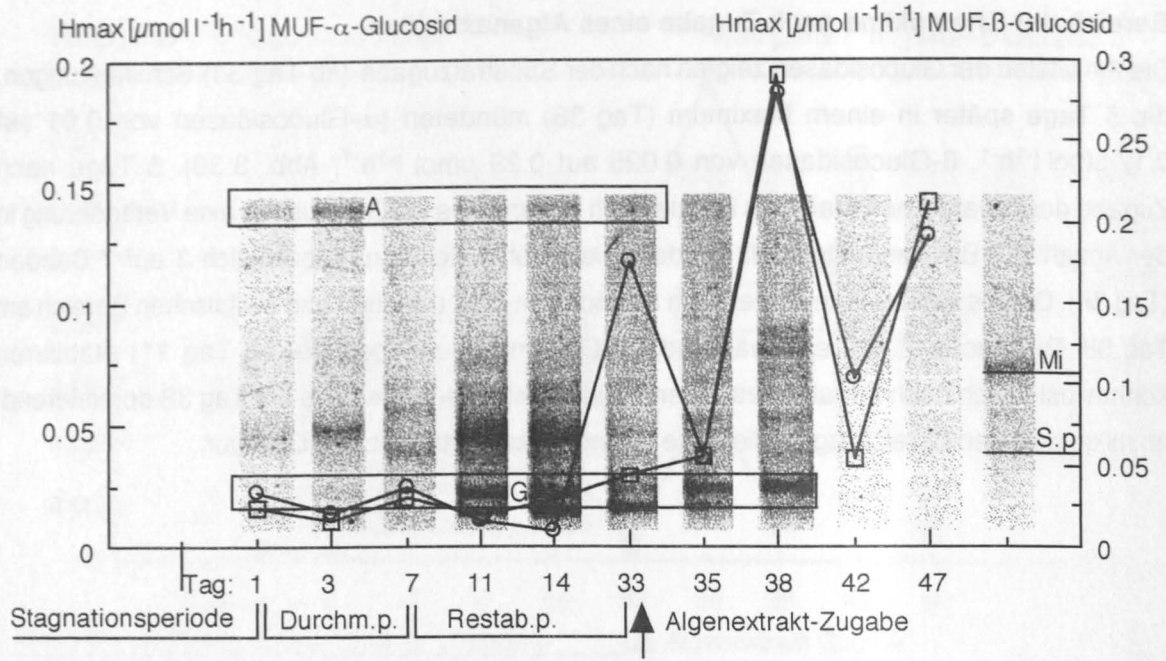
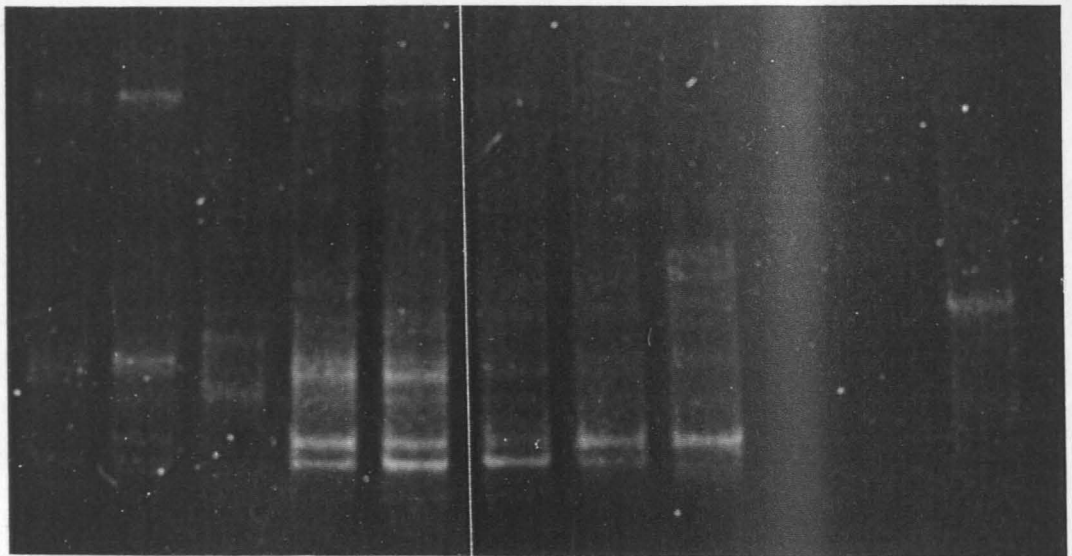


Abb. 3.30: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{\max}) der α - (\circ) und β - (\square) Glucosidasen während der 6 wöchigen Untersuchungsphase im **mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster (Foto 5) mit den Banden A und G, am Ende der Stagnationsperiode (Stagn. p., Tag 1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1-7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).

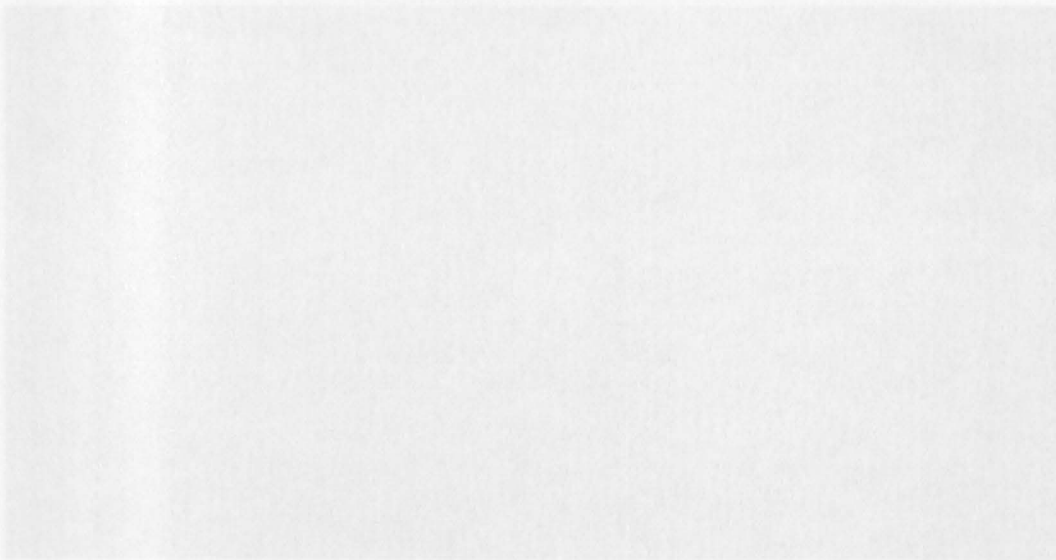


Tag: 1 3 7 11 14 33 35 38 42 47
 Stagn. p. | Durchm. p. | Restab. p. | \blacktriangle Algenextrakt-Zugabe

Foto 5: DGGE-Analysen während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos**

Die Glucosidasen und die Veränderung der genetischen Struktur im sulfidischen Bereich der Chemokline nach Zugabe eines Algenextraktes.

Die Glucosidasen reagierten auf den plötzlichen Puls organischen Materials mit einem starken Anstieg ihrer Aktivitäten. Während die α -Glucosidasen ihren höchsten Hmax-Wert (von 0.02 auf $0.055 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$) 5 Tage nach der Zugabe des Algenextraktes (Tag 38) erreichten, gipfelten die β -Glucosidasen bereits 2 Tage nach der Substratzugabe (Tag 35) ebenfalls mit $0.055 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Abb. 3.31). Bis zum Ende des Experimentes folgte ein Rückgang der Glucosidasen auf $0.03 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Die Zugabe von organischem Material führte auch in der sulfidischen Zone zu einer Intensivierung des Bandenmusters im DGGE-Gel. Auch hier war deutlich die Etablierung einer neuen Bande F ab dem 5. Tag nach Zugabe des Algenmaterials zu beobachten. Ihr Auftreten fiel mit dem Maximum der α -Glucosidase (Anstieg von Hmax = 0.016 auf $0.055 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$) zusammen. Im sulfidischen Bereich waren bis auf die neue Bande F während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine auffälligen Verschiebungen im Bandenmuster zu beobachten. Es traten lediglich Intensivierungen der Bandenfärbungen nach der Durchmischungsperiode und nach der Zugabe des Algenmaterials auf.



Tag 38 35 32 29 26 23 20 17 14 11 8 5 2 0
Algenextrakt-Zugabe
Foto 8: DGGE-Analyse während des zweiten Untersuchungszyklus im sulfidischen Bereich des Mikrokosmos

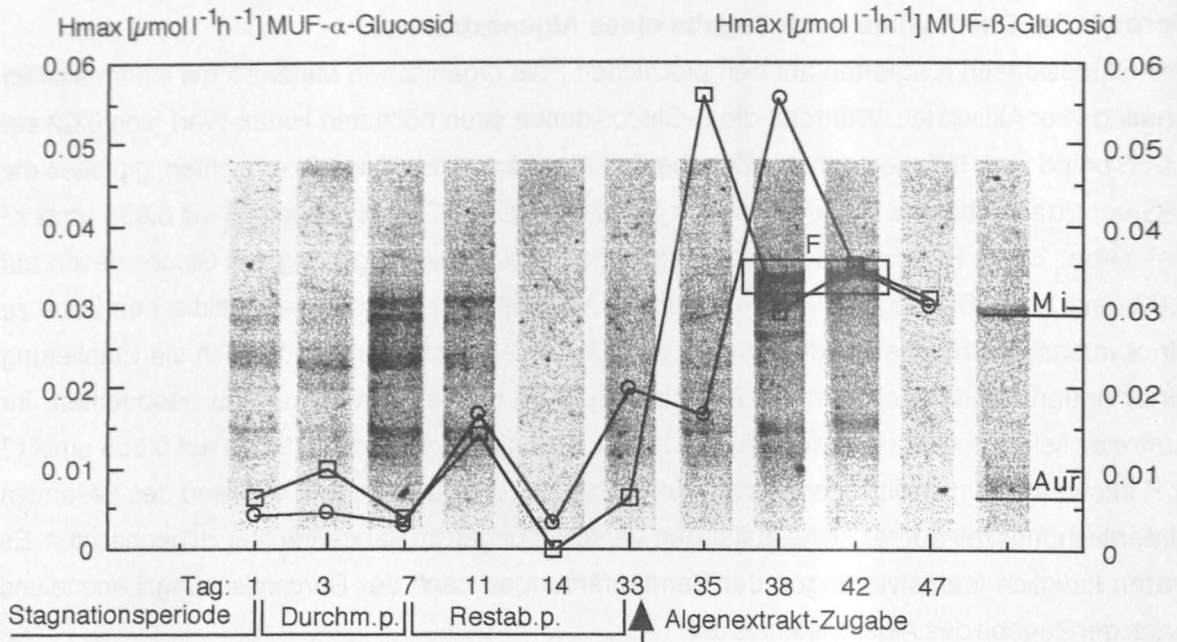
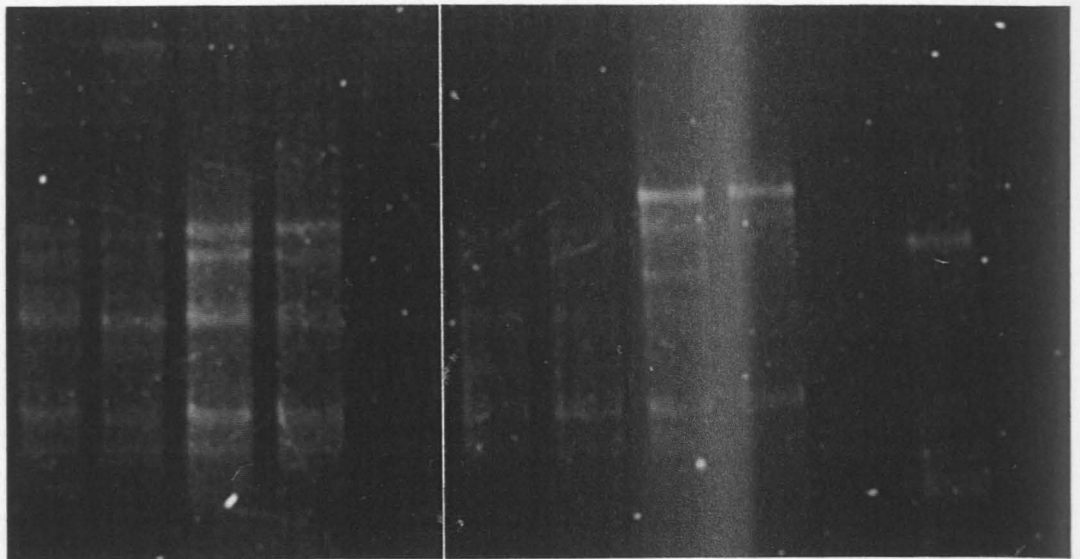


Abb. 3.31: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der α - (○) und β - (□) Glucosidasen während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **sulfidischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster (Foto 6) mit der Bande F, am Ende der Stagnationsperiode (Stagn. p., Tag1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1-7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).



Tag: 1 3 7 11 14 33 35 38 42 47
 Stagn. p. | Durchm. p. | Restab. p. | ▲ Algenextrakt-Zugabe

Foto 6: DGGE-Analysen während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **sulfidischen Bereich des Mikrokosmos**

3.6.5 *Shewanella putrefaciens* und die ektoenzymatischen Aktivitäten in der Chemokline des Mikrokosmos

Die Umstrukturierung der mikrobiellen Gemeinschaft aufgrund der Eutrophierung durch den Algenextrakt wurde von einer Anreicherung copiotropher Bakterien begleitet.

Auf TCBS-Agar wurde ein Organismus selektiv angereichert, der aufgrund seines Membranfettsäure-Musters und nach einer Charakterisierung mit den API-Systemen 20E und 20NE als *Shewanella putrefaciens* angesprochen wurde. Aufgrund übereinstimmender Koloniemorphologien und der hohen Selektivität des Agars wurde eine selektive Anreicherung von *Shewanella p.* angenommen. Es wird deshalb im Folgenden von *Shewanella*-Keimzahlen gesprochen.

***Shewanella*-Keimzahlen und die Aktivität der Esterasen im oxischen Bereich der Chemokline**

Die Aktivitäten der Esterasen waren während der Durchmischungsperiode stark erhöht. Diese Erhöhung koinzidierte mit dem Auftreten der Banden E bis zum Tag 33. Die Esterasen blieben durch die Zugabe des Algenextraktes unbeeinflusst, während die Banden E nach der Zugabe des Algenextraktes schwächer wurden (Abb. 3.32).

Erst 5 Tage (Tag 38) nach Zugabe des Algenextraktes in den Mikrokosmos wurde im oxischen Bereich der Chemokline ein schwacher Anstieg der *Shewanella*-Keimzahlen von 0 auf 20 cfu ml⁻¹ beobachtet. Zusammen mit dem leichten Anstieg der Keimzahlen tauchte im DGGE-Gel die Bande F auf. Bei der Bande F handelte es sich nicht um *Shewanella p.*, da ihre Lage im Gel nicht mit der des *Shewanella p.*-Standards (Abb.3.32, S.p. = *Shewanella p.*) übereinstimmte. Im oberen Bereich des Gels lief das DNA-Fragment von *Micrococcus sp.* als Standard im Gel mit (Abb. 3.32, Mi = *Micrococcus sp.*). Auch diese Bande ließ keine Parallelen in den Gelen vom Tag 33 bis Tag 47 erkennen.



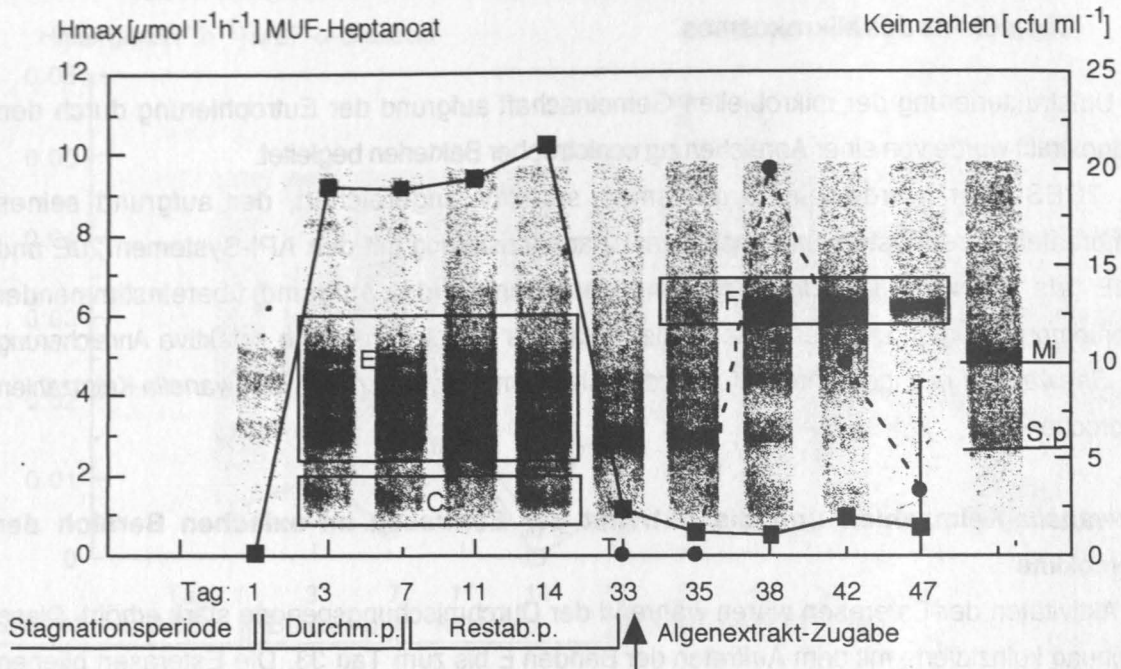


Abb. 3.32: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{\max} , ■) der Esterasen (Substrat: MUF-Heptanoat) sowie die Keimzahlen von *Shewanella putrefaciens* (●) während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **oxischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden E, C, F; am Ende der Stagnationsperiode (Tag 1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1-7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).

***Shewanella*-Keimzahlen die Aktivitäten der Esterasen im mikrooxischen Bereich der Chemokline**

Im mikrooxischen Bereich der Tiefe 3 zeigten die Esterasen mit Beginn der Durchmischung einen kontinuierlichen Anstieg (Abb. 3.33). Das Maximum der Esterasen fiel mit $H_{\max} = 64 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$, 5 Tage nach der Substratzugabe, mit den höchsten *Shewanella*-Keimzahlen (2200 cfu ml^{-1}) zusammen. Danach gingen die Keimzahlen von *Shewanella p.*, auf 500 cfu ml^{-1} und die Aktivitäten der Esterasen auf $40 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ zurück. Die während der stagnierenden Phase im oberen Bereich des Gels vorhandene Bande A verblaßte nach der Substratzugabe vollständig. Die als Standards in die DGGE eingesetzten Organismen *Micrococcus* und *Shewanella p.* (Abb. 3.33, Mi = *Micrococcus*, S.p. = *Shewanella p.*) zeigten keine deutlichen Parallelitäten mit anderen Banden in der DGGE.

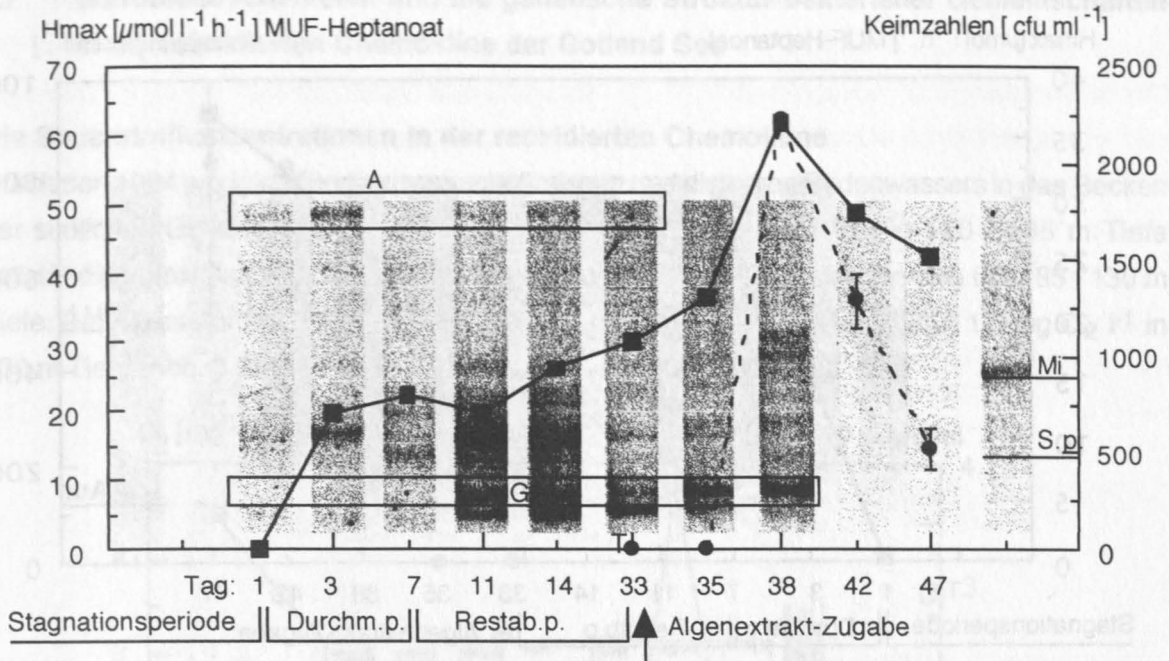


Abb. 3.33: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max} , ■) der Esterasen (Substrat: MUF-Heptanoat) sowie die Keimzahlen von *Shewanella putrefaciens* (●) während der 6wöchigen Untersuchungsphase im **mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden A und G, am Ende der Stagnationsperiode (Tag1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1-7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).

***Shewanella*-Keimzahlen und die Aktivitäten der Esterasen im sulfidischen Bereich der Chemokline**

Die H_{max} -Werte der Esterasen führten nach der Substratzugabe keine Schwankungen aus, sondern sie stiegen kontinuierlich von $<0.1 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ am Tag 1 des Experimentes, bis auf $37 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ am Tag 47 an (Abb. 3.34). Auch im sulfidischen Bereich war nach Zugabe des Algenextraktes ein Anstieg der *Shewanella*-Keimzahlen von $<0.1 \text{cfu ml}^{-1}$ am Tag 35, auf 600cfu ml^{-1} am Tag 38 zu verzeichnen. Das Maximum der Keimzahlen wurde erst am letzten Versuchstag mit 800cfu ml^{-1} erreicht. Die Anreicherung von *Shewanella p.* ging mit dem Auftreten der neuen Bande F einher. Allerdings konnte es sich auch bei dieser Bande F nicht um *Shewanella p.* handeln. Mit *Aureobacter* wurde ein weiterer grampositiver Organismus als Standard eingeführt, der eindeutig keinen weiteren parallelen Banden zugeordnet werden konnte (Abb. 3.34, Au = *Aureobacter*).



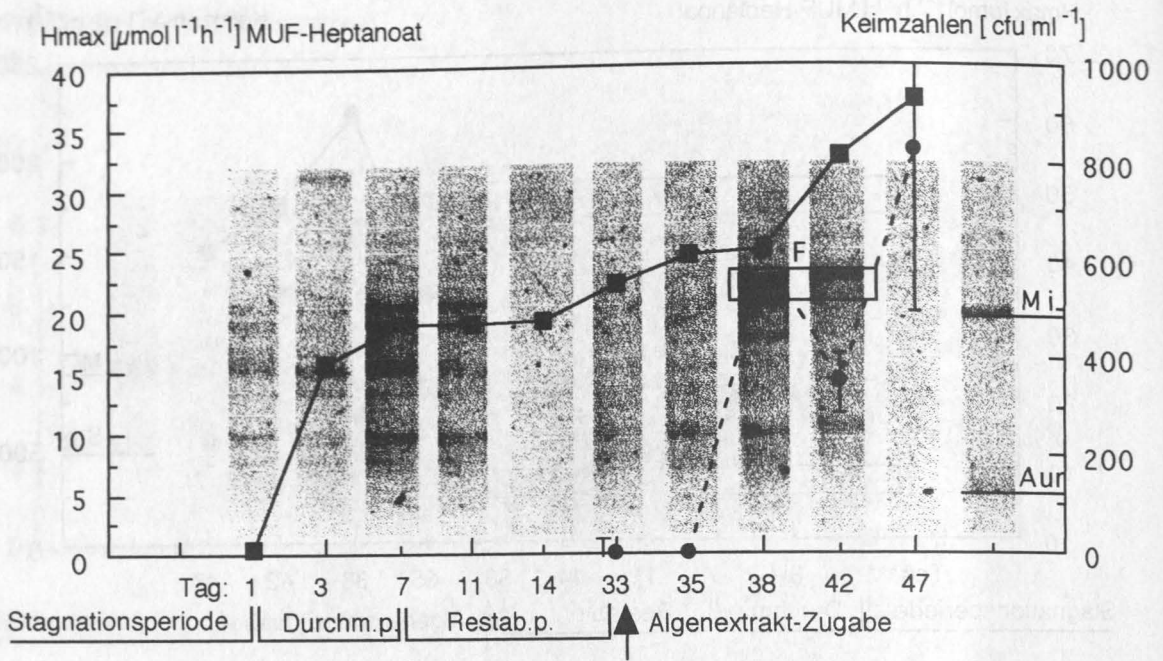


Abb. 3.34: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{\max} , ■) der Esterasen (Substrat: MUF-Heptanoat), sowie die Keimzahlen von *Shewanella putrefaciens* (●) während der 6 wöchigen Untersuchungsphase im **sulfidischen Bereich des Mikrokosmos**. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit der Bande F, am Ende der Stagnationsperiode (Tag 1), während der Durchmischungsperiode (Durchm.p., Tag 1-7), der Restabilisierungsphase (Restab.p., Tag 7-33) sowie während und nach der Zugabe eines Algenextraktes (Tag 33-47).

Zusammenfassung:

Die Zugabe eines Algenextraktes in den Mikrokosmos führte im oxischen, mikrooxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline zu einem sprunghaften Anstieg der extrazellulären Glucosidasen. Zwei bis fünf Tage nach der Zugabe des allochthonen Materials war eine Veränderung des Bandenmusters im DGGE-Gel in allen drei Tiefen zu beobachten. Im oxischen Bereich wurden die Banden E und C von der dominierenden Bande F abgelöst. Im mikrooxischen Bereich verblaßte langsam die Bande A. Nur die Bande G blieb deutlich erhalten. Auch im sulfidischen Bereich war nach der Zugabe des Algenextraktes die neue Bande F zu erkennen. Die Aktivität der Esterasen wurde durch die Zugabe des Algenextraktes im oxischen Bereich kaum beeinflusst, während sie im mikrooxischen und sulfidischen Bereich zunächst weiter anstieg. Im mikrooxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline koinzidierten die Keimzahlen (*Shewanella putrefaciens*) mit der Aktivität der Esterasen. Im DGGE-Gel stimmten die Banden von *Shewanella putrefaciens* (S.p.) aber nicht mit der gleichzeitig auftretenden Bande F überein. Auch die übrigen Banden der Standards von *Micrococcus* (Mi) und *Aureobacter* (Au) stimmten nicht mit der Bande F überein.



3.7 Mikrobielle Aktivitäten und die genetische Struktur bakterieller Gemeinschaften in der reoxidierten Chemokline der Gotland See

Die Sauerstoffkonzentrationen in der reoxidierten Chemokline

Durch den 1994 erfolgten Einstrom sauerstoffreichen und dichteren Bodenwassers in das Becken der südlichen Gotland See war der Bereich der Chemokline von 1993 in 120 - 135 m Tiefe vollständig aufoxidiert. Der noch vorhandene Sauerstoffgradient erstreckte sich über 85 - 130 m Tiefe. Die Sauerstoffkonzentration sank von 4.5 mg O₂ l⁻¹ in 85 m auf minimal 1.5 mg O₂ l⁻¹ in 130 m Tiefe (Abb. 3.35).

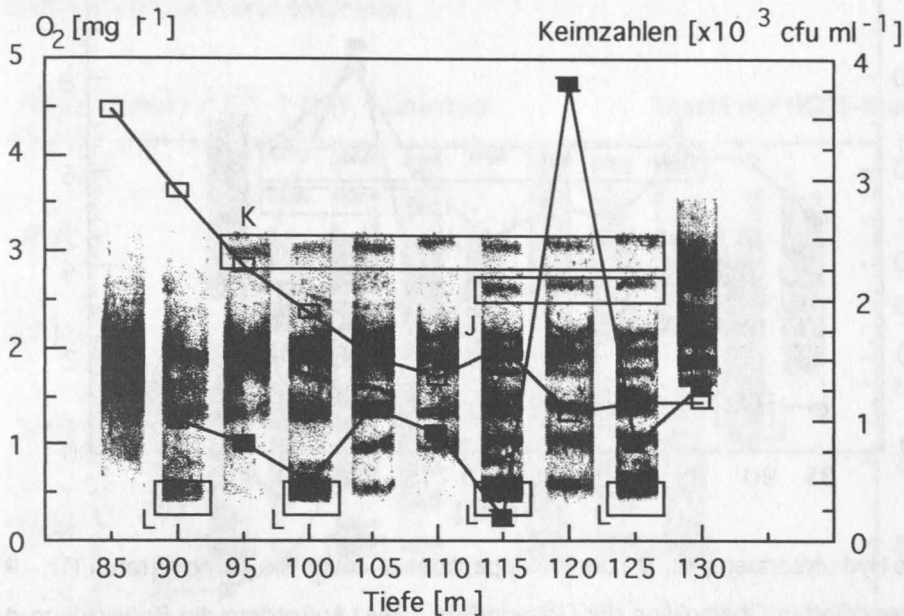


Abb. 3.35: Die Sauerstoffkonzentrationen (□) sowie die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten (■) in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden J, K und L.

Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten und die genetische Struktur in der reoxidierten Chemokline

Obwohl eine oxisch-sulfidische Übergangszone nicht mehr nachweisbar war, konnte eine für Chemoklinen charakteristische Erhöhung der Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten im sauerstoffreduzierten Bereich von 120 m Tiefe registriert werden (Abb. 3.35). Die Keimzahlen stiegen von 200 cfu ml⁻¹ in 115 m, auf 3800 cfu ml⁻¹ in 120 m Tiefe an. Die Anzahl der Banden im DGGE-Gel stieg von 1 - 2, in 85 m Tiefe, auf 10 Banden in 115 - 125 m Tiefe an. In 130 m Tiefe waren noch 6 Banden zu erkennen, die keine Parallelitäten mit Banden in anderen Tiefenhorizonten aufwiesen.

Hydrolyse- und Turnoverraten sowie die genetische Struktur in der reoxidierten Chemokline

Die Hydrolyseraten der Aminopeptidasen und die Turnoverraten von H³-Leucin zeigten im Tiefenprofil einen Verlauf, der in 120 m Tiefe in einem gemeinsamen Maximum gipfelte (Hr = 210 %d⁻¹, Tr = 9 %d⁻¹). Der Bereich der erhöhten Hydrolyseraten (60-210 %d⁻¹) erstreckte sich

über den Tiefenhorizont von 115 - 125 m (Abb. 3.36).

Einen vergleichbaren Verlauf zeigten die Hydrolyseraten der α -Glucosidasen und die Turnoverraten von C^{14} -Glucose (Abb. 3.37). Das absolute Maximum beider Variablen befand sich in 120 m Tiefe ($Hr = 27 \%d^{-1}$, $Tr = 1.7 \%d^{-1}$). Auch hier erstreckte sich der Bereich der erhöhten Raten über den Bereich von 115 - 125 m Tiefe. Das DGGE-Muster zeichnete sich in diesem Tiefenbereich mit maximal 10 Banden durch eine erhöhte Komplexität aus. Zusätzlich war eine Bande J zu erkennen die nur in diesem Bereich vertreten war.

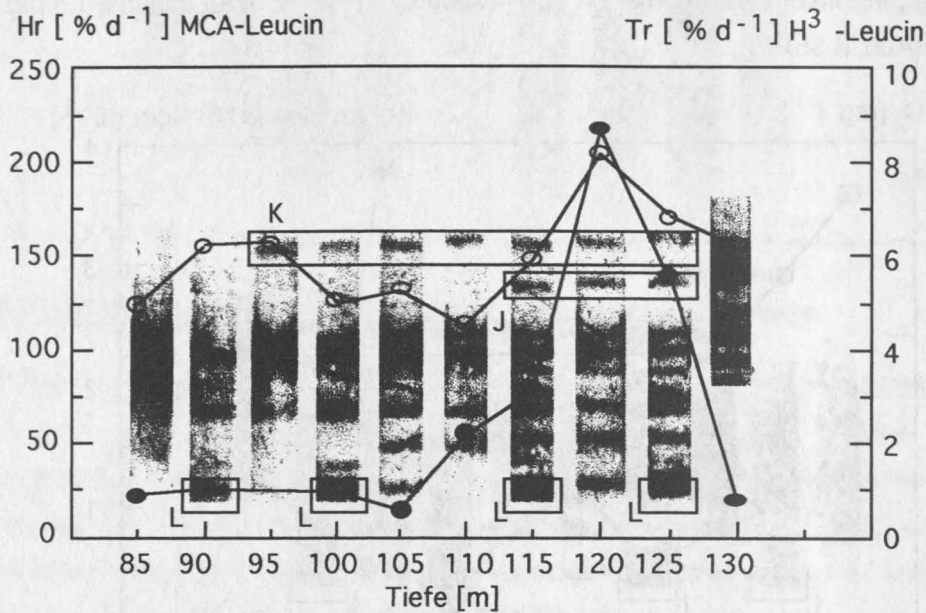


Abb. 3.36: Die Hydrolyseraten (Hr , ○) der Aminopeptidasen sowie die Turnoverraten (Tr , ●) von H^3 -Leucin in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden J, K und L.

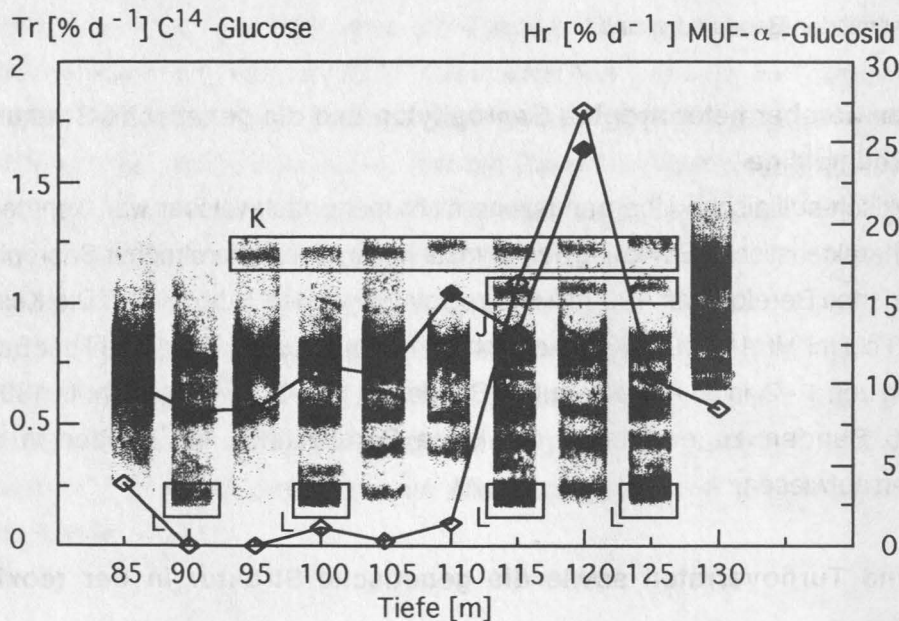


Abb. 3.37: Die Hydrolyseraten (Hr , ◇) der α -Glucosidasen sowie die Turnoverraten (Tr , ◆) von C^{14} -Glucose in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden J, K und L.

Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der β -Glucosidasen und die Bande K in der reoxidierten Chemokline

Die Oxidation von sulfidischem Wasser führte im Mikrokosmos zu einer Steigerung der mikrobiellen Aktivitäten. In der Chemokline der Gotland See 1994 bewirkte die Reoxidation einen Anstieg der β -Glucosidaseaktivität um eine Größenordnung. Die H_{max} -Werte stiegen von $0.001 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ in 85 m Tiefe bis über $0.024 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ in 115 m Tiefe an (Abb. 3.38). Ab 95 m Tiefe trat im DGGE-Muster eine Bande K auf, die bis in 125 m Tiefe und steigender Aktivität der β -Glucosidase präsent blieb. Die mit der Tiefe ansteigende Aktivität der β -Glucosidasen koinzidierte außerdem deutlich mit der Anzahl der Banden im DGGE-Gel, die im Bereich zwischen 115 - 125 m ihre höchsten Werte erreichten.

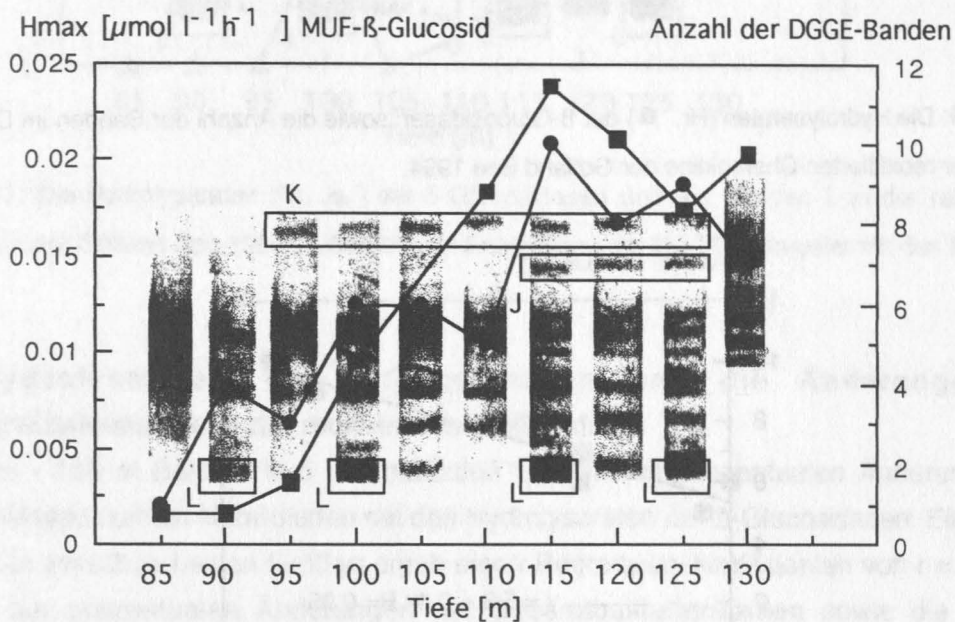


Abb. 3.38: Die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max} , ■) der β -Glucosidasen sowie die Anzahl der Banden im DGGE-Gel (●) in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden J, K und L..

Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und die Anzahl der Banden im DGGE-Gel

Noch offensichtlicher wurde die Beziehung zwischen den Aktivitätserhöhungen und der genetischen Struktur bei einem Vergleich der Hydrolyseraten der β -Glucosidasen mit den Veränderungen im DGGE-Gel. Die Hydrolyseraten (H_r) korrespondierten im Tiefenprofil (85 - 130m) deutlich mit der Anzahl der Banden im DGGE-Gel (Abb.3.39). Die lineare Regression von H_r und der Anzahl der Banden ergab eine Regressionskoeffizienten von $r = 0.95$. H_r -Werte welche unterhalb der methodischen Auflösung lagen ($H_r < 0.1 \text{ \%d}^{-1}$) gingen nicht mit in die Regression ein (Abb.3.40).

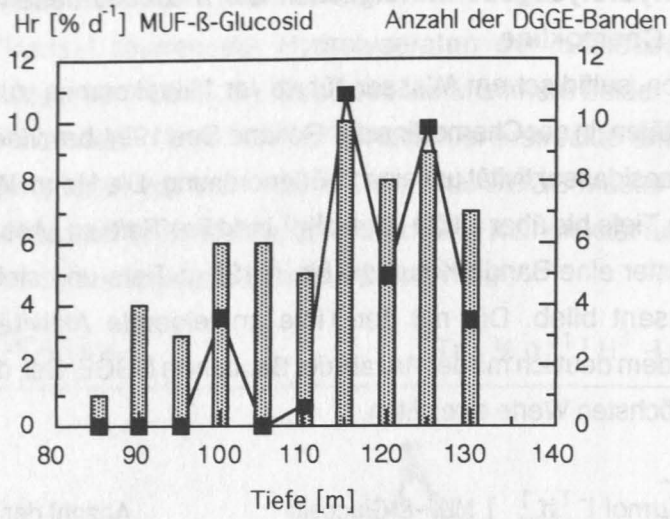


Abb. 3.39: Die Hydrolyseraten (Hr, ■) der β -Glucosidasen sowie die Anzahl der Banden im DGGE-Gel (□) in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994.

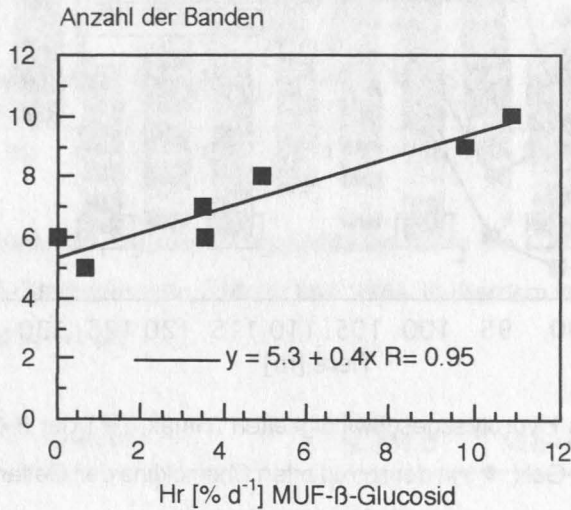


Abb. 3.40: Die lineare Regression zwischen den Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und der Anzahl der Banden im DGGE-Gel.

Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und die Banden L in der reoxidierten Chemokline

Die Maxima der Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidasen wurden mit charakteristischen Veränderungen im DGGE-Gel in Beziehung gesetzt. So zeichneten sich die Hydrolyseraten durch drei Peaks aus, die in 100 m, 115 m und 125 m lagen (Abb. 3.41). Im DGGE-Gel war eine Doppelbande erkennbar (Banden L), die ausschließlich mit den Höchstwerten der Hydrolyseraten zusammenfiel. In 90 m Tiefe war keine Hydrolyserate mehr nachweisbar.

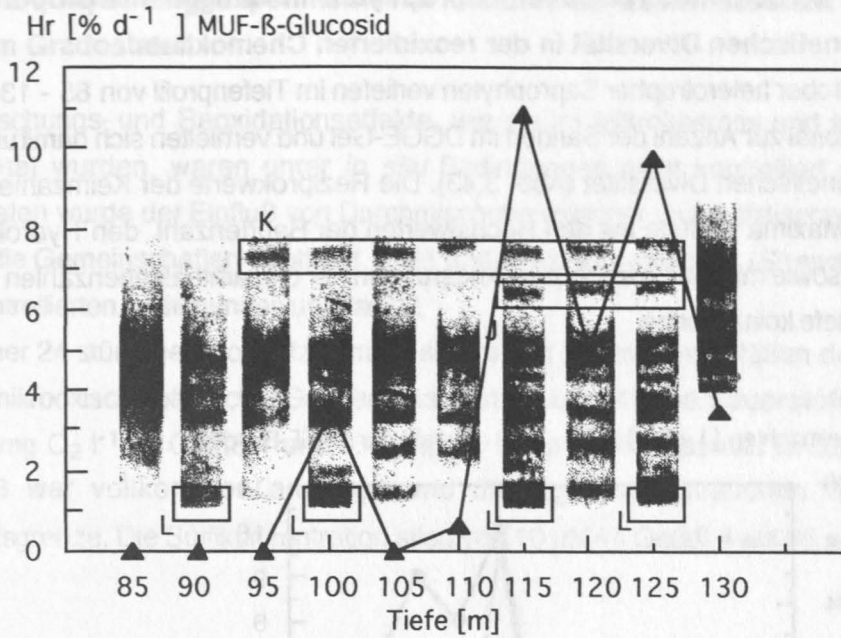


Abb. 3.41: Die Hydrolyseraten (Hr, ▲) der β -Glucosidasen und die Banden L in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994. Außerdem die Entwicklung der DGGE-Gelmuster mit den Banden K, J und L.

Die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und die Änderungen der Gesamtbakterienzahlen in der reoxidierten Chemokline

Die im 85 - 130 m Bereich in 5 m Abständen bestimmten prozentualen Änderungen der Gesamtbakterienzahlen koinzidierten mit den Hydrolyseraten der β -Glucosidasen. Eine lineare Regression zwischen beiden Größen ergab einen Regressionskoeffizienten von $r = 0.8$. Die Maxima der prozentualen Änderungen der Gesamtbakterienzahlen sowie die Maxima Hydrolyseraten der β -Glucosidasen befanden sich in 100, 115 und 125 m Tiefe (Abb. 3.42).

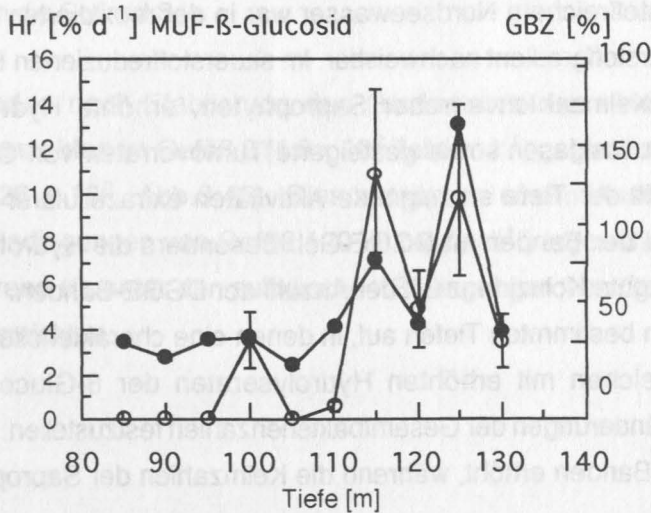


Abb. 3.42: Die Hydrolyseraten (Hr, ○) der β -Glucosidasen sowie die Änderungen der Gesamtbakterienzahlen pro Tiefe (GBZ, ●) in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994.

Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten im umgekehrt proportionalen Verhältnis zur genetischen Diversität in der reoxidierten Chemokline

Die Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten verliefen im Tiefenprofil von 85 - 130m Tiefe umgekehrt proportional zur Anzahl der Banden im DGGE-Gel und verhielten sich damit umgekehrt proportional zur genetischen Diversität (Abb. 3.43). Die Reziprokwerte der Keimzahlen ($1 / \text{cfu ml}^{-1}$) zeigten drei Maxima welche mit den Höchstwerten der Bandenzahl, den Hydrolyseraten der β -Glucosidase sowie mit den prozentualen Änderungen der Gesamtbakterienzahlen in 100 m, 115 m und 125 m Tiefe koinzidierten.

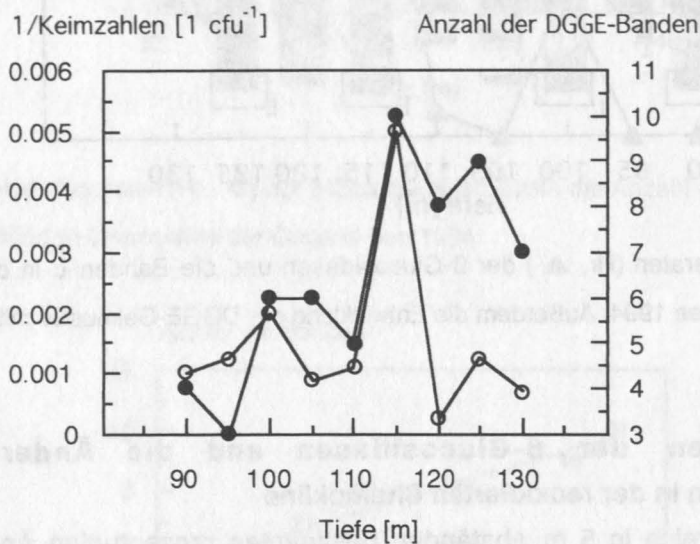


Abb. 3.43: Anzahl der Banden im DGGE-Gel (●) sowie die Reziprokwerte (cfu ml^{-1}) der Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten (○) in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994.

Zusammenfassung:

Trotz Einstrom von sauerstoffreichem Nordseewasser war in der reoxidierten Chemokline der Gotland See 1994 ein Sauerstoffgradient nachweisbar. Im sauerstoffreduzierten Bereich von 120 m Tiefe waren erhöhte Keimzahlen aerober Saprophyten, erhöhte Hydrolyseraten von Aminopeptidasen und α -Glucosidasen sowie gesteigerte Turnoverraten von C^{14} -Glucose und H^3 -Leucin festzustellen. Mit der Tiefe ansteigende Aktivitäten extrazellulärer β -Glucosidasen koinzidierten mit der Anzahl der Banden im DGGE-Gel. Besonders die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen zeigten eine gute Koinzidenz mit der Anzahl der DGGE-Banden. Einzelne Peaks der Hydrolyseraten traten in bestimmten Tiefen auf, in denen eine charakteristische Bande L zu beobachten war. In Bereichen mit erhöhten Hydrolyseraten der β -Glucosidasen waren gleichzeitig gesteigerte Veränderungen der Gesamtbakterienzahlen festzustellen. In diesen Tiefen war die Anzahl der DGGE-Banden erhöht, während die Keimzahlen der Saprophyten erniedrigt waren.

3.8 Durchmischungsexperimente mit mikrobiellen Gemeinschaften der Gotland See im Gradostaten

Durchmischungs- und Reoxidationseffekte, wie sie im Mikrokosmos und in der Gotland See beobachtet wurden, waren unter *in situ* Bedingungen nicht kontrolliert reproduzierbar. Im Gradostaten wurde der Einfluß von Durchmischung oxischer und sulfidischer Wasserkörper auf mikrobielle Gemeinschaften (Gotland See) und Einzelorganismen (*Shewanella putrefaciens*) unter kontrollierten Bedingungen untersucht.

Nach einer 24 stündigen Vorlaufzeit hatte sich in den 5 Versuchsgefäßen des Gradostaten ein linearer mikrooxisch-sulfidischer Gradient etabliert (Abb.3.44). Die **Sauerstoffkonzentration** lag mit $0.25 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ im Gefäß 1 und $0.12 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ im Gefäß 2 bereits im suboxischen Bereich. Gefäß 3 war vollkommen anoxisch und die H_2S -Konzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Sulfidkonzentration stieg von $10 \mu\text{M}$ im Gefäß 4 auf $35 \mu\text{M}$ im Gefäß 5 an.

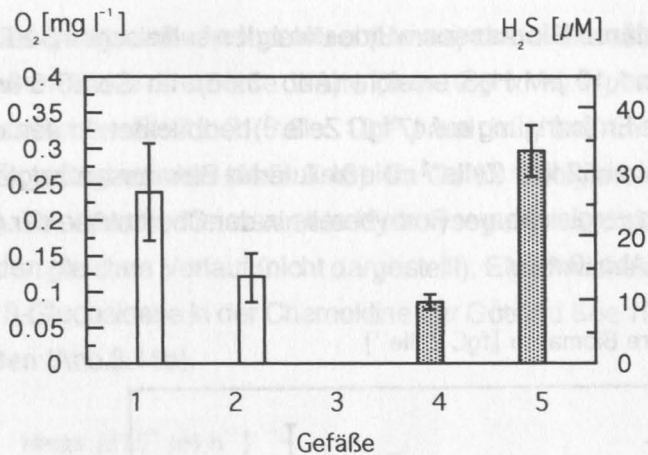


Abb. 3.44: Die Sauerstoff- (□) und Sulfidkonzentrationen (▨) im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

Bereits 24 Stunden nach Etablierung des Gradostaten war eine deutliche Erhöhung der **Gesamtbakterienzahlen** im Gefäß 3 (1.8×10^6 Zellen ml^{-1}) gegenüber den Gefäßen 2 und 4 zu beobachten (1.26×10^6 , Abb.3.45). Dies entsprach einem Anstieg um 30 %. Unter den mikrooxischen Bedingungen von Gefäß 1 ($0.25 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) lagen die Zellzahlen bei 1.7×10^6 Zellen ml^{-1} , während sie unter den sulfidischen Bedingungen von Gefäß 5 ($35 \mu\text{M H}_2\text{S}$) 1.08×10^6 Zellen ml^{-1} erreichten.

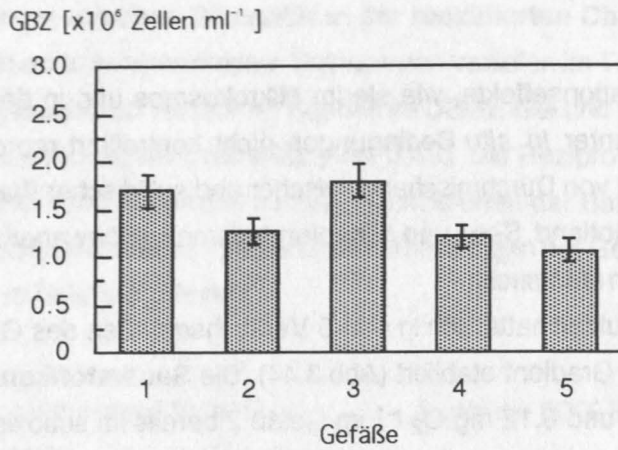



Abb. 3.45: Die Gesamtbakterienzahlen (GBZ, ) im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

Das Maximum der **zellulären Biomassen** wurde unter den sulfidischen Bedingungen von Gefäß 4 mit $56 \text{ fgC Zelle}^{-1}$ und $10 \mu\text{M H}_2\text{S}$ erreicht (Abb. 3.46). Im Gefäß 5 wurde mit steigender Sulfidkonzentration eine Erniedrigung auf $47 \text{ fgC Zelle}^{-1}$ beobachtet. In den oxischen Gefäßen 1 und 2 lagen die Werte bei $52 \text{ fgC Zelle}^{-1}$. Die zellulären Biomassen zeigten im Gradosten ein Verlaufprofil welches in vergleichbarer Form bereits in der Chemokline der Gotland See im April 1993 gefunden wurde (Abb. 3.14a).

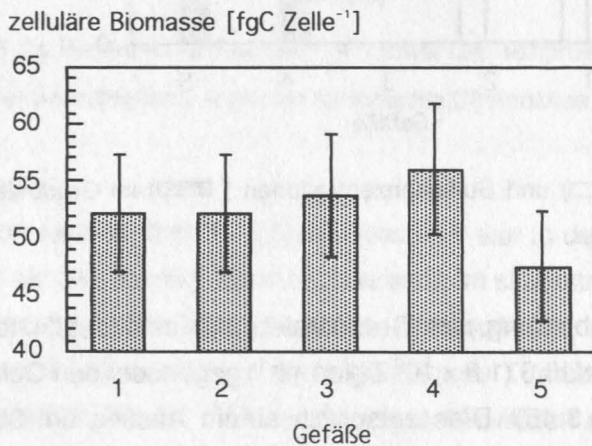



Abb. 3.46: Die zellulären Biomassen () im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

Die **Keimzahlen anaerober heterotropher Saprophyten** zeigten einen linearen Anstieg von 1000 cfu ml^{-1} im oxischen Gefäß 1 auf 5500 cfu ml^{-1} im sulfidischen Gefäß 4 (Abb. 3.47). Die **Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten** zeigten einen entgegengesetzten Verlauf. Sie nahmen mit steigender H_2S -Konzentration ab. Die höchsten Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten waren mit $4.3 \times 10^4 \text{ cfu ml}^{-1}$ im mikrooxischen Gefäß 1 zu finden, gefolgt von einem Rückgang auf $3.7 \times 10^4 \text{ cfu ml}^{-1}$ im Gefäß 2. Im anoxischen Gefäß 3 stiegen die Keimzahlen um 22 % auf $4.0 \times 10^4 \text{ cfu ml}^{-1}$ an. Danach folgte eine Erniedrigung bis auf $2.5 \times 10^4 \text{ cfu ml}^{-1}$.

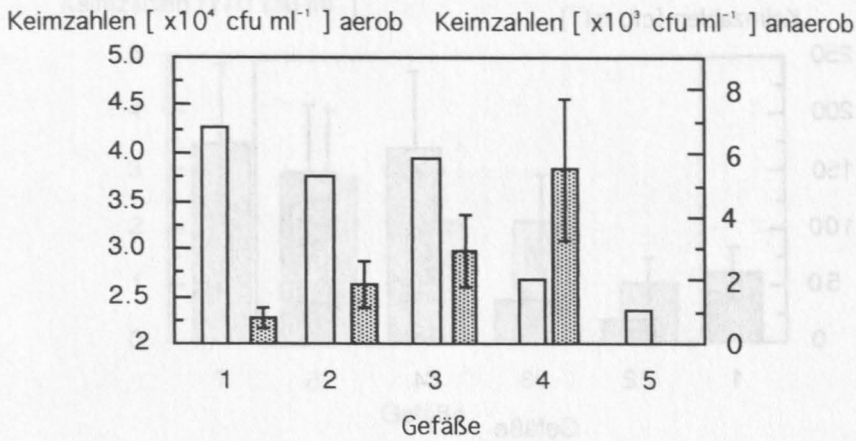




Abb. 3.47: Die Keimzahlen aerober () und anaerober () heterotropher Saprophyten im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

Die **maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax) der α -Glucosidasen** zeigten in den mikrooxygenen Gefäßen 1 und 2 erhöhte Werte (8.0 - $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1}$), die von einer Erniedrigung im anoxischen Gefäß 3 ($6.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1}$) und im sulfidischen Gefäß 4 ($< 0.1 \times 10^{-4} \mu\text{mol h}^{-1}$) gefolgt wurden (Abb. 3.48). Im Gefäß 5 folgte ein erneuter Anstieg auf ($8.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1}$). Die spezifische maximale Hydrolysegeschwindigkeit der α -Glucosidasen ($H_{\text{max}} \text{ cfu}^{-1}$) zeigte den gleichen Verlauf (nicht dargestellt). Ein ähnliches Verlaufprofil wurde für die H_{max} -Werte der β -Glucosidase in der Chemokline der Gotland See 1993 (Abb. 3.16a) und im Mikrokosmos gefunden (Abb.3.16b).

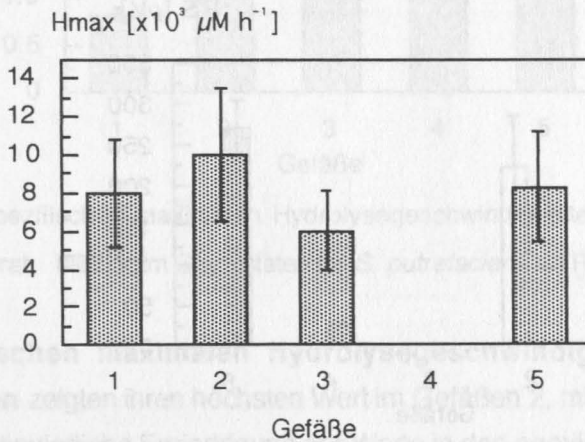



Abb. 3.48: Die maximale Hydrolysegeschwindigkeit (H_{max}) der α -Glucosidasen () im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

Die höchsten **auf TCBS-Agar erfaßten Keimzahlen** copiotropher Bakterien waren in den sulfidischen Gefäßen 4 und 5 mit maximal 170 cfu ml^{-1} zu finden (Abb. 3.49). In den mikrooxygenen Gefäßen 1 und 2 wurden 60 cfu ml^{-1} nicht überschritten. Die lineare Regression zwischen den zellulären Biomassen und den Keimzahlen in den Gefäßen 1 - 4 ergab einen Regressionskoeffizienten von $r = 0.9$ (nicht dargestellt).

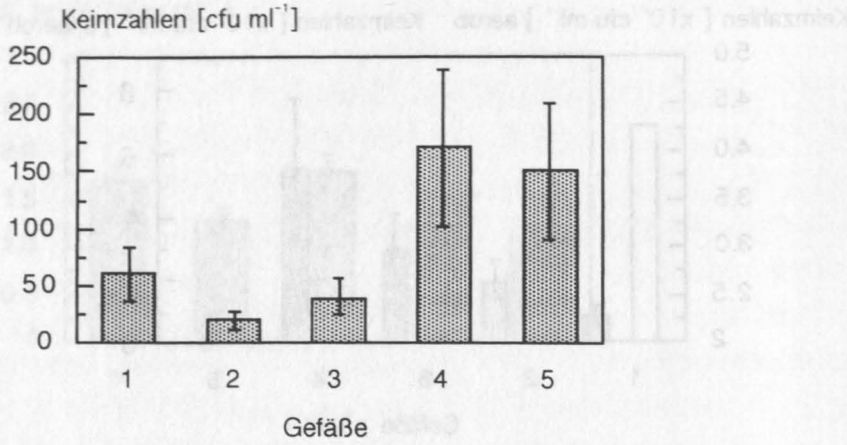



Abb. 3.49: Die Keimzahlen auf TCBS-Agar () im Gradostaten während der Expedition 1992 in die Gotland See.

3.9 Durchmischungsexperimente mit *Shewanella putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) im Gradostaten

Nach einer 3 tägigen Adaptationsphase bildete sich im Gradostaten ein **mikrooxygenischer sulfidischer Gradient** aus, welcher mit $0.06 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ im Gefäß 1 bereits stark O_2 -reduziert war. Gefäß 3 war mit $1 - 2 \mu\text{M H}_2\text{S}$ vollständig anoxisch. Die H_2S -Konzentration erreichte den Höchstwert mit $270 \mu\text{M}$ in Gefäß 5 (Abb. 3.50).

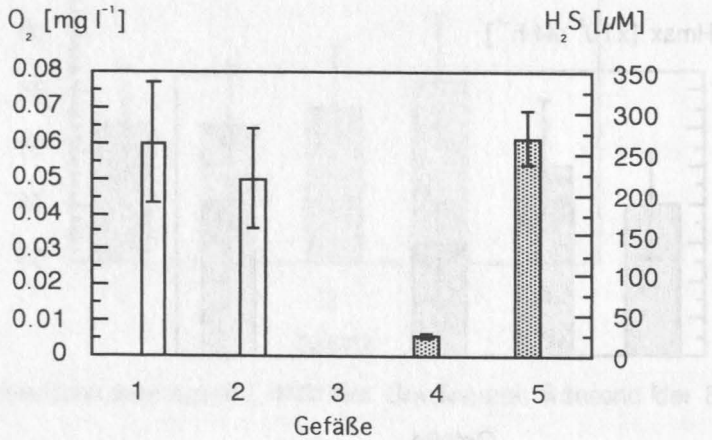




Abb. 3.50: Die Sauerstoff- () und Sulfidkonzentrationen () im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkultur.

Drei Tage nach Inokulation des Gradostaten mit *S. putrefaciens* erreichten die **Keimzahlen** ihren höchsten Wert im Gefäß 1 mit $3.5 \times 10^6 \text{ cfu ml}^{-1}$. Die Werte gingen von Gefäß 1 bis Gefäß 5 fast linear zurück. Im Gefäß 5 lagen die Keimzahlen bei $1.1 \times 10^6 \text{ cfu ml}^{-1}$ (Abb. 3.51).

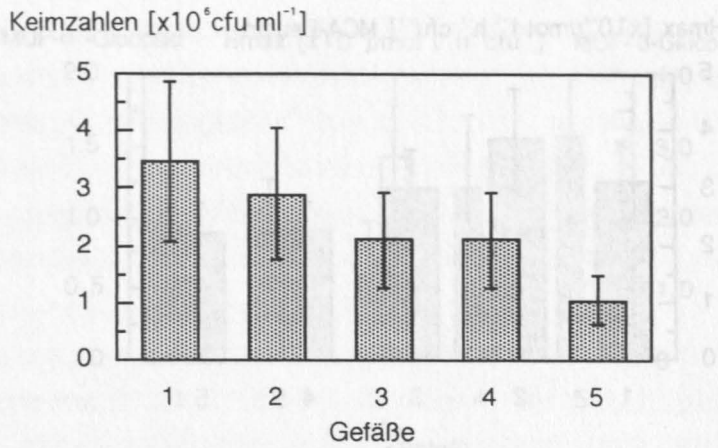



Abb. 3.51: Die Keimzahlen von *S. putrefaciens* () im Gradostaten.

Die **zellspezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten ($H_{\max} \text{ cfu}^{-1}$) der Esterasen** (Substrat: MUF-Butyrat) zeigten im Gefäß 1 ihr Minimum. Es folgte ein gleichmäßiger Anstieg der Esteraseaktivität bis zum Gefäß 5 (Abb. 3.52).

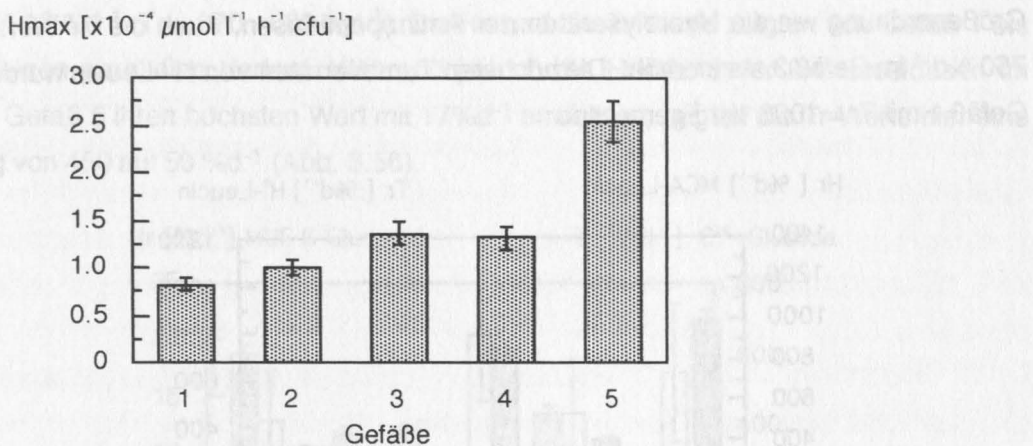



Abb. 3.52: Die spezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Esterasen ($H_{\max} \text{ cfu}^{-1}$, Substrat: MUF-Butyrat, ) im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkultur.

Die **zellspezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten ($H_{\max} \text{ cfu}^{-1}$) der Aminopeptidasen** zeigten ihren höchsten Wert im Gefäßen 2, mit einem Rückgang in Gefäß 1. Es folgte eine kontinuierliche Erniedrigung der Werte in den anoxisch-sulfidischen Gefäßen 3, 4 und 5, (Abb.3.53).

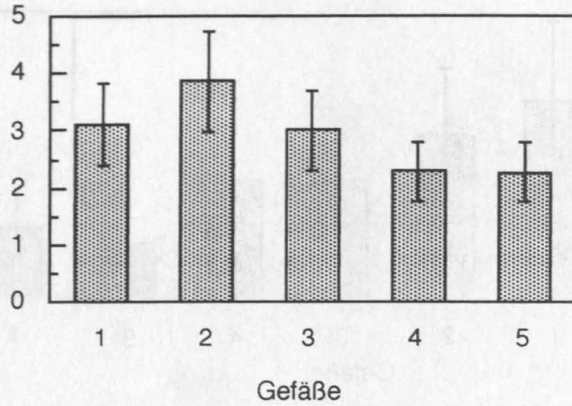

Hmax [$\times 10^{-8} \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cfu}^{-1}$] MCA-Leucin

Abb. 3.53: Die spezifische maximale Hydrolysegeschwindigkeit (Hmax cfu^{-1} , ) der Aminopeptidasen im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkultur.

Die **Hydrolyseraten der Aminopeptidasen** erreichten mit $900 \%d^{-1}$ ihr Maximum im Gefäß 3 (Abb. 3.54). Im Vergleich mit diesem Maximum waren die Werte in den übrigen Gefäßen zu vernachlässigen. Die Turnoverraten (Tr) von H^3 -Leucin bewegten sich in der gleichen Größenordnung wie die Hydrolyseraten der Aminopeptidasen. Auch die Tr-Werte waren mit $750 \%d^{-1}$ im Gefäß 3 stark erhöht. Die höchsten Turnoverraten von H^3 -Leucin wurden jedoch im Gefäß 1 mit $\text{Tr} = 1000 \%d^{-1}$ gemessen.

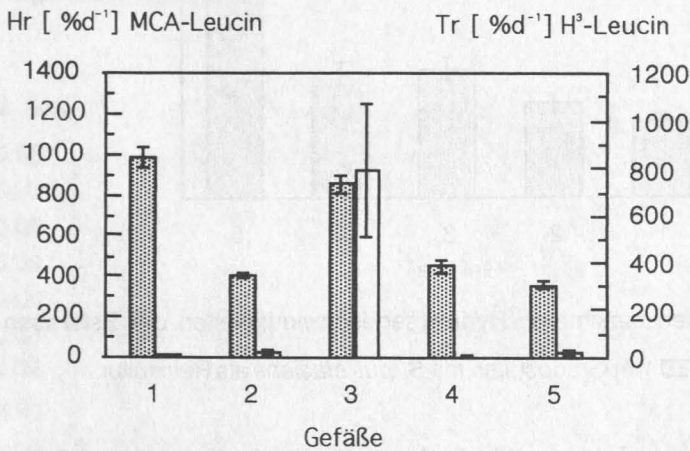




Abb. 3.54: Die Hydrolyseraten (Hr, ) der Aminopeptidasen und die Turnoverraten (Tr, ) von H^3 -Leucin im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkultur.

Die **zellspezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (Hmax cfu^{-1}) der α -Glucosidasen** zeigten im Gefäß 3 ihr Maximum (Abb.3.55). In den Gefäßen 1 und 2 sowie in 4 und 5 waren die Werte relativ erniedrigt. **Die β -Glucosidasen** zeigten dagegen im Gefäß 3 ihr Minimum. Dieses Minimum wurde von einem Anstieg in den sulfidischen Gefäßen 4 und 5 sowie in den mikrooxygenen Gefäßen 1 und 2 gefolgt.

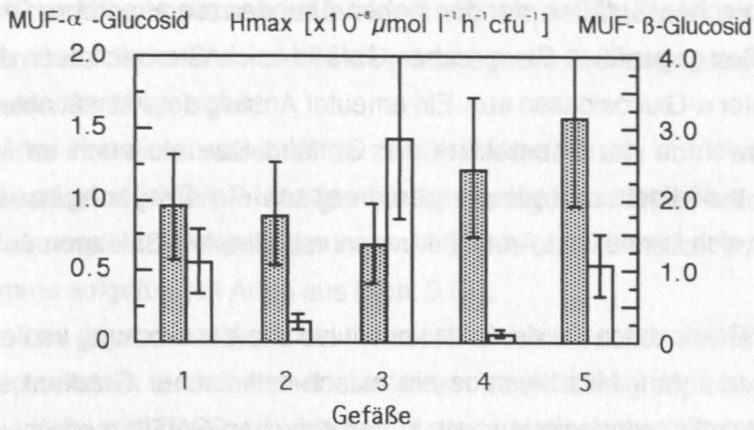


Abb. 3.55: Die spezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max} cfu^{-1}) der α - () und β - () Glucosidasen im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkulturen.

Relativ erniedrigte **Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidasen und Turnoverraten (Tr-) von C^{14} -Glucose** im Gefäß 3 ($H_r = < 0.1 \text{ \%d}^{-1}$, $\text{Tr} = 120 \text{ \%d}^{-1}$) wurden gefolgt von einem Anstieg im sulfidischen Gefäß 4 ($H_r = 14 \text{ \%d}^{-1}$, $\text{Tr} = 450 \text{ \%d}^{-1}$) sowie in den mikrooxischen Gefäßen 1 und 2 ($H_r = 7-12 \text{ \%d}^{-1}$, $\text{Tr} = 370 - 600 \text{ \%d}^{-1}$). Die H_r - und die Tr -Werte zeigten von Gefäß 1 bis in Gefäß 4 einen parallelen Verlauf. Während jedoch die H_r -Werte der β -Glucosidasen im sulfidischen Gefäß 5 ihren höchsten Wert mit 17 \%d^{-1} erreichten, zeigten die Tr -Werte hier eine Erniedrigung von 450 auf 50 \%d^{-1} (Abb. 3.56).

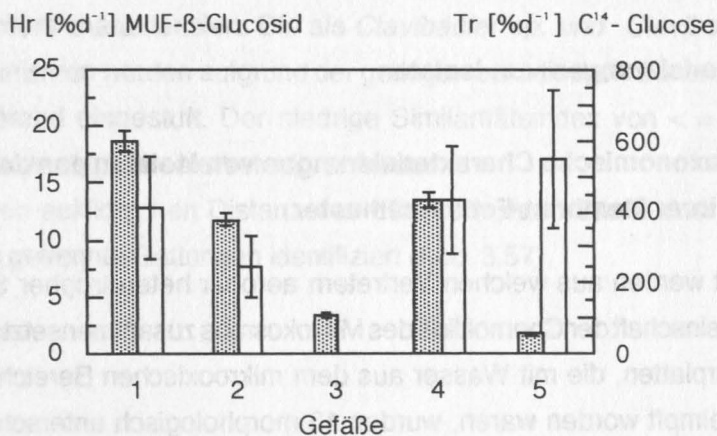


Abb. 3.56: Die Hydrolyseraten (H_r ,) der β -Glucosidasen und die Turnoverraten (Tr ,) von C^{14} -Glucose im Gradostaten mit *S. putrefaciens* als Reinkultur.

Zusammenfassung:

In den 5 Gefäßen des Gradostaten führte die kontinuierliche Vermischung von oxischem und sulfidischem Wasser aus der Gotland See zur Ausbildung eines oxisch-sulfidischen Gradienten. Im Gefäß 3 entstand eine Situation, welche den Sauerstoff- und Sulfidbedingungen im mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Chemokline der Gotland See und des Mikrokosmos entsprach. In diesem Bereich wurden relativ erhöhte Gesamtbakterienzahlen und relativ erhöhte

Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten gefunden. Gesteigerte Abundanzen aerober Saprophyten in den oxischen Gefäßen standen hohen Abundanzen anaerober Saprophyten in den sulfidischen Gefäßen gegenüber. Die oxischen Gefäße zeichneten sich auch durch erhöhte Aktivitäten extrazellulärer α -Glucosidasen aus. Ein erneuter Anstieg der Aktivität unter sulfidischen Bedingungen war sowohl in der Chemokline der Gotland See als auch im Mikrokosmos festzustellen. Unter sulfidischen Bedingungen beobachtete Erhöhungen der zellulären Biomassen spiegelten sich in relativen Anreicherungen copiotropher Bakterien auf TCBS-Agar wider.

In den 5 Gefäßen des Gradostaten wurde durch kontinuierliche Vermischung von oxischem und sulfidischem Wasser aus dem Mikrokosmos ein oxisch-sulfidischer Gradient etabliert. Die Keimzahlen von *Shewanella putrefaciens* waren in den oxischen Gefäßen erhöht, während die zellspezifischen Aktivitäten der Esterasen gesteigerte Werte unter sulfidischen Bedingungen aufwiesen. Die zellspezifischen Aktivitäten der Aminopeptidasen waren dagegen in den oxischen Gefäßen erhöht. Im Gefäß 3 waren gesteigerte Hmax-Werte der α -Glucosidasen zu beobachten, während die β -Glucosidasen hier ein Minimum bildeten. Dieser Wert wurde von einem erneuten Anstieg in den sulfidischen Gefäßen gefolgt. Der parallele Verlauf der Hydrolyseraten der Aminopeptidasen und der Turnoverraten von H^3 -Leucin ließ im Gefäß 3 einen Höchstwert erkennen. Auch die Hydrolyseraten der β -Glucosidasen und die Turnoverraten von C^{14} -Glucose zeigten einen parallelen Verlauf. Sie wiesen jedoch im Gefäß 3 ein Minimum auf, welches von einem Anstieg in den oxischen und den sulfidischen Gefäßen gefolgt wurde. Im stark sulfidischen Gefäß 5 wurden die Turnoverraten jedoch erniedrigt, während die Hydrolyseraten weiter anstiegen.

3.10 Charakterisierungen von Isolaten

3.10.1 Chemotaxonomische Charakterisierungen von Isolaten aus dem Mikrokosmos anhand ihrer Membran-Fettsäuremuster

Es sollte geklärt werden aus welchen Vertretern aerober heterotropher Saprophyten sich die mikrobielle Gemeinschaft der Chemokline des Mikrokosmos zusammensetzte.

Von ZoBell-Agarplatten, die mit Wasser aus dem mikrooxischen Bereich der Chemokline des Mikrokosmos beimpft worden waren, wurden 13 morphologisch unterscheidbare Kolonien auf sterilen Agarplatten vereinzelt und durch mehrfache Überimpfung gereinigt. Diese Isolate wurden chemotaxonomisch anhand ihrer Membran-Fettsäuremuster charakterisiert. Um die Methodik der Fettsäureanalyse zusätzlich abzusichern wurde als Referenzstamm der Typenstamm *Shewanella putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) einer nachträglichen Charakterisierung anhand seines Membran-Fettsäuremusters unterzogen. Die Analyse des Fettsäuremusters ergab bei dem Vergleich mit einem *Shewanella*-Standard aus der Datenbank-Bibliothek einen Similaritäts-Index von 0.151. Der Typenstamm war damit als atypischer *Shewanella putrefaciens* eingestuft.

Gramnegative Organismen

Während sich der Mikrokosmos noch in einem oligotrophen Zustand befand, wurden aus dem mikrooxischen Bereich der Chemokline als gramnegative Bakterien hauptsächlich Vertreter der Gattung *Pseudomonas sp.* isoliert.

Die Analyse der Fettsäuremuster führte zur Charakterisierung von *Pseudomonas putida*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*. Der niedrige Similaritäts-Index von < 0.3 wies diese Organismen als atypische Vertreter der in der MIS-(microbial identification system) Bibliothek als Referenzstämme aufgeführten Arten aus (Abb. 3.57).

Die Zugabe eines Algenextraktes in die Chemokline des Mikrokosmos führte nicht nur zu einer Eutrophierung sondern auch zu einer selektiven Anreicherung copiotropher Bakterien. Diese Bakterien wurden auf TCBS-Agarplatten isoliert. Mehrere, willkürlich von diesen Platten abgeimpfte Isolate wurden anhand ihrer Fettsäuremuster einheitlich als *Shewanella putrefaciens* charakterisiert.

Aufgrund der geringen euklidischen Distanz von $ED = 8$, zwischen dem Typenstamm (DSM-Nr. 6067) und dem aus dem Mikrokosmos isolierten *Shewanella putrefaciens*-Wildtyp waren beide Organismen als atypische *S. putrefaciens* anzusprechen (Abb. 3.57). Eine nachträgliche Charakterisierung beider Organismen mit 2 verschiedenen API-Systemen führte zu einer eindeutigeren Ansprache.

Grampositive Organismen

Aufgrund der Similaritäts-Indizes von > 0.5 wurden die grampositiven Bakterien eindeutig als *Corynebacterium bovis*, *Clavibacter michiganense* sowie *Aureobacterium saperdae* und *Aureobacterium testaceum* charakterisiert. Die als *Clavibacter sp.* und *Clavibacter insidiosum* charakterisierten Organismen wurden aufgrund der geringen euklidischen Distanz von $ED = 12$ als zu einer Art gehörend eingestuft. Der niedrige Similaritätsindex von ≤ 0.3 wies beide Organismen allerdings als atypische Vertreter ihrer Art aus.

Trotz der sehr geringen euklidischen Distanz von $ED = 2$ wurden *Clavibacter insidiosum* und *Bacillus coagulans* als getrennte Gattungen identifiziert (Abb. 3.57).

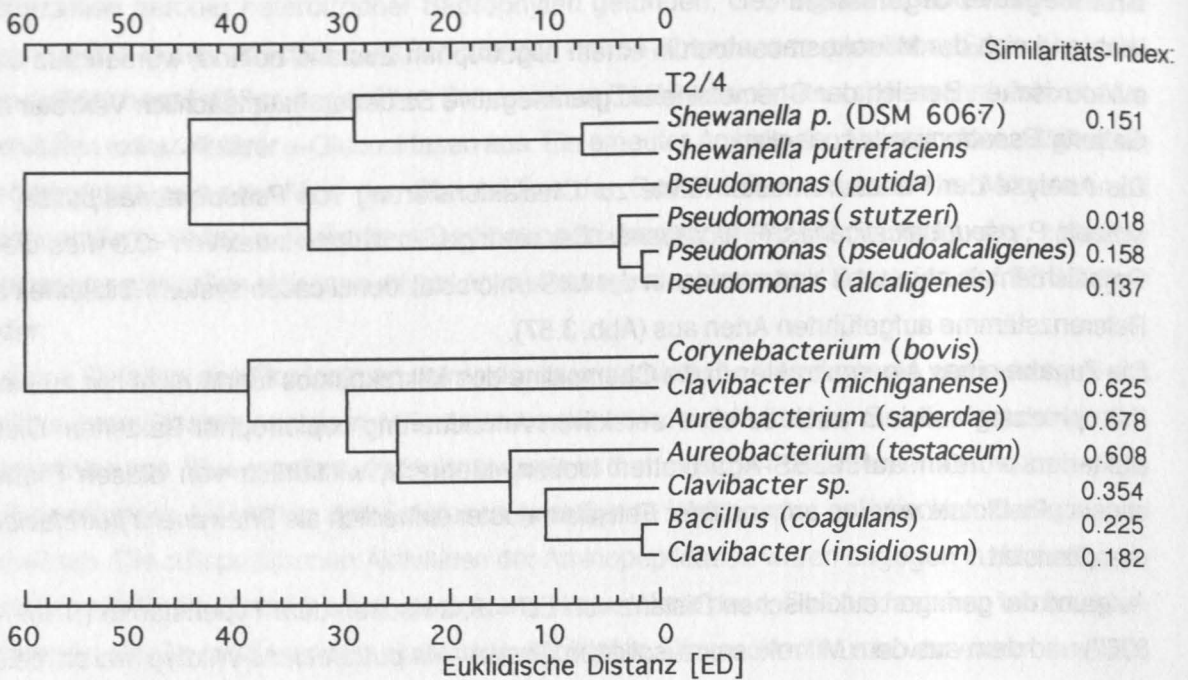


Abb. 3.57: Dendrogramm der Fettsäuremuster der aus dem mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos isolierten und charakterisierten aeroben heterotrophen Saprophyten.

3.10.2 Biochemische Charakterisierung von *S. putrefaciens* mit API-Systemen

Anhand des Referenzstammes der MIS-Bibliothek wurde der Typenstamm *S. putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) sowie der Wildtyp *S. putrefaciens*- aus dem Mikrokosmos als atypisch eingestuft. Beide Organismen wurden daher einer zusätzlichen Charakterisierung durch die API-Systeme 20E und 20NE unterzogen. Sowohl der Typenstamm (DSM-Nr. 6067) als auch der Wildtyp wurden als *Shewanella putrefaciens* identifiziert. Lediglich der Nachweis der Ornithindecaboxylase als Identifikationskriterium im API-System 20 E konnte in beiden Organismen nicht geführt werden. Die Anwendung des Systems 20 NE führte, im Gegensatz zum System 20 E, aufgrund uneindeutiger Nachweisreaktionen (Tab. 2, f) zu keiner klaren Identifizierung beider Organismen.

API 20 E	DSM 6067 <i>Shewanella</i>	Wildtyp <i>Shewanella</i>	API 20NE	DSM 6067 <i>Shewanella</i>	Wildtyp <i>Shewanella</i>
β-Galactosidase	-	-	β-Galactosidase	-	-
Arginindihydrolase	-	-	Arginindihydrolase	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-	β-Glucosidase	+	+
Ornithin-Decarboxylase	f	f	Mannose Assimilation	-	-
Melobiose	-	-	N-Acetylglucosamin	f	+
H ₂ S-Produktion	+	+	Maltose Assimilation	-	-
Urease	-	-	Urease	-	-
Tryptophan-Desaminase	-	-	Tryptophan-Desaminase	-	-
Acetoin-Produktion	-	-	Glucose Ferment.	-	-
Gelatinase	+	+	Gelatinase	+	+
Glucose Ferment./Oxidat.	-	-	Glucose Assimilation	-	-
Mannit "	-	-	Mannit "	-	-
Inosit "	-	-	Gluconat "	-	-
Sorbit "	-	-	Caprat "	f	f
Rhamnose "	-	-	Adipat "	-	-
Saccharose "	-	-	Malat "	f	f
Citrat "	+	+	Citrat "	-	-
Amygdalin "	-	-	Phenylacetat "	-	-
Arabinose "	-	-	Arabinose "	+	-
Cytochromoxidase	+	+	Cytochromoxidase	+	+
NO ₂ -Produktion	+	+	NO ₂ -Produktion	+	+
Reduktion zu N ₂	-	-	Reduktion zu N ₂	-	-

Tab. 2: Ergebnisse der biochemischen Reaktionen zur Charakterisierung von *Shewanella putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) und *S. putrefaciens*-Wildtyp mit den API-Systemen 20E und 20NE (-: keine Reaktion, +: positive Reaktion, f: Fehlbestimmung).

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

Eine kritische Betrachtung der im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzten Methoden zur Bestimmung der bakteriellen Sekundärproduktion sowie der heterotrophen mikrobiellen Aktivitäten mit radioaktiv markierten Monomeren wird in ausführlicher Form in den Arbeiten von Giesenhagen (1996) und Schwarz (1995) dargestellt. Da in der vorliegenden Arbeit in erster Linie neue oder modifizierte Techniken zum Einsatz kamen, werden nur diese einer kritischen Betrachtung unterzogen.

4.1.1 Der Gefrierschöpfer für kleinskalige Probennahmen in der Chemokline des Mikrokosmos

Während des Gefriervorganges kam es an der Gefriermembran des Gefrierschöpfers aufgrund der starken Temperaturemniedrigung zu einer Abwärtsströmung. Diese Bewegung hatte zur Folge, daß Partikel und Strukturen aus ihrer ursprünglichen Lage nach unten verschoben wurden. Die Verschiebung wurde um so stärker je länger der Gefriervorgang dauerte und um so weiter die einzufrierenden Strukturen von der Gefriermembran entfernt waren. Bei einer Gefrierzeit von ca. 5 Sekunden und einer Eisdicke von 1.5 mm betrug die Partikelverschiebung nach Krembs (1995) etwa 2-3 mm. In dieser Untersuchung lag der Fehler für eine errechnete Partikelverschiebung von 3 mm und einer Segmentlänge der Eisstücke von 10 mm bei 30 %. Die Eissegmente erreichten nach einer Gefrierzeit von 5 Sekunden Volumina von je 100-200 μl . Diese Mengen waren ausreichend für Keimzahlbestimmungen. In einem Vorversuch wurde jedoch gezeigt, daß der schockartige Gefrierprozess und das anschließende Auftauen der Eissegmente die Keimfähigkeit aerober heterotropher Saprohyten um bis zu 85% reduzierte (Werte nicht dargestellt). Dies hatte zur Folge, daß nur ein kleiner Anteil der keimfähigen Bakterien erfaßt werden konnte. Trotzdem war es möglich, Keimzahlunterschiede zwischen den Proben festzustellen.

Trotz dieser Nachteile ermöglichte diese Methode eine verbesserte kleinskalige Auflösung der Probennahme im oxisch-sulfidischen Grenzbereich der Chemokline des Mikrokosmos. Sie scheint daher besonders für Untersuchungen zur kleinskaligen Verteilung von bakteriellen Zelldichten und Partikeln im flüssigen Milieu geeignet zu sein (Krembs, 1995).

4.1.2 Die Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten in Mikrotiterplatten

Die Methodik zur Erfassung ektoenzymatischer Aktivitäten mittels fluorogener Modellsubstrate sowie ihre Limitationen wurde in der Literatur bereits ausführlich diskutiert (Hoppe, 1983; Hoppe, 1993; Chrost, 1990).

An dieser Stelle soll nur auf methodische Schwierigkeiten eingegangen werden, die sich aus der Anwendung dieser Methodik in Mikrotiterplatten nach Schmitt-Biegel und Obst (1989) ergaben. Gegenüber der herkömmlichen Inkubation der Proben in 20 ml Schlißflaschen zeichneten sich die Inkubationen und Messungen in Mikrotiterplatten durch erniedrigte Werte aus, was auf eine Hemmung der ektoenzymatischen Aktivitäten schließen ließ. Möglicherweise war die Hemmung

auf die Oberflächenbeschaffenheit der Mikrotiterplatten zurückzuführen. Für das Substratanalog MCA-Leucin konnte die Hemmung bis zu 56% betragen (Werte nicht dargestellt). Da dieser Hemmeffekt für alle Proben konstant war und im Rahmen dieser Untersuchung vorwiegend Vergleichsmessungen durchgeführt wurden, konnte diese Einschränkung in Kauf genommen werden.

Besondere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Bestimmung ektoenzymatischer Aktivitäten in Proben aus oxischen, mikrooxischen und sulfidischen Bereichen der Chemoklinen, da die *in situ* Gaspartialdrucke während der Inkubationen nicht aufrecht erhalten werden konnten. So war speziell bei anoxischen Inkubationen von Proben aus den mikrooxischen Bereichen ($< 0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) des Mikrokosmos und der Gotland See gegenüber den oxischen Inkubationen eine Aktivitätserhöhung von 18-159 % zu beobachten. Offensichtlich reagierten die mikrobiellen Gemeinschaften auf die mikrooxischen Bedingungen mit der Synthese speziell mikroaerob-anaerob adaptierter extrazellulärer Enzyme. Erst die sauerstoffreduzierte Inkubation unter einer Argon (Ar) -Atmosphäre ermöglichte den Enzymen eine den *in situ* Verhältnissen angepaßte Funktion (s. Kap. 3.1.1).

Die Tatsache, daß dieser Effekt sowohl im mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos als auch in der Gotland See in vergleichbaren Größenordnungen auftrat war als ein wichtiger Hinweis auf physiologische Ähnlichkeiten zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften in beiden Systeme zu werten.

Die Inkubation von Proben aus dem anoxischen Bereich der Chemoklinen in Mikrotiterplatten aus Polystyrol hatte allerdings den Nachteil, daß die Platten etwa 24 Stunden vor der Beschickung mit Probenmaterial einer reduzierten Atmosphäre aus Formiergas ausgesetzt werden mußten. Dies diente dazu, um den restlichen Sauerstoff in den Poren des Kunststoffpolymeres zu reduzieren, was anscheinend nicht immer vollständig gelungen ist, da die Standardabweichungen der Einzelmessungen bei anoxischer Inkubation um 15% höher lagen als bei oxischer Inkubation. Trotz dieser Nachteile wurden bei routinemäßig durchgeführten Messungen von Proben aus mikrooxischen oder anoxischen Bereichen der anoxischen Inkubation in Mikrotiterplatten unter einer Ar-Atmosphäre der Vorzug gegeben. Diese Art der Inkubation entsprach wahrscheinlich am ehesten den *in situ* Bedingungen in Chemoklinen.

4.1.3 Die lichtleitergestützte fluorimetrische *in situ* EEA-Messung

Die Mikrotiterplatten-Methode zur Erfassung ektoenzymatischer Aktivitäten in Freiwasser-Chemoklinen war mit einigen Kompromissen behaftet und entsprach keiner "echten" *in situ* Bestimmung. In verschiedenen Vorversuchen wurden die ersten Grundlagen für eine lichtleitergestützte fluorimetrische *in situ* EEA-Messung geschaffen. Das Hauptproblem bei der Ableitung von Anregungs- und Emissionslicht (300-400 nm) über Lichtleiter lag in der starken Dämpfung von ultraviolettem Licht durch Kunststoff. Dies führte bei der Verwendung von Kunststofflichtleitern zu starken Sensitivitätsverlusten gegenüber der direkten Messung im Fluorimeter. Der Sensitivitätsverlust lag im Bereich von einer Größenordnung, so daß MUF-Konzentrationen nur im μM -Bereich detektiert werden konnten. Diese Verluste konnten nur zum Teil durch eine Erhöhung der Lampenspannung (high voltage) im Fluorimeter (Kontron SFM-25)

ausgeglichen werden. Für weiterführende Untersuchungen ist eine zusätzliche Erhöhung der Empfindlichkeit bei der Verwendung von Quarz-Lichtleitern (Fa. Laser Components) zu erwarten. Diese zeichnen sich durch ausgesprochen geringe Dämpfungseigenschaften aus. Da sich diese Methode noch in der Vorversuchsphase befindet, wurde für den Einsatz im Mikrokosmos den wesentlich flexibleren Kunststofflichtleitern (Fa. Conrad) der Vorzug gegeben.

Prinzipiell scheint dieser neue Ansatz für *in situ* - Quantifizierungen von ektoenzymatischen Aktivitäten geeignet zu sein. Der besondere Vorteil der Lichtleitertechnik beruht auf der kontinuierlichen Messung im Tiefenprofil der Chemokline. Geringste Aktivitätsänderungen können so registriert werden. Für herkömmliche Fluoreszenzmessungen in Fluorimetern müssen die Proben dagegen in diskreten Abständen aus der Chemokline entnommen werden (Abb. 3.17a - b; Abb. 3.18a).

Aufgrund der zur Zeit noch geringen Sensitivität müssen jedoch sehr hohe Substratkonzentrationen von leicht hydrolysierbaren Modellsubstraten wie z.B. MUF-Butyrat eingesetzt werden. Alternative fluorogene Substratanaloga wie z.B. MUF- α -Glucosid, MUF- β -Glucosid oder MCA-Leucin werden im Vergleich zu MUF-Butyrat nur sehr langsam hydrolysiert was wiederum längere Inkubationszeiten zur Folge hat. Längere Inkubationszeiten resultieren jedoch in einer verstärkten Diffusion der Substrate mit dem Ergebnis, daß keine räumliche Auflösung der ektoenzymatischen Aktivitäten im Tiefenprofil mehr möglich ist. Gegenwärtig liegt die Sensitivität dieses Messprinzips noch weit unter der Empfindlichkeit herkömmlicher Fluoreszenzmessungen in handelsüblichen Fluorimetern. Die Erfassung von *in situ* Aktivitäten mit Hilfe von Lichtleitern birgt jedoch ein großes Potential. Besonders in kontrollierbaren Systemen mit hohen mikrobiellen Aktivitäten, wie sie in Chemoklinen des Mikrokosmos oder von Sedimenten zu erwarten sind, ist eine weiterentwickelte Version dieser Technik möglicherweise erfolgversprechend einsetzbar.

4.1.4 Der Einsatz eines optischen Sauerstoffsensors

Optische Chemo- und Biosensoren (Optroden) halten in den letzten Jahren zunehmend Einzug in der biotechnologischen Prozesskontrolle (Anders, 1991; Anders et al., 1993; Schultz, 1992; Kohls et al., 1994). Der große Vorteil des von Kohls et al. (1994) entwickelten faseroptischen Sauerstoffsensors beruht auf seiner Anströmungsfreiheit, sowie der hohen Sensitivität im sauerstofflimitierten Bereich. Das System schien daher zusammen mit der extremen Flexibilität des Lichtleiters für den Einsatz im Mikrokosmos geeignet zu sein. Besonders im suboxischen Bereich demonstrierte die Sauerstoffsonde durch ihre hohe Sensitivität bei geringen Änderungen der Sauerstoffkonzentrationen ihre Eignung für den Einsatz in mikrooxisch-anoxischen Übergangsbereichen. Nachteilig wirkte sich jedoch ihre geringe Stabilität gegenüber H_2S aus. Bereits nach dem ersten Kontakt mit H_2S war das Fluorophor "vergiftet" und hatte seine fluorogenen Eigenschaften vollständig eingebüßt (s. Kap. 3.1.3). Offensichtlich beruhte die Fluoreszenzhemmung auf einer Reaktion des Sulfids mit dem metallischen Ruthenium-Molekül im Inneren des organischen Ringsystems. Damit beschränkten sich die Einsatzmöglichkeiten der Optrode im Mikrokosmos auf den oxisch-mikrooxischen Bereich der Chemokline. Die Sonde kann jedoch sehr vorteilhaft in allen Experimenten eingesetzt werden bei denen zwar niedrige

Sauerstoffkonzentrationen aber kein H₂S vorhanden ist.

4.1.5 Die Denaturierende Gel Gradienten Electrophorese (DGGE)

Die DGGE-Technik stellt einen neuen Ansatz dar, um die genetische Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften direkt zu bestimmen (Muyzer et al., 1993).

Sie eignet sich auch dazu, Veränderungen in der Artenzusammensetzung natürlicher Gemeinschaften nach Störungen festzustellen (Muyzer, 1995). Da bereits DGGE-Analysen aus oxisch-sulfidischen Gradienten in mikrobiellen Matten vorlagen (Muyzer et al., 1993), erschien diese Methode speziell hinsichtlich der Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften in den oxisch-sulfidischen Gradienten von Chemoklinen geeignet. Gegenwärtig liegen bis auf Untersuchungen von (Muyzer et al., 1993; Donner et al., 1995; Wawer und Muyzer, 1995; Ferris et al. 1996) keine veröffentlichten Daten über DGGE-Analysen an komplexen mikrobiellen Gemeinschaften vor. Die Datenbasis ist damit zur Zeit noch sehr schmal, so daß sich die Diskussion in erster Linie auf neue Erkenntnisse beziehen wird, die im Rahmen des "workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology" im Juni 1995 in Braunschweig gewonnenen wurden.

4.1.6 Der Einfluß unvollständiger Zelllysis auf die Qualität der DGGE

Voraussetzung für eine quantitative Extraktion der bakteriellen Gesamt-DNA ist die vollständige Lyse sämtlicher Bakterienzellen in einer mikrobiellen Gemeinschaft. Nur die extrahierte DNA kann auch durch die PCR amplifiziert und mit der folgenden DGGE aufgetrennt werden. Ein kritischer Punkt bei der Extraktion von Nukleinsäuren aus Freilandmaterial kann nach Smalla et al. (1995) das Zelllyse-Verhalten von Sporen grampositiver Bakterien oder von Dauerstadien sein. Eine unvollständige Lyse, sowie Verluste von DNA während der Aufreinigung führen dazu, daß nach der Amplifikation durch die PCR die DGGE ein unvollständiges Bild von der genetischen Diversität der bakteriellen Gemeinschaft liefert. Eine Abschätzung des Anteils nicht lysierbarer Zellen konnte im Rahmen dieser Untersuchung jedoch nicht durchgeführt werden.

4.1.7 Ungleichmäßige Amplifikationen während der PCR

Im Normalfall wird die DNA während der PCR gleichmäßig amplifiziert, so daß sämtliche DNA - Fragmente unterschiedlicher Sequenzen nach der PCR in gleicher Menge vorliegen. Untersuchungen von Engelen et al. (1995) zeigten jedoch, daß DNA-Fragmente mit spezifischer Sequenz, die etwa einen Anteil von 10% an der Gesamt-DNA einer mikrobiellen Gemeinschaft ausmachten, nach der PCR in gleicher Menge vorlagen, wie DNA-Fragmente die vor der PCR einen Anteil von 90% an der Gesamt-DNA stellten. Organismen mit einem Anteil unter 10% werden ungleichmäßig amplifiziert und bilden nach der Anfärbung der DGGE-Gele mit Ethidiumbromid nur schwache Banden. Abundanzänderungen in einer mikrobiellen Gemeinschaft die sich in einer drastischen Änderung der Dominanzen einzelner Arten widerspiegeln, können daher teilweise durch Intensitätsänderungen im Bandenmuster der DGGE festgestellt werden. Derartige drastische Änderungen im Dominanzgefüge der bakteriellen Gemeinschaften traten in

dieser Untersuchung beispielsweise im Mikrokosmos auf, nachdem durch Störungen in der Chemokline trophische Änderungen hervorgerufen wurden (s. Kap. 3.6.4).

4.1.8 Die Wahl der geeigneten Primer

Die in dieser Untersuchung hauptsächlich verwendeten Primer P1 und P2 sind spezifisch für alle Eubakterien. Mit dieser Primerkombination führten Muyzer et al. (1993) Trennungen von DNA-Fragmenten bis zum Artniveau durch. Organismen mit einem Anteil von $\geq 1\%$ an der bakteriellen Gemeinschaft konnten mit der DGGE von ihnen noch nachgewiesen werden. Allerdings handelte es sich dabei im einzelnen um physiologisch sehr unterschiedliche Organismen (*E. coli*, *Desulfovibrio sapovorans*, *D. desulfuricans*, *Microcoleus chthonoplastes* und *Thiobacillus thioparus*). Nach Vallaey (1995) sind PCR-Produkte von phylogenetisch weit voneinander entfernt liegenden Organismen leichter im DGGE-Gel zu trennen als nahe verwandte Arten. In dieser Untersuchung konnte eine Anzahl nahe verwandter aerober heterotropher Saprophyten mit den hier verwendeten Primern P1 und P2 lediglich in grampositive und gramnegative Organismen unterschieden werden. Bei den Grampositiven handelte es sich dabei um *Corynebacterium sp.*, *Clavibacter sp.*, *Aureobacter sp.* und *Bacillus sp.*, während die gramnegativen Organismen durch nahe verwandte Pseudomonaden sowie durch *Shewanella putrefaciens* vertreten waren. Die mit dieser Primerkombination amplifizierten 233 bp langen Fragmente der V3 Region der 16S rDNA zeigten offensichtlich für diese Organismengruppen keine ausreichenden Sequenzunterschiede, um im DGGE-Gel eine artspezifische Trennung zu ermöglichen. Da sich die Saprophyten auf zwei Bereiche im Gel konzentrierten, trat diese Gruppe bei DGGE-Analysen von komplexen Gemeinschaften allerdings nicht mehr störend hervor. Dies führte zu einer reduzierten Komplexität des DGGE-Musters, so daß in dieser Untersuchung drastische Veränderungen der taxonomischen Struktur der Gemeinschaft deutlich sichtbar wurden. Die mit der Primerkombination P1 und P3 amplifizierten 519 bp langen Fragmente zeigten dagegen ausreichende Sequenzunterschiede um auch eine Trennung aerober heterotropher Saprophyten zu ermöglichen. Hierbei trat jedoch das Problem der Bildung von Doppelbanden und Mehrfachbanden im Gel auf. Mehr als 500 Basenpaare können nach Meinung von Felske et al. (1995) nicht mehr sinnvoll mit der DGGE aufgetrennt werden, da die DNA-Fragmente mit zunehmender Länge kein definiertes Denaturierungsverhalten mehr aufweisen. Sie bilden daher im DGGE-Gel mehrere Schmelzbereiche aus, die als Doppel- oder Mehrfachbanden zu erkennen sind (s. Abb. 3.5). Nach Backhaus (1995) können mit solchen Fragmenten nur sehr einfach strukturierte Mischpopulationen aufgetrennt werden.

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich für die Beurteilung der in dieser Untersuchung durchgeführten DGGE-Analysen folgendes Bild:

Der mit der gewählten Primerkombination (P1 und P2) amplifizierte Bereich der V3-Region der 16S rDNA enthält keine ausreichenden Sequenzunterschiede, um eine artspezifische Auftrennung komplexer mikrobieller Gemeinschaften zu ermöglichen. Allerdings können die mit der DGGE in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, daß sie die genetische Diversität (Sequenzvariabilität) für den amplifizierte Bereich der V3-Region innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften widerspiegeln. Da einzelne Banden im DGGE-Gel

mehrere nahe verwandte Arten repräsentieren können, ist es gerechtfertigt in diesem Zusammenhang von taxonomischen Gruppen zu sprechen. Änderungen im Bandenmuster der DGGE sind damit tatsächliche Änderungen sowohl der genetischen als auch der taxonomischen Struktur einer mikrobiellen Gemeinschaft. Witzel (1995) schlägt vor, für zukünftige artspezifische Untersuchungen zunächst mit universellen Primern weite Regionen der 16S rRNA zu amplifizieren, um dann mit speziellen Primern bestimmte art- oder gruppenspezifische Gensequenzen zu reamplifizieren. Diese genspezifischen Sequenzen könnten dann mit der DGGE artspezifisch aufgetrennt werden.

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten die mit der DGGE aufgetrennt wurden ist zur Zeit noch mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Sequenzierungen schwacher DGGE-Banden oft keine sauberen Sequenzen ergeben (Rölleke et al., 1995). Dies kann dazu führen, daß verschiedene Banden teilweise als gleiche Sequenzen erkannt werden (Rölleke et al., 1995). In einzelnen DGGE-Banden scheint daher noch ausreichend DNA von verschiedenen Organismen vorzuliegen (Hengstmann und Liesack, 1995). Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß keine 100%ige Trennung der DNA-Stränge im Gel erfolgt. Um die DNA einzelner Banden sequenzieren zu können, muß sie vorher aus dem Gel herausgeschnitten und in einer weiteren PCR reamplifiziert werden. Geringste Verunreinigungen mit Fremd-DNA werden dann ebenfalls amplifiziert und führen bei der anschließenden Sequenzierung zu Fehlbestimmungen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Sequenzierungen verzichtet. Ferris et al. (1995, 1996) gelang es jedoch, die mikrobielle Diversität in heißen Quellen und Matten zu bestimmen, indem sie einzelne DGGE-Banden sequenzierten und hybridisierten sowie mit internen Standards verglichen. Individuelle Banden wurden nach der Sequenzierung als Cyanobakterien, grüne Schwefelbakterien und *Cloroflexus sp.* identifiziert. Je einfacher eine mikrobielle Gemeinschaft strukturiert ist und je größer die phylogenetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen sind, desto eher spiegelt die DGGE-Analyse anscheinend die *in situ* -Diversität wider.

4.1.9 Die Chemokline im Mikrokosmos

Nach einer Definition von Pritchard und Bourquin (1994) ist der Mikrokosmos ein experimentelles System, mit dem ein intaktes, minimal gestörtes Teilökosystem in ein Labor überführt wird. Der Mikrokosmos entspricht damit einem quasi-holistischen System (Wimpenny, 1989). Die Vergleichbarkeit der in Mikrokosmosexperimenten gewonnenen Ergebnisse mit dem realen Lebensraum ist u.a. davon abhängig wie sich Störungen auf die langzeitige Entwicklung eines Mikrokosmosystems auswirken können. Man muß sich darüber im klaren sein, daß eine exakte Simulation eines Ökosystems im Mikrokosmos nicht möglich sein wird (Oviatt et al., 1977). Es gibt jedoch analoge Strukturen im natürlichen Ökosystem und im Mikrokosmos, die bei einer geeigneten Fragestellung vergleichbare Antworten liefern können. Auf die Vergleichbarkeit beider Systeme wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

Eine entscheidende Frage, die sich während dieser Untersuchung stellte, war, ob sich die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Ökosystems im realen Lebensraum und im Mikrokosmos derart signifikant voneinander unterscheiden, daß eine Interpretation der

Mikrokosmosergebnisse im Sinne einer ökologischen Kausalanalyse völlig unmöglich wäre (Leser, 1995). Das in dieser Arbeit vorgestellte System zur Simulation von Chemoklinen im Freiwasser (s. Kap. 3.2) unterschied sich von der Mikrokosmos-Definition von Pritchard und Bourquin (1984) dadurch, daß die Chemokline im Mikrokosmos kein intaktes Teilökosystem der Chemokline der Gotland See darstellte. Die Chemokline der Gotland See stellt sich als ein relativ stabiles System dar, in welchem sich durch langzeitige Stagnationsperioden speziell an die Bedingungen im Redoxgradienten adaptierte mikrobielle Gemeinschaften etablieren konnten (Höfle und Brettar, 1990a). Im Gegensatz dazu handelte es sich bei der Chemokline im Mikrokosmos um einen oxisch-sulfidischen Gradienten, der mit Oberflächenwasser aus der Kieler Förde erzeugt wurde. Die bakteriellen Gemeinschaften dieses Ökosystems unterschieden sich ihrer Zusammensetzung und ihren Nährstoffansprüchen möglicherweise grundlegend von den Gemeinschaften im Tiefenwasser der Gotland See, welche eher an oligotrophe Bedingungen adaptiert waren.

Während die Akkumulation biogen produzierten Schwefelwasserstoffs in der Chemokline der Gotland See vom Sediment aus erfolgte (Stigebrandt und Wulff, 1987), wurde das anoxische "Bodenwasser" in der Chemokline des Mikrokosmos durch Begasung mit Stickstoff und anschließender Reduktion mit Na_2S erzeugt. Obwohl es sich in der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See um Ostseewasser handelte, zeichneten sich beide Wasserkörper damit durch vollständig voneinander verschiedene hydrographische und biologische Vorgeschichten aus.

Trotz dieser Unterschiede war das strukturell verbindende Element beider Systeme der Gradient zwischen Sauerstoff und Sulfid. Aufgrund des Redoxgefälles herrschten in beiden Systemen vermutlich vergleichbare Selektionsbedingungen. Es war daher anzunehmen, daß sich nach ausreichend langen Adaptationsphasen in der Chemokline des Mikrokosmos bakterielle Gemeinschaften etablieren konnten, die sowohl in Ihrer Funktion als auch in ihrer Artenzusammensetzung mit Gemeinschaften in der Chemokline der Gotland See vergleichbar waren. Diese Feststellung wird unterstützt durch die Tatsache, daß viele wichtige Bakterien aus oxischen und anoxischen marinen Bereichen ubiquitär sind (Tuttle und Jannasch, 1972). Bölter und Rheinheimer (1987) stellten außerdem in weiten Bereichen der Ostsee eine auffallend homogene Zusammensetzung der zymogenen bakteriellen Gemeinschaften fest.

4.1.10 Die Stabilisierung des oxisch-sulfidischen Gradienten in der Chemokline des Mikrokosmos

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Chemokline im Mikrokosmos und der Gotland See bestand in der Dimensionierung der oxisch-sulfidischen Gradienten. Austauschprozesse, die sich in der Gotland See über mehrere Meter erstreckten, waren im Mikrokosmos auf nur wenige Zentimeter beschränkt. Nach dem Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos, der Unterschichtung des mikrooxischen Wasserkörpers mit sulfidischem Wasser, resultierten die Oxidations- und Reduktionsreaktionen im mikrooxischen-sulfidischen Übergangsbereich nach 14 Tagen in der Ausbildung einer 4 cm breiten Zone, in der weder Sauerstoff noch Sulfid in messbaren Konzentrationen vorlagen.

Im Laufe von vier Wochen schrumpfte der mikrooxische Bereich ($0.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) auf eine Breite von 2 cm. Hier lag Sulfid noch mit $5 \mu\text{M}$ vor. Diese Verteilung der Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen war vergleichbar mit einer mikrooxischen Situation in der Chemokline im schwarzen Meer in 78 - 120 m Tiefe (Mopper und Kieber, 1991) sowie in der Gotland See im Juli 1987 in 110 - 130 m Tiefe (Brettar und Rheinheimer, 1992). Vergleichbare Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen wurden auch im April 1993 in 125 - 132 m Tiefe in der Chemokline der Gotland See gemessen. Während sich der mikrooxische Bereich im Mikrokosmos auf einen nur wenige cm breiten Bereich beschränkte, der im Laufe von 2 - 3 Monate auf wenige mm schrumpfen konnte, erstreckte sich diese Zone im Freiwasser über mehrere Meter. Dieser Effekt machte sich auch in den Sauerstoffkonzentrationen bemerkbar, die in der Chemokline der Gotland See oberhalb der mikrooxischen Zone in 125 m Tiefe langsam von 0 auf $1.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ in 120 m Tiefe anstiegen. Im Mikrokosmos wurde diese Konzentration bereits 2 cm oberhalb des mikrooxischen Bereiches erreicht. Gründe für die im Vergleich zur Gotland See steilen Sauerstoff-Sulfid Gradienten beruhen auf den kurzen Diffusionswegen, die in der Dimensionierung des Mikrokosmos zu suchen sind. Hinzu kommt die kurze Wasseräule des Mikrokosmos von 2 m. Dies führte dazu, daß Sauerstoff von der Wasseroberfläche relativ schnell in die Chemokline diffundieren konnte. Im Oberflächenbereich erreichte der Sauerstoff Sättigungskonzentrationen, während im anoxischen Bereich der Schwefelwasserstoff auf Werte über $300 \mu\text{M}$ anstieg. In der Gotland See beträgt dagegen die Entfernung zwischen dem in 200 m Tiefe im Sediment gebildeten H_2S und der Chemokline in 120 - 140 m Tiefe etwa 70 m. Die Folge dieses langen Diffusionsweges ist ein dementsprechend langgestreckter oxisch-sulfidischer Gradient.

4.2 Erhöhte mikrobielle Aktivitäten in der Chemokline und die Anpassung der bakteriellen Gemeinschaften an die Bedingungen im Mikrokosmos

Nach dem Aufbau der Chemokline im Mikrokosmos reagierten die aerob adaptierten Bakteriengemeinschaften auf den ersten Kontakt mit dem Zellgift H_2S zunächst mit einem Rückgang der Abundanzen (s. Kap. 3.2.2). Nach etwa 10 Tagen machte sich im mikrooxischen Bereich der Chemokline jedoch ein langsamer Anstieg der Zelldichten bemerkbar. Erhöhte Zelldichten sind in den oxisch-anoxischen Übergangsbereichen von Chemoklinen vielfach beobachtete Phänomene und stehen mit den in mikrooxischen Bereichen allgemein erhöhten mikrobiellen Aktivitäten im Zusammenhang (Gast und Gocke, 1988; Rheinheimer et al., 1989; Gocke, 1989; Schwarz, 1995; Giesenhausen, 1996). Die erhöhte mikrobielle Aktivität machte sich im mikrooxischen Übergangsbereich auch in einer Erhöhung der Keimzahlen aerober heterotropher Saprohyten bemerkbar, wie sie von Gast und Gocke (1988) bereits in der Chemokline der Gotland See gefunden wurden. Dieser Anstieg der Keimzahlen, als Hinweis auf die erhöhte Teilungsfähigkeit der Bakterienzellen, spiegelte sich auch im mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos bereits 12 Tage nach Aufbau der Chemokline in einem relativ erhöhten Anteil der Lebendzellzahlen (TVDC-Zahlen) wider. Im sulfidischen Bereich deutete dagegen die Koinzidenz zwischen biogen produziertem H_2S und den Gesamtbakterienzahlen auf die Etablierung einer Gemeinschaft sulfatreduzierender Bakterien.

Diese Beobachtungen werden als erste Indizien für die Anpassung der bakteriellen Gemeinschaft

an die charakteristischen Selektionsbedingungen im Redoxgradienten des Mikrokosmos gedeutet.

4.2.1 Erhöhte zelluläre Biomassen in der Chemokline des Mikrokosmos

Unter anoxischen Bedingungen wird bei pelagischen Bakterien vielfach eine Zunahme der zellulären Biomasse beobachtet (Gast und Gocke, 1988; Fenchel et al., 1990; Cole et al., 1993). Gast und Gocke (1988) stellten im anoxischen Bodenwasser der Gotland See einen dreifachen Anstieg des bakteriellen Zellvolumens fest. Dagegen fiel der durchschnittliche Anstieg im mikrooxygenen Bereich des Mikrokosmos während der 14 tägigen Etablierungsphase mit 35% vergleichsweise niedrig aus. Nach Gast und Gocke (1988) setzte sich die bakterielle Gemeinschaft in der Gotland See möglicherweise aus 2 Größenklassen zusammen. Während eine Größenklasse Bakterien repräsentierte, welche an die normale Substratkonzentration angepaßt waren, befand sich eine zweite Größenklasse in einem physiologischen Ruhezustand und reagierte auf kurzfristige Verbesserungen der Lebensbedingungen mit einem Anstieg der zellulären Biomasseproduktion (Gast und Gocke, 1988). Im Mikrokosmos deutete der phasenweise korrespondierende Verlauf zwischen den oszillierenden Sauerstoffkonzentrationen und den bakteriellen Biomassen auf eine bakterielle Gemeinschaft, die auf eine geringe Verbesserung der Sauerstoffversorgung mit einer Erhöhung ihrer zellulären Biomasse reagierte. Der Wechsel von einem oxischen zu einem anoxischen System stellt für die Zelle einen physiologischen Stress dar. Anstatt sich zu teilen, reagiert sie darauf zunächst mit einer vermehrten Proteinsynthese, die von einer Volumenzunahme begleitet wird (Hoppe et al., 1990). Für diese Überlegung spricht im Mikrokosmos die Abnahme der Sauerstoffkonzentration, die sich, über den gesamten Zeitraum der Etablierungsphase gemittelt, insgesamt in einem Anstieg der zellulären Biomassen widerspiegelte. Hohe Sulfidkonzentrationen konnten im mikrooxygen-sulfidischen Bereich des Mikrokosmos für den Anstieg der zellulären Biomassen allerdings nicht verantwortlich gemacht werden, da trotz Rückgang der Sulfidkonzentrationen bis auf $<0.1 \mu\text{M}$ ein weiterer Anstieg der zellulären Biomassen zu beobachten war.

Zusammenfassend zeigte sich, daß die mikrobiellen Gemeinschaften in der Chemokline des Mikrokosmos bereits im Verlaufe einer 14 tägigen Etablierungsphase physiologische Reaktionen aufwiesen, wie sie in vergleichbarer Form auch von anderen Arbeitsgruppen bereits in der Chemokline der Gotland See gefunden wurden.

4.2.2 Erhöhte heterotrophe Aktivitäten mikrobieller Gemeinschaften in Chemoklinen

In der Gotland See bildet sich in etwa 130 m Tiefe, über einen Bereich von 10 - 20 m, ein Gleichgewicht zwischen Oxidations- und Reduktionsprozessen aus (Reinheimer et al., 1989). Gleichzeitig ablaufende sauerstoffzehrende, heterotrophe Abbauprozesse unterstützen dabei die Stabilisierung des oxisch-anoxischen Übergangsbereiches. Hohe Gesamtbakterienzahlen, erhöhte Biomassen sowie ein Anstieg der Keimzahlen heterotropher Saprophyten im oxisch-anoxischen Übergangsbereich der Gotland See sind das Resultat einer gesteigerten mikrobiellen heterotrophen Aktivität. Das hierfür benötigte organische Material stammt in gelöster (DOM) oder partikulärer Form (POM) entweder aus der chemoautotrophen Produktion des oxisch-sulfidischen Grenzbereiches (Reinheimer et al., 1989), oder wird durch die "grazing" Aktivität bakteriovorere

Flagellaten freigesetzt (Brettar und Höfle, 1993). Eine weitere Quelle für organisches Material stellt die Primärproduktion dar. In der Gotland See stellten Stigebrandt und Wulf (1987) nach der Sedimentation der Frühjahrsblüte einen Anstieg des DOM in der Wassersäule fest. In der Chemokline des Mikrokosmos kam dagegen als einzige Kohlenstoffquelle nur die chemoautorophe Produktion in Frage.

Der Hauptanteil des DOM besteht aus hochmolekularen Verbindungen (Chrost, 1981; Chrost, 1991) wie Proteinen, Polysacchariden und Nukleinsäuren (Münster, 1991). Diese können nicht direkt von mikroheterotrophen Organismen aufgenommen werden. Nur kleine Moleküle (Monomere und Dimere), mit einer maximalen Molekulargröße von 600 DA werden direkt über aktive Transportmechanismen durch die semipermeable Zellmembran in die Zelle eingeschleust (Weiss et al., 1991). Durch die Produktion von Ektoenzymen kann fast das gesamte DOM nach hydrolytischer Spaltung in Form von Monomeren und Dimeren von der Zelle absorbiert werden (Rogers, 1991). Die Hydrolyse polymerer organischer Verbindungen ist damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei allen heterotrophen Abbauvorgängen (King, 1986).

Bakterien wurden als die Hauptträger für ektoenzymatische Aktivitäten identifiziert (Hoppe, 1983; Chrost, 1991; Rath und Herndl, 1994). So fand Chrost (1989), daß die Aktivität der β -Glucosidase überwiegend auf die Größenklasse der Bakterien beschränkt war. Diese Beobachtung wurde in der Gotland See 1993 durch den parallelen Verlauf von Gesamtbakterienzahlen (Abb. 3.13a) und den Hydrolyseraten (Hr) der β -Glucosidase (Abb. 3.19a) im Tiefenprofil der Chemokline bestärkt. Die im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich beobachteten erhöhten Gesamtbakterienzahlen spiegelten sich in einer vermehrten Aufnahme von glycosidischen Monomeren wider, deren Verfügbarkeit das Resultat der hydrolytischen Aktivität extrazellulärer Glucosidasen war. Die Folge war eine Erniedrigung der vorhandenen Menge glycosidisch verknüpfter Kohlenhydrate, was sich wiederum in einer erhöhten Hydrolyserate ausdrückte.

4.2.3 Der heterotrophe Abbau glycosidisch verknüpfter Verbindungen und die hemmende Wirkung von H_2S

Hoppe et al. (1990) untersuchten den hemmenden Einfluß von H_2S auf die bakteriellen Aktivitäten in Batch-Kulturexperimenten. Aerob adaptierte bakterielle Gemeinschaften aus der Kieler Bucht wurden in Kurzzeitexperimenten (1 - 2 Tage) wechselnden, pulsartig erfolgten H_2S -Schüben ausgesetzt. Dabei wurde eine teilweise Hemmung der ektoenzymatischen Aktivitäten und ein vollständiger Zusammenbruch der Aufnahme von C^{14} -Glucose durch die Bakterien festgestellt. Eine vergleichbare Hemmung von aerob adaptierten Bakterien durch H_2S wurde auch von Schwarz (1995) in Durchmischungsexperimenten mit oxischem und sulfidischen Wasserkörpern gefunden.

Mit zunehmender Wassertiefe und steigender Sulfidkonzentration machte sich die toxische Wirkung des Sulfids auch in der Chemokline der Gotland See und des Mikrokosmos in einem Rückgang der Hydrolyse- und Turnoverraten bemerkbar (Schwarz, 1995). Dieser Effekt war in dieser Untersuchung in der Chemokline des Mikrokosmos ausgeprägter als in der Gotland See (Abb. 3.19a-b). Der hemmende Einfluß des Sulfids führte hier jedoch zu einem stärkeren

Rückgang der Enzymaktivität, so daß die Hydrolyseraten und die Zelldichten voneinander getrennt verliefen. In der Chemokline der Gotland See und im Mikrokosmos war nur eine teilweise Hemmung der Aktivität der β -Glucosidase zu beobachten. So zeigten die Hydrolyseraten sowie die maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten (H_{max}) unterhalb der mikrooxischen-sulfidischen Grenzschicht wieder einen leichten Anstieg, der auf eine fortgesetzte hydrolytische Aktivität der β -Glucosidase schließen ließ (Abb. 3.16a-b). Dieser Effekt wurde im sulfidischen Bereich des Mikrokosmos und der Gotland See festgestellt. Der Wiederanstieg der hydrolytischen Aktivitäten könnte auf die, im Vergleich zu den oben erwähnten Experimenten, viel längeren Adaptationszeit zurückzuführen sein. Möglicherweise kommt es unter sulfidischen Bedingungen zur Bildung von H_2S -resistenten Enzymen. Hier könnten u.a. Aminopeptidasen eine Rolle spielen, die nicht mit Metallen assoziiert sind (Hoppe, pers. Mittlg.). Hohe Aktivitäten extrazellulärer Glucosidasen unter sulfidischen Bedingungen wurden auch von Giesenhagen (1996) beobachtet. King (1986) fand in Sedimenten im Tidenbereich eine hohe Aktivität von β -Glucosidasen, die vollkommen unbeeinflusst von der Sauerstoffkonzentration war. Die glycosidische Spaltung von polymeren Kohlenhydraten kann unter anoxischen Bedingungen von verschiedenen anaerob adaptierten Bakteriengruppen durchgeführt werden (Fenchel und Blackburn, 1979; Zehnder, 1988). Unter stagnierenden Bedingungen etablieren sich im sulfidischen Bereich der Chemoklinen daher vermutlich anaerobe heterotrophe Gemeinschaften, die für eine erhöhte Glucosidaseaktivität verantwortlich sein könnten.

Die Aktivität der β -Glucosidasen und die Aufnahme der hydrolytisch abgespaltenen Glucosemonomere durch die Bakterienzellen folgt einer Kinetik 1. Ordnung (Somville, 1984). Damit ist eine enge Kopplung zwischen der Hydrolyserate der β -Glucosidase und der Glucoseaufnahme zu erwarten (Chrost, 1989). Dieses gekoppelte Hydrolyse-Aufnahmesystem konnte 1993 in der Chemokline der Gotland See zwischen der Hydrolyserate der β -Glucosidase und der Turnoverrate von C^{14} -Glucose sowohl in dieser Untersuchung als auch von Schwarz (1995) beobachtet werden. Während jedoch die Turnoverrate von C^{14} -Glucose im sulfidischen Bereich erniedrigt war, zeigte die Hydrolyserate der β -Glucosidase den bereits erwähnten Anstieg. Die Folge war möglicherweise eine relative Erhöhung der Konzentrationen gelöster Glucosemonomere im sulfidischen Bereich der Chemokline. Gleichzeitig war auch ein hoher K_t+Sn -Wert ein Indiz für eine möglicherweise erhöhte Konzentration ektoenzymatisch freigesetzter Monomere (Chrost, 1991). Ein hoher K_t+Sn -Wert wies andererseits auch auf eine geringe Substrataffinität des Enzyms hin, die auf eine Hemmung durch H_2S zurückzuführen sein könnte. Die physiologische Ursache für eine mögliche relative Anreicherung von Monomeren im sulfidischen Bereich der Chemoklinen liegt in der toxischen Wirkung des Sulfids begründet (Hoppe et al., 1990). Die Aufnahme von Monomeren über die Zellmembran ist als aktiver Transport energieabhängig und an den Metabolismus gekoppelt. Dieser zellgesteuerte Prozess wird damit direkt oder indirekt durch das Zellgift H_2S hemmbar (Priest, 1984; Krambeck, 1979). Die Ektoenzyme sind dagegen mit der cytoplasmatischen Membran assoziiert oder liegen frei im periplasmatischen Raum vor (Wetzel, 1991). Nur ein geringer Anteil der ektoenzymatischen Aktivität (EEA) liegt frei gelöst im Wasser vor (Hoppe, 1991). Die EEA unterliegt daher nicht der direkten zellulären Kontrolle und reagiert bei Kontakt mit Sulfid konservativer als die

Stoffaufnahme (Priest, 1984). Allerdings kann die Neubildung von Enzymen durch H_2S beeinflusst werden (Hoppe, pers. Mittlg.).

4.2.4 Der Abbau von Proteinen und der Aufbau zellulärer Biomasse in Chemoklinen

Die Aktivität der β -Glucosidase ist für die hydrolytische Spaltung von Zellulose und Zellulose-Derivaten (β -D-glycosidische Kohlenhydrate) verantwortlich (Roy et al., 1988). Die Hydrolyse von leicht abbaubaren Proteinen beruht hingegen auf der peptidolytischen Aktivität extrazellulärer Proteasen. Mit der Tiefe ansteigende C/N-Verhältnisse in der Wassersäule deuten daher auf einen bevorzugten Abbau proteinhaltigen Materials hin (Karl et al., 1988). Nach Joints und Morris (1982) gelangen nur 10 % der Primärproduktion in tiefere Wasserschichten. Der Anteil der Proteinfraction der über Sedimentation in den mikrooxischen Bereich der Chemokline der Gotland See (130 m) gelangt, ist daher entsprechend niedrig. Im Tiefenwasser der Gotland See scheint die Kopplung zwischen dem aus der Primärproduktion stammenden organischen Material und der heterotrophen Aktivität nur auf saisonale Sedimentationsereignisse beschränkt zu sein (Brettar, 1991b).

Der Expedition 1993 in die Gotland See ging keine Phytoplanktonblüte voraus (Jochem, F., IfM-Kiel, pers. Mittlg.), so daß keine Sedimentationseffekte in der Chemokline zu erwarten waren. Trotzdem war im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich ein Anstieg des hydrolytischen Potentials (H_{max}) der Aminopeptidasen festzustellen. Begleitet wurde dieses Maximum von einem stark erhöhten $Kt+Sn$ -Wert der Leucin-Aminopeptidase, welcher gleichzeitig als ein Hinweis auf möglicherweise erhöhte Aminosäurekonzentrationen gedeutet werden konnte (Billen, 1991). Dieser Anstieg wurde auch im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich der Chemokline des Mikrokosmos festgestellt. Erhöhte Aminosäurekonzentrationen könnten im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich der Chemoklinen auf eine erhöhte Fraßaktivität und Freisetzung von proteinhaltigem Material (Mopper und Lindroth, 1982; Peduzzi und Herndl, 1992) und dessen Spaltung durch Aminopeptidasen zurückzuführen sein. Mit steigender Sulfidkonzentration war jedoch auch die peptidolytische Aktivität in der Gotland See sowie im Mikrokosmos einer Erniedrigung unterworfen. Wie die β -Glucosidase so war auch bei der Aminopeptidase eine teilweise Hemmung der ektoenzymatischen Aktivität durch Sulfid zu vermuten. Besonders mit Schwermetallen assoziierte Enzyme, wie z.B. Metalloproteasen, sind schon bei niedrigen Sulfidkonzentrationen in ihrer Aktivität beeinträchtigt (Hoppe et al., 1990).

Generell war die erhöhte hydrolytische Freisetzung von Aminosäuren im oxisch-anoxischen Übergangsbereich mit der gleichzeitigen Aufnahme der Monomere in die Bakterienzelle gekoppelt. Erhöhte Turnoverraten von radiotiv markiertem Leucin standen in der Gotland See in erster Linie mit einer gesteigerten zellulären Proteinsynthese in Beziehung, was sich auch in einer vermehrten bakteriellen Sekundär-(BSP) sowie Biomasseproduktion ausdrückte (Donough et al., 1986; Riemann und Azam, 1992; Schwarz, 1995) und so auch im Mikrokosmos gefunden wurde. Karner und Herndl (1992) fanden eine enge Korrelation zwischen potentiellen Aminopeptidaseaktivitäten und heterotrophen Aktivitäten sowie der bakteriellen Sekundärproduktion. Eine vermehrte Proteinsynthese ist mit der Produktion von neuem Zellmaterial gekoppelt (Kirchman et al., 1986). Dies spiegelte sich in der vorliegenden Untersuchung in einer erhöhten Wachstumsrate wider

deren Funktion als Steuergröße für die Kontrolle der zellulären Synthese von extrazellulären Proteasen bekannt ist (Daatselaar und Harder, 1974).

Diese physiologische Reaktionsskette aus gesteigerter peptidolytischer Aktivität, gefolgt von der vermehrten Aufnahme von Aminosäuremonomeren, die schließlich zu einem Anstieg der bakteriellen Produktion führte, konnte 1993 im mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Chemokline der Gotland See und in der Chemokline des Mikrokosmos nachvollzogen werden (s. Kap. 3.3.2-4).

4.2.5 Erhöhte Aktivitäten der Esterasen unter sulfidischen Bedingungen

Nach Deuser (1971) wurden 80 - 95% des gesamten organischen Kohlenstoffeintrags aus der Primärproduktion in der oxischen Wassersäule des Schwarzen Meeres mineralisiert. Im Sediment lagen davon 4% festgelegt vor. Der restliche organische Kohlenstoff bestand unterhalb der oxisch-anoxischen Übergangszone zu 52 % aus Carboxylsäuren.

Die im mikrooxisch-sulfidischen Bereich der Gotland See 1993 beobachteten Koinzidenzen zwischen erhöhten Gesamtbakterienzahlen und dem erhöhten hydrolytischen Potential der Esterasen sprechen für eine Beteiligung der Bakterien an der Freisetzung von Carboxylsäuren (Abb. 3.13a-b und 3.17a-b). Die Esterasen hydrolysieren hauptsächlich kurzkettige Fettsäuren in ihre Carboxylsäuren. So wies (Maghji et al., 1990) in *Bacillus subtilis* eine extrazelluläre Carboxyl-Esterase nach, deren Hydrolysemuster aus kurz und mittellangen Ketten von Methylestern und aromatischen Estern, dem von *Pseudomonas sp.* und *Pseudomonas fluorescenz* ähnelte. Pseudomonaden wurden von Tiedje (1988) u.a. als potente Denitrifizierer identifiziert und könnten daher auch eine dominierende Rolle in oxisch-anoxischen Grenzbereichen spielen. Auch *E. coli* ist nach Fiksdal et al. (1989) in der Lage, das als Substratanalog für Esterasen eingesetzte MUF-Heptanoat zu hydrolysieren. Das auch in dieser Untersuchung eingesetzte Substrat MUF-Heptanoat wird unter anderem auch zum Nachweis zellulärer Esterasen in menschlichen Zellkulturen eingesetzt (Stadler et al., 1989; Zouboulis et al., 1995). Es ist jedoch nicht bekannt, in welchem Ausmaß die hier eingesetzten Modellsubstrate MUF-Heptanoat oder MUF-Butyrat natürliche Substrate für marine Bakterien darstellen oder wie breit das Spektrum der Substratspezifität der Enzyme ist (Fiksdal et al. 1989). So zeigen viele Proteasen neben ihrer peptidolytischen Aktivität auch die Fähigkeit kurzkettige Fettsäuren zu spalten (Maghji et al. 1990). Die vielfach Verwendung findenden fluorogenen Modellsubstrate MUF-Heptanoat - Butyrat und Fluorescein diacetat (FDA), sowie die nichtfluorogenen Substrate p-nitrophenol - Propionat - Acetat und Butyrat, werden daher vermutlich durch eine Anzahl unspezifischer Esterasen gespalten (Maghji et al., 1990; Meyer-Reil, 1991).

Eine hohe hydrolytische Aktivität dieser unspezifischen Esterasen setzt in der mikrooxisch-sulfidischen Wassersäule vermutlich eine große Menge an Carboxylsäuren frei.

Die im sulfidischen Bereich der Chemoklinen beobachtete Entkopplung zwischen den Hydrolyseraten und den Turnoverraten der entsprechenden Monomere resultiert möglicherweise in der bereits erwähnten Anreicherung von Monomeren wie sie von Hoppe et al. (1990) und Schwarz (1995) postuliert werden. Diese Monomere stellen wiederum Substrate für anaerobe

Fermentationsprozesse dar, deren primäre Endprodukte Carboxylsäuren sein können. Die anaerobe Fermentation scheint daher eine weitere Quelle für Carboxylsäuren in anoxischen Bereichen der Wassersäule zu sein. Schauder und Schink (1989) isolierten bereits aus sulfidischen Süßwassersedimenten das anaerobe Bakterium *Anaerovibrio glycerini* sp. nov., welches in der Lage war, Glycerol und Diolein anaerob zu Propionat zu fermentieren. Gleichzeitig sind Carboxylsäuren u.a. das organische Substrat für sulfatreduzierende Bakterien (Fenchel und Blackburn, 1979; Schlegel, 1985; Zehnder, 1988). Der im sulfidischen Bereich des Mikrokosmos über mehrere Wochen beobachtete Anstieg des Sulfids um eine Größenordnung (von 30 auf 300 $\mu\text{M H}_2\text{S}$) deutete auf eine hohe biogene Sulfatreduktion, die ausschließlich in der Wassersäule erfolgte. In der Gotland See wird die biogen produzierte Sulfidmenge in der Wassersäule allgemein vernachlässigt. Hier wird das Sediment als Ort erhöhter Sulfatreduktion und als eigentliche Sulfidquelle betrachtet (Bansemir und Rheinheimer, 1974).

Organische Säuren, Fermentationsprodukte und andere Substrate für Sulfatreduzierer und Methanogene werden in den Sedimenten und der Wassersäule des Schwarzen Meeres in geringeren Mengen verbraucht, als sie durch Fermentation oder durch die hydrolytische Spaltung von Fettsäuren nachgeliefert werden. Daher kommt es hier zu einer relativen Anreicherung von Carboxylsäuren (Mopper und Kieber, 1991). Ein analoger Prozess ist in der anoxischen Wassersäule der Gotland See und im Mikrokosmos zu vermuten.

4.2.6 Keimzahlen als verbindendes Element zwischen taxonomischer Struktur und mikrobieller Aktivität

Die bakteriellen Gemeinschaften unterliegen im oxisch-sulfidischen Gradienten der Chemokline einer wechselnden Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren und sind gezwungen, auf das sinkende Redoxpotential mit metabolischen Anpassungen zu reagieren (Rheinheimer, 1991). Dieser selektive Einfluß des oxisch-sulfidischen Übergangsbereiches führte in der Chemokline zur Ausbildung von Aktivitätshorizonten, die mit charakteristischen Abundanzverteilungen verschiedener ökophysiologischer Bakteriengruppen in Beziehung gesetzt werden konnten (s. Kap. 3.4). Charakteristische Stoffumsetzungen werden durch sogenannte ökophysiologische Gruppen "katalysiert", die sich unter definierten Kulturbedingungen, durch die eine ökologische Nische simuliert wird, anreichern. Ökophysiologische Gruppen sind daher das Bindeglied zwischen ökologischer Struktur- und Funktionsanalyse (Reichardt, 1978).

Aerobe Saprophyten und die Aktivität der Glucosidasen im oxisch Bereich der Chemokline

Die im oxisch-mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos beobachtete erhöhte ektoenzymatische Freisetzung von glycosidischen Monomeren in Kopplung mit einer gesteigerten Aufnahme von C^{14} -Glucose spiegelte sich in den erhöhten Keimzahlen aerober heterotropher Saprophyten wieder (Abb. 3.16b; 3.19b; 3.20). Einen vergleichbaren Anstieg der Keimzahlen aerober Saprophyten fanden Brettar und Höfle (1993) im oxisch-mikrooxischen Bereich der Gotland See. Saprophyten repräsentieren jedoch insgesamt nur einen kleinen Anteil der potentiell metabolisch aktiven Bakterien in einer mikrobiellen Gemeinschaft (Rheinheimer et al. 1989). Sie sind damit eine

wichtige Indikatorgruppe, da sie auf schnell wechselnde Substratmengen mit erhöhten Teilungsraten reagieren können (Rheinheimer et al. 1989).

Im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich des Mikrokosmos kam als einzige verfügbare Kohlenstoffquelle durch chemoautotrophe Bakterien produziertes organisches Material in Frage. Dieses Material gelangte durch Diffusion oder künstlich erzeugte Turbulenzen in den oxischen Bereich der Chemokline und regte hier aerobe Saprophyten zu erhöhten Teilungsaktivitäten an. In der Chemokline der Gotland See führen möglicherweise sporadisch auftretende Einströme von dichterem Nordseewasser zu einer Verschiebung des mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereiches. Unter Umständen gelangt durch diese Störungen organisches Material aus dem sulfidischen Bereich der Chemokline in oxische Zonen und trägt hier zur Stimulation aerober Bakterien bei (Schwarz, 1995).

Heterotrophe Denitrifizierer und die peptidolytische Aktivität im sulfidischen Bereich der Chemokline

Im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich der Gotland See wiesen Brettar (1991a) sowie Brettar und Rheinheimer (1991b) hohe, durch MPN-Techniken bestimmte Keimzahlen denitrifizierender Bakterien nach. Da heterotrophe Denitrifizierer nach bisherigen Anschauungen in der Chemokline der Gotland See DOM-limitiert sind (Brettar, 1991a), profitieren sie im mikrooxisch-sulfidischen Bereich von der chemoautotrophen Produktion (Gocke, 1989, Bettar und Reinheimer, 1991b) und den durch "grazing"-Prozessen freigesetzten Proteinen und Aminosäuren (Mopper und Lindroth, 1982; Berman et al. 1987; Peduzzi und Herndl, 1992). Diese Vorstellung spiegelte sich im mikrooxisch-sulfidischen Bereich des Mikrokosmos in erhöhten Aktivitäten der Aminopeptidasen sowie in einer gesteigerten bakteriellen Sekundärproduktion wieder, welche gleichzeitig von einer Abundanzzunahme heterotropher, denitrifizierender Bakterien begleitet wurde (Abb. 3.14b, 3.15b, 3.20). Nach Brettar und Höfle (1993) stellen heterotrophe Denitrifizierer im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich der Gotland See den Hauptanteil der Saprophyten. Bisher ging man davon aus, daß der organische Kohlenstoff aus der Primärproduktion als Elektronendonator für die Denitrifikation genutzt wurde. Die Denitrifikation war damit abhängig von saisonal auftretenden Sedimentationsereignissen (Hattori, 1983). Da im Mikrokosmos keine Sedimentationsereignisse zu erwarten waren, kam als einzige Kohlenstoffquelle die chemoautotrophe Produktion in Frage.

Autotrophe- und heterotrophe Schwefeloxidierer im oxisch-sulfidischen Grenzbereich der Chemokline

Brettar (1991a) beobachtete im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich eine H_2S und NO_3^- limitierte Denitrifikation, die im Gegensatz zur heterotrophen Denitrifikation vollkommen unabhängig von organischen Kohlenstoffquellen verlief. Offensichtlich waren autotrophe Organismen in der Lage, ihre Energie durch die Oxidation von Sulfid oder Thiosulfat und der Reduktion von Nitrat zu gewinnen. Voraussetzung für die bakterielle Schwefeloxidation ist das gleichzeitige Vorhandensein von geringen Sauerstoff- und Sulfidkonzentrationen in einem schmalen Bereich der mikrooxisch-sulfidischen Grenzschicht (Jannasch et al., 1991). Diese Voraussetzung war in der Chemokline der Gotland See und im Mikrokosmos erfüllt. Die Sulfidkonzentrationen bewegten

sich hier zwischen 1-5 μM H_2S , während sie im Schwarzen Meer im Bereich von $< 15 \mu\text{M}$ H_2S lagen (Murray et al. 1989). Ökologisch bedeutet diese Beobachtung, daß die Denitrifikation an der oxisch-sulfidischen Grenzschicht von der Zufuhr von Kohlenstoff aus der Primärproduktion unabhängig wird aber damit gleichzeitig auf Durchmischungsprozesse an der oxisch-sulfidischen Grenzschicht angewiesen ist (Brettar und Rheinheimer, 1991).

Eine Anreicherung von autotrophen- und heterotrophen schwefeloxidierenden Bakterien wurde auch im mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich des Mikrokosmos gefunden (s. Kap. 3.5). Diese koinzidierten jedoch nicht mit den Abundanzmaxima der heterotrophen Denitrifizierer. Während die Oxidation von Sulfid und Thiosulfat ursprünglich fakultativ heterotrophen schwefeloxidierenden Bakterien zugeschrieben wurde (Tuttle und Jannasch, 1972, 1973 a,b; Kuenen, 1975), lag der Anteil der heterotrophen S-Oxidierer an der Gesamtzahl S-oxidierenden Bakterien im Mikrokosmos unter 15%. Jannasch und Wiersen (1991) fanden obligate autotrophe S-oxidierende Bakterien in der Chemokline des Schwarzen Meeres in Keimzahlen von 10 bis 1000 MPN ml^{-1} . Dies entsprach einem Anteil von 0.57 % an der Gesamtzellzahl. Im Mikrokosmos erreichten die autotrophen S-Oxidierer 0.8% der Gesamtbakterienzahl. Allerdings war dieser Wert im Mikrokosmos mit Sicherheit stark unterschätzt, da die mit dem Gefrierschöpfer durchgeführte Probennahme zu einer Reduktion der Keimfähigkeit um bis zu 85% führte.

Untersuchungen von Millero (1991) in der Chesapeake Bay zeigten, daß die chemische Oxidation von Sulfid in oxisch-sulfidischen Übergangsbereichen quantitativ über die biologische Oxidation dominierte. Generell kann jedoch davon ausgegangen werden, daß ab Zelldichten von 10^4 Zellen ml^{-1} die biologische Oxidation durch S-oxidierende Bakterien mit der chemischen Oxidation konkurrieren kann (Jannasch et al. 1991). Im Mikrokosmos wurden diese Zelldichten fast erreicht. Durch Reduktion des Sauerstoffs bis auf suboxische Werte tragen diese Organismen gleichzeitig zur Stabilisierung oxisch-sulfidischer Grenzschichten in aphotischen Zonen bei (Jannasch et al. 1991). Sichtbar wird dieser Effekt durch die Ausbildung relativ dichter Schichten S-oxidierender Bakterien, die bereits Düggeli (1924, 1934) als dichte "Bakterienplatten" in den oxisch-sulfidischen Grenzschichten eutropher Seen beobachtete. Ähnliche Schichten zeichneten sich im Mikrokosmos durch einen Anstieg der optischen Dichte aus und waren als wenige mm breite Trübungszone (Foto 3) zu erkennen. Diese "Bakterienplatten" hatten ein großes, selbststabilisierendes Potential, so daß auch über mehrere Tage andauernde, leichte Turbulenzen innerhalb weniger Stunden und Tage zu einer Restabilisierung der Trübungszone führten.

Eine Begleiterscheinung der hohen Aktivität S-oxidierender Bakterien war ein Anstieg der Konzentrationen elementaren Schwefels, die oberhalb der oxisch-sulfidischen Grenzschicht im Schwarzen Meer $0.2 \mu\text{M}$ S^0 erreichte (Jørgensen et al. 1991). Im Mikrokosmos wurden sogar Schwefelkonzentrationen von $5 - 9 \mu\text{M}$ S^0 gemessen (Abb. 3.22a).

Für die Struktur- und Funktionsanalyse komplexer Lebensräume darf die Bedeutung von einzelnen ökophysiologischen Bakteriengruppen allerdings nicht überbewertet werden. Keimzahlbestimmungen sind zwar geeignet potentielle Umsatzkapazitäten der Mikroflora abzuschätzen; sie gestatten aber noch keine Rückschlüsse auf die tatsächlichen Bio-Aktivitäten *in situ* (Reichardt, 1978). Wie sich im Folgenden zeigen wird, decken sich ökophysiologische und taxonomische Gruppen vermutlich nur in Ausnahmefällen.

4.3 Struktur und Funktionsanalysen an komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Freiwasser-Chemoklinen

Bis vor wenigen Jahren waren taxonomische Strukturanalysen von natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften nur mit Hilfe von Kultivierungstechniken möglich. Da der größte Anteil der natürlichen Bakterien zur Zeit nicht kultivierbar ist, kann auch kein vollständiges Bild von der Zusammensetzung natürlicher Gemeinschaft erstellt werden (Roszak und Colwell, 1987). Etwa 90-99 % der natürlich vorkommenden Bakterien entziehen sich den traditionellen Kultivierungstechniken (Jannasch und Jones, 1959; Brock, 1987). Da auch in dieser Untersuchung hauptsächlich komplexe, nährstoffreiche Medien für die Isolation saprophytischer Bakterien Verwendung fanden, waren die an nährstoffarme Bedingungen im Meer adaptierten oligocarbophilen Organismen (Overbeck, 1973) einer Charakterisierung nicht zugänglich. Molekularbiologische Techniken eröffnen hier neue Möglichkeiten für die Strukturanalyse von natürlichen Gemeinschaften. Mit Hilfe der DGGE-Technik (Muyzer et al. 1993) wurden in dieser Untersuchung Informationen über die genetische Diversität mikrobieller Gemeinschaften gewonnen.

Die Wassersäule der Gotland See wurde im Sommer 1986 von Höfle und Brettar (1990) in verschiedene mikrobielle Aktivitätszonen unterteilt. Der Bereich von 0-135 m wurde von einer aeroben Mineralisation dominiert, wobei zwischen 35-135 m Tiefe zusätzlich mikrobielle Nitrifikationsprozesse eine bedeutende Rolle spielten. Ab 135 m Tiefe setzte die Denitrifikation ein, die mit zunehmender Tiefe von der Sulfatreduktion abgelöst wurde. Diese Aktivitätszonen wurden vermutlich von charakteristischen bakteriellen Gemeinschaften besiedelt, welche speziell an die vorherrschenden Bedingungen angepaßt waren (Höfle und Brettar, 1990). Die Chemokline des Mikrokosmos wurde anhand ihrer Aktivitätshorizonte und der assoziierten Abundanzverteilungen ökophysiologischer Gruppen in drei Bereiche unterteilt. Der von aeroben, heterotrophen Saprophyten dominierte oxische Bereich wurde an der mikrooersch-sulfidischen Übergangszone von autotrophen und heterotrophen S-Oxidierern abgelöst, während unter sulfidischen Bedingungen heterotrophe Denitrifizierer ein Abundanzmaximum bildeten. Die Abundanzen sulfatreduzierender Bakterien wurden in dieser Arbeit nicht erfaßt.

4.3.1 Beziehungen zwischen ektoenzymatischen Aktivitäten und Veränderungen der taxonomischen Strukturen mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos

Höfle und Brettar (1995) führten in der Chemokline der Gotland See mit Hilfe der 5S rRNA und tRNA-Analyse (LMW-Analyse; low molecular weight-RNA-Analyse) Untersuchungen der taxonomischen Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft durch. Sie fanden lediglich 3-7 genetische Taxa, denen sie verschiedene dominierende stoffwechselaktive Arten zuordneten. Sie definierten die taxonomische Diversität der von ihnen mit der LMW-RNA Analyse untersuchten bakteriellen Gemeinschaft durch die Anzahl der identifizierten genetischen Taxa und deren relativen Abundanzen. Da bei der LMW-RNA Analyse die gesamte RNA der mikrobiellen Gemeinschaft extrahiert wird, ermöglicht diese Methode anhand der Intensität der Bandenfärbung eine Abschätzung der relativen Abundanzen der einzelnen Taxa.

Im Gegensatz zur LMW-RNA Analyse wurde bei der DGGE nur eine kleine Menge bakterieller

DNA aus dem Lebensraum extrahiert, welche anschließend mit der PCR vermehrt wurde. Anhand der extrahierten DNA Menge konnte also keine direkte Abschätzung über die relativen Abundanzen der einzelnen genetischen Taxa vorgenommen werden. Zwart et al. (1995) konnten jedoch in bestimmten Fällen feststellen, daß häufige Bakterien auch intensive Bandenfärbungen im DGGE Gel zeigten. Abundanzabschätzungen der in der Gemeinschaft vorhandenen genetischen Taxa anhand der Intensität der Bandenfärbung im DGGE-Gel sind jedoch mit einem Fragezeichen zu versehen. Eine Intensivierung der Färbung bestimmter Banden schien zumindest in diesen Untersuchungen mit charakteristischen Änderungen der Aktivitäten einiger extrazellulärer Ektoenzyme in Beziehung zu stehen.

Da dem Mikrokosmos während einer 2-3 monatigen Stagnationsperiode kein organisches Material zugesetzt wurde, war die heterotrophe Aktivität sehr niedrig. Entsprechend schwach gefärbte Banden im DGGE-Gel spiegelten die niedrigen Aktivitäten wieder. Wie in der Gotland See (Höfle und Brettar, 1995), so war die Anzahl der mit der DGGE erfaßten Taxa im Mikrokosmos mit insgesamt 3-5 Banden pro Tiefe ebenfalls sehr niedrig, so daß wie mit der LMW-RNA Analyse vermutlich nur dominierende Taxa mit der DGGE erfaßt wurden.

Die im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich beobachteten erhöhten Aktivitäten der extrazellulären Glucosidasen waren mit einer charakteristischen mikrobiellen Gemeinschaft in diesem Bereich assoziiert, die sich in ihrer Struktur deutlich vom oxischen und sulfidischen Bereich abhob. Charakteristische Banden (Bande A und B, Abb. 3.24a) wurden als genetische Taxa bezeichnet, welche mit den Aktivitäten der Glucosidasen in Beziehung zu stehen schienen. Im sulfidischen Bereich schien die Aktivitätssteigerung der Esterasen mit einer Abundanzhöhung der taxonomischen Gruppen der Banden D (Abb. 3.24b) assoziiert zu sein.

4.3.2 Der aktivitätssteigernde Einfluß von Durchmischung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Umstrukturierung mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos

Die im mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos induzierte Durchmischung führte zu einer verstärkten Diffusion und resultierte in einem erhöhten Transport von organischem Material aus dem sulfidischen in den oxischen Bereich des Mikrokosmos. Die Intensität der Turbulenz reichte nicht aus um eine Durchmischung der aeroben und der sulfidischen Gemeinschaften herbeizuführen. Das DGGE-Muster zeigte die unterschiedlichen taxonomischen Strukturen im oxischen, mikrooxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline. Sulfid wurde durch den Kontakt mit Sauerstoff oxidiert, so daß unter sulfidischen Bedingungen unvollständig abgebautes organisches Material für aerobe heterotrophe Bakterien zu Verfügung stand. Im oxischen Bereich reagierten vermutlich insbesondere Opportunisten auf die Zufuhr von organischem Material mit erhöhten Teilungsraten und einem Anstieg der hydrolytischen Aktivitäten. Insgesamt handelte es sich wohl nicht um einen wirklich starken Nährstoffeintrag, der eine starke Dominanz nur weniger Arten bewirkt hätte. Er reichte aber aus um einer neuen Gruppe, welche durch die Bande C repräsentiert wurde, eine Koexistenz neben den Organismen der Banden E zu ermöglichen. Die erhöhte hydrolytische Aktivität dieser Organismen spiegelte sich in einer Intensivierung der Bandenfärbung im DGGE-Gel wieder. Gleichzeitig stand die Intensivierung der Bandenfärbung

der taxonomischen Gruppen der Banden E sowie das Auftreten der Bande C mit der Verschiebung des Aktivitätshorizontes der β -Glucosidase vom mikrooxischen in den oxischen Bereich der Chemokline sowie mit einem Anstieg der Esteraseaktivitäten in Zusammenhang (Abb. 3.26a-b).

Es bestand also eine direkte Beziehung zwischen den auf der Reoxidation sulfidischen Wassers beruhenden Enzyminduktionseffekten und der Aktivierung charakteristischer taxonomischer Gruppen. Über die genaue Zusammensetzung und die Konzentration des organischen Materials, welches durch die Turbulenz aus dem sulfidischen Bereich in die oxischen Tiefen des Mikrokosmos gelangte ist wenig bekannt. Durch den Durchmischungseffekt könnte beispielsweise stickstoffhaltiges organisches Material aus dem mikrooxisch-sulfidischen Bereich in den oxischen Bereich der Chemokline gelangen und hier eine vorhandene Stickstofflimitation aufheben (Schwarz, 1995). Dies könnte ebenfalls zu einer Stimulation der mikrobiellen Aktivitäten beitragen.

Höfle und Brettar (1995) stellten in der Gotland See eine auffällige Gleichheit der taxonomischen Struktur des Bakterioplanktons über die Jahre fest. Sie gingen von einer hohen Strukturstabilität der bakteriellen Gemeinschaft aus. Die Durchmischungsexperimente im Mikrokosmos zeigten, daß leichte Störungen im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereichen auch eine schnelle Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaften und deren Aktivitäten zur Folge haben können.

4.3.3 Der Einfluß von Stagnation auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Umstrukturierung mikrobieller Gemeinschaften des Mikrokosmos

Die taxonomische Struktur der bakteriellen Gemeinschaft, die sich während der Durchmischungsphase im oxischen Bereich neu etabliert hatte, blieb noch etwa 2 Wochen nach Beendigung der Turbulenz unverändert. Da kein weiterer Transport von organischem Material aus dem sulfidischen Bereich erfolgte, wurde die taxonomische Gruppe der Bande C, die vermutlich auf die Zufuhr von organischem Material während der Durchmischungsperiode mit erhöhten Teilungsraten reagierte, wieder zurückgedrängt (Abb.3.28a-b). Am Ende der 30 tägigen Stagnationsperiode war das Bandenmuster und damit die genetische Diversität im oxischen und sulfidischen Bereich aufgrund der fortschreitenden Oligotrophierung wieder stark reduziert. Im mikrooxischen Bereich erfolgte eine Umstrukturierung der Gemeinschaft, indem sich neue taxonomische Gruppen etablierten. Die Bande A war hier charakteristisch für den mikrooxischen Bereich. Diese Gruppe trat nur in diesem Bereich auf und blieb von der durchmischungsbedingten Zufuhr mit organischem Material weitgehend unbeeinflusst, so daß die Vermutung nahe liegt, daß es sich um eine Gruppe autotropher Organismen handeln könnte. Während der Restabilisierungsperiode bildeten vermutlich viele Bakterien im oxischen Bereich aufgrund der ausbleibenden durchmischungsbedingten Nährstoffversorgung Ruhestadien aus. Bakterien umgeben sich unter nährstofflimitierten Bedingungen zum Teil mit einer Schicht aus Exopolysacchariden (Wrangstadh et al., 1989, 1990). Solche Zellen können unter Umständen während der DNA-Extraktion nicht quantitativ lysiert werden. Teilungsaktive Zellen sind einfacher lysierbar, da sie keine derartigen Schutzhüllen ausbilden. Daher werden mit der DGGE vermutlich hauptsächlich aktive und abundanzmäßig dominierende Zellen erfaßt (Smalla et al., 1995). Mit

metabolischen Anpassungsvorgängen in Zusammenhang stehende taxonomische Umstrukturierungen der Gemeinschaft können so mit Hilfe der DGGE detektiert werden. Der mikrooxische Bereich zeichnete sich während der Restabilisierungsperiode durch eine Erhöhung der Abundanzen aktiver Zellen aus, was durch eine intensivere Färbung des Bandenmusters angezeigt wurde. Gleichzeitig erhöhte sich die Anzahl der Banden von 5 auf 7. Das Ergebnis war eine Umstrukturierung der Gemeinschaft, die sich in einer erhöhten genetischen Diversität widerspiegelte. Höfle und Brettar (1995) beobachteten in der Chemokline der Gotland See einen Anstieg der genetischen Diversität bei gleichzeitig erhöhten Turnoverraten von radioaktiv markierter Glucose und Acetat. Hohe Turnoverraten sind ein Indiz für eine vorausgegangene hohe mikrobielle Produktivität, die in einer erniedrigten Substratkonzentration, also erhöhten Turnoverraten mündet. Diese Interpretation unterstützt Theorien von Margalef (1979) zur Diversität in mikrobiellen Gemeinschaften. Er geht von einer starken inversen Beziehung zwischen der Diversität und der Produktivität einer Gemeinschaft aus. Diese ist besonders ausgeprägt, sobald die Bedingungen im Lebensraum ein schnelles mikrobielles Wachstum ermöglichen. Man sollte daher vermuten, daß die genetische Diversität unter Bedingungen mit zunehmender Nährstofflimitierung ansteigt (Fomey et al., 1995).

4.3.4 Der Einfluß von Eutrophierung auf die ektoenzymatischen Aktivitäten und die Dominanzverschiebungen in einer mikrobiellen Gemeinschaft des Mikrokosmos

Mit der Zugabe eines Algenextraktes in die Chemokline des Mikrokosmos wurde die eutrophierende Wirkung von komplexem organischem Material auf die mikrobielle Gemeinschaft einer Chemokline untersucht. Obwohl das organische Material in seiner Zusammensetzung nicht dem natürlichen Material in der Chemokline der Gotland See entsprach, vermittelte der durch die Substratzugabe hervorgerufene Wechsel von einer nährstoffarmen auf eine nährstoffreiche Trophiestufe einen Eindruck von der Spannweite mikrobieller Aktivitätspotentiale. Gleichzeitig spiegelte sich dieser Wechsel in einer radikalen genetischen Umstrukturierung der mikrobiellen Gemeinschaft wider.

Im natürlichen Lebensraum ist das sedimentierende partikuläre organische Material einer sukzessiven Mineralisation unterworfen. Dies führt in den absinkenden Aggregaten letztendlich zu einem Anstieg des C/N-Verhältnisses (Martin et al. 1987, Smith et al. 1992). In 130m Tiefe bestehen die Aggregate im wesentlichen aus refraktärem Material, so daß in der Chemokline der Gotland See vermutlich andere Enzyme induziert werden als unter den eutrophen Bedingungen des Mikrokosmos nach der Extraktzugabe. Anders sieht es jedoch zur Zeit der Frühjahrsblüte aus. Nach dem Zusammenbruch der Phytoplanktonblüte erreicht das sedimentierende Material aufgrund der geringen Wassertiefe der Ostsee innerhalb von wenigen Tagen das Sediment. Der pelagische Abbau ist diesem Fall unerheblich, so daß frisches, stickstoffhaltiges Material bis zum Sediment gelangen kann (Bodungen und Zeitschel, 1995). Im Mikrokosmos war der Anstieg der extrazellulären Glucosidasen als Reaktion auf die plötzliche Verfügbarkeit von organischen Poly- und Olyomeren des Algenextraktes vergleichbar mit hohen Aktivitäten der β -Glucosidasen wie sie im eutrophen Plußsee von Chrost und Overbeck (1990) nach dem Zusammenbruch einer Phytoplanktonblüte festgestellt wurden. Während das organische Material aus dem sulfidischen

Bereich des Mikrokosmos nach der Durchmischung eine Aktivitätserhöhung der Esterasen hervorrief, hatte der Algenextrakt im oxischen Bereich der Chemokline offensichtlich keine induktive Wirkung auf die Synthese von Esterasen.

Die bakterielle Gemeinschaft reagierte erst zwei Tage nach der Zugabe des Algenmaterials mit einer Umstrukturierung. Berman et al. (1994) stellten bei Hungerstadien von Bakterien aus der Kieler Bucht erst nach 24 Stunden signifikante Biomasseanstiege als Reaktionen auf Zugaben von radioaktiv markiertem Leucin und Thymidin fest. Offensicht war die an niedrige Nährstoffbedingungen adaptierte Gemeinschaft nicht in der Lage auf das allochthone Material schnell mit erhöhten Zellteilungen zu reagieren.

Die taxonomischen Gruppen der Banden E, die sich während der Durchmischungsperiode im Mikrokosmos hatten etablieren können, wurden besonders im oxischen Bereich der Chemokline vollkommen zurückgedrängt und durch eine einzige taxonomische Gruppe (Bande F) verdrängt (s. Kap. 3.6.4). Die durch die Banden E repräsentierten Organismen reagierten zwar auf die Zufuhr von organischem Material aus dem sulfidischen Bereich mit erhöhten Teilungsraten, sie waren aber nicht wie die Organismen der Bande F an hohe Nährstoffkonzentrationen adaptiert. Hier handelte es sich vermutlich um eine Gruppe omnipotenter Opportunisten die sowohl im oxischen als auch im anoxischen Bereich der Chemokline präsent waren und auf die Zugabe des Algenextraktes mit hohen Teilungsraten reagierten.

Vergleichbare Dominanzverschiebungen zugunsten eines einzigen Organismus wurden auch von Höfle (1992) und Rehnstam et al. (1993) während einer Blütensituationen festgestellt. Eine niedrige Diversität wird nach Margalef (1979) durch eine hohe mikrobielle Produktivität reflektiert.

Wie bereits gezeigt, zeichnete sich der mikrooxisch-sulfidische Übergangsbereich durch erhöhte Abundanzen autotropher und heterotropher schwefeloxidierender Bakterien aus. Soweit es sich hier um obligate schwefeloxidierende Bakterien handelte waren diese Organismen unabhängig von externen Kohlenstoffquellen, so daß keine drastische Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaft nach der Substratzugabe zu erwarten war. Da aber auch aerobe heterotrophe Saprophyten sowie heterotrophe schwefeloxidierende Bakterien im mikrooxischen Bereich nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, daß diese Organismen auf die zusätzliche Kohlenstoffquelle mit einem Anstieg ihrer Teilungsraten reagierten. Im marinen Milieu scheint die biologische Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen ohnehin weitgehend von fakultativ autotrophen Bakterien dominiert zu werden (Tuttle und Jannasch, 1972). Im mikrooxischen Bereich deutete das erhöhte ektoenzymatische Potential nach der Substratzugabe, sowie das Auftauchen neuer Banden in diesem Bereich, auf eine hydrolytisch aktive aerobe heterotrophe und/oder eine fakultativ autotrophe Bakteriengemeinschaft.

Das gleichzeitige Auftauchen der Bande F im oxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline nach der Zugabe des Algenextraktes war möglicherweise auf den omnipotenten Charakter dieser taxonomischen Gruppe zurückzuführen (Abb. 3.29, Abb. 3.31). Sie ist ein Beispiel für eine Organismengruppe aus dem mikrooxisch-sulfidischen Grenzbereich die in der Lage ist, unter variierenden Redoxbedingungen eine dominante Rolle zu übernehmen.

Auch sulfatreduzierende Bakterien können zu taxonomischen Ähnlichkeiten in oxischen und sulfidischen Bereichen der Chemokline beitragen. Ihre Fähigkeit, sowohl aerob als auch anerob

zu wachsen ist mittlerweile gut dokumentiert (Jørgensen und Bak, 1991; Fründ und Cohen, 1992; Marschall et al., 1993). So konnten Muyzer et al. (1993) mit Hilfe der DGGE in aerob gewachsenen Biofilmen sulfatreduzierende Bakterien nachweisen. Einen weiteren wichtigen Hinweis für den omnipotenten Charakter sowie die ubiquitäre Verbreitung besonders von zymogenen marinen Bakterien (Rheinheimer, 1991) beruht auf der Tatsache, daß *Shewanella putrefaciens* als dominierender heterotropher Saprophyt der Chemokline der Gotland See (Brettar und Höfle, 1993) auch im oxischen, mikrooxischen und sulfidischen Bereich des Mikrokosmos nach Zugabe eines Algenextraktes als keimfähige Population vorlag.

4.3.5 Die taxonomische Diversität und die mikrobiellen Aktivitäten bakterieller Gemeinschaften in der reoxidierten Chemokline der südlichen Gotland See

Der 1994 erfolgte Einstrom dichten, sauerstoffreichen Nordseewassers hatte im Bereich der ehemaligen Chemokline der Gotland See eine Reoxidation des sulfidischen Bodenwassers zur Folge. Mit der Oxidation des sulfidischen Wassers war auch die hemmende Wirkung des Sulfids auf die zellulären Hydrolyse- und Aufnahmemechanismen beseitigt. Besonders aerobe heterotrophe Saprophyten reagierten auf die plötzliche Verfügbarkeit von unvollständig abgebautem organischem Material aus dem ehemals sulfidischen Bereich mit relativ erhöhten Keimzahlen. Hohe Keimzahlen der Saprophyten spiegelten sich im Bereich der reoxidierten Chemokline der Gotland See in den relativ erhöhten Hydrolyseraten der Aminopeptidase, der α -Glucosidasen, sowie den erhöhten Umsatzraten radioaktiv markierter Monomere (C^{14} -Glucose und H^3 -Leucin) wider. Die erhöhten mikrobiellen Aktivitäten des Tiefenbereiches von 115-125 m gingen aber auch gleichzeitig mit einem Anstieg der genetischen Diversität einer Tiefenbereiche mit hohen autotrophen und heterotrophen Umsatzraten, wie sie auch von anderen Autoren gefunden wurden (Gocke, 1989; Rheinheimer et al., 1989; Brettar, 1991a), zeigten in der Chemokline der Gotland See 1994 eine höhere Diversität als Bereiche mit niedrigem Turnover von organischen Monomeren. Nach Höfle und Brettar (1995) ermöglichte eine hohe Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff möglicherweise einem breiteren Spektrum von stoffwechselphysiologischen Bakterien ein Wachstum.

Die Wirkung von organischem Material aus reoxidiertem, ehemals sulfidischem Tiefenwasser auf die ektoenzymatische Aktivität und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft wurde bereits im Mikrokosmos während einer Durchmischungsphase demonstriert. Besonders die Aktivität der β -Glucosidase wurde im oxischen Bereich der Chemokline durch das zusätzlich verfügbare Material erhöht. In der Gotland See 1994 wirkte die Reoxidierung über den gesamten Tiefenbereich der ehemaligen Chemokline stimulierend und hatte hier einen Anstieg der maximalen Hydrolysegeschwindigkeit der β -Glucosidase zur Folge. Die taxonomischen Gruppen K, J und L (Abb. 3.38, Bande K, J und L) schienen z.B. mit dieser Aktivitätssteigerung assoziiert zu sein.

4.3.6 Die Hydrolyseraten der β -Glucosidase in Beziehung mit charakteristischen Veränderungen der taxonomischen Struktur in der reoxidierten Chemokline der südlichen Gotland See

Overbeck (1973) korrelierte Ergebnisse aus Aufnahmekinetiken von C^{14} -Glucose mit einem konkreten Bild vom Ökosystem Plußsee. Er erhielt durch den kinetischen Formalismus Hinweise auf die Anzahl der mikrobiellen Kompartimente im Ökosystem. Die Kombination aus DGGE-Analyse und der Erfassung der extrazellulären Enzymkinetik geht einen Schritt weiter, indem sie die Beziehung zwischen der biochemischen Funktion und der taxonomischen Struktur direkt sichtbar macht. Die Erfassung extrazellulärer Enzymaktivitäten über Enzym-Substrat-Kinetiken ist allerdings bei großem Probenumfang und Messungen in herkömmlichen Spektralfluorimetern (Kontron SFM-25) mit hohem Material- und Zeitaufwand verbunden. In Routineprogrammen wird deshalb vielfach bei Substratsättigung ausschließlich die maximale Hydrolysegeschwindigkeit (H_{max} = hydrolytisches Potential) bestimmt. Auf die Erfassung von Hydrolyseraten und K_t+K_n -Werten wird oft verzichtet. Substrat- und konzentrationsabhängige Wechselwirkungen können dabei unter Umständen nicht erkannt werden, da die Bestimmungen bei z.T. unrealistisch hohen Substratkonzentrationen erfolgen. Die Turnoverraten (T_r) und die Hydrolyseraten (H_r) sind dagegen direkt abhängig von der Substratkonzentration und der mikrobiellen Aktivität (Hoppe et al., 1988). Damit werden Veränderungen der taxonomischen Struktur in Abhängigkeit von wechselnden Substratkonzentrationen deutlicher. Ein weiteres Problem bei dem direkten Vergleich zwischen charakteristischen Strukturveränderungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft und den möglicherweise assoziierten Enzymaktivitäten liegt in der vermutlich großen Unspezifität einiger Ektoenzyme (Fiksdal et al. 1989) gegenüber den angebotenen Modellsubstraten begründet. Umso bemerkenswerter ist die in dieser Untersuchung beobachtete gute Koinzidenz zwischen Strukturveränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft und charakteristischen Aktivitätsänderungen der β -Glucosidasen. Eine Ursache liegt vermutlich in der geringen Diversität der β -Glucosidasen begründet. So fanden Rath und Herndl (1994) bei dem Abbau von amorphen pelagischen Aggregaten eine sehr eingeschränkte Anzahl von Isoenzymen der β -Glucosidase. Es wurde ein Enzym identifiziert, welches 70% der Aktivität der β -Glucosidase repräsentierte. Möglicherweise produzieren gruppenspezifische Bakterien große Mengen eines Isoenzym der β -Glucosidase und dominieren damit den Zelluloseabbau (Rath und Herndl, 1994). In der reoxidierten Chemokline der Gotland See konnte 1994 über die Hydrolyserate (H_r) der β -Glucosidase eine direkte Beziehung zwischen der Konzentration β -glycosidisch verknüpfter Kohlenhydrate und der Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft hergestellt werden (s. Kap. 3.7). Bereits in der stabilen Chemokline 1993 deutete die enge Beziehung zwischen den Hydrolyseraten der β -Glucosidase und den Gesamtbakterienzahlen auf eine direkte Kopplung zwischen der hydrolytischen Aktivität und der Aufnahme von β -glycosidischen Monomeren in die Bakterienzelle. Die erhöhte Zellzahl in Verbindung mit einer hohen Hydrolyserate, gleichbedeutend mit einer erniedrigten Substratkonzentration, deutete auf einen schnellen Transfer von organischen β -glycosidisch verknüpften Verbindungen in die Bakterienzelle.

In der reoxidierten ehemaligen Chemokline der Gotland See 1994 reagierte die mikrobielle

Gemeinschaft auf das verfügbare organische Material mit einem Anstieg der Zelldichten. Die prozentuale Änderung der Gesamtbakterienzahlen koinzidierte über den Tiefenbereich von 80 - 130 m gut mit den Hydrolyseraten der β -Glucosidase ($r = 0.8$). Gleichzeitig standen aber beide Variablen in einer engen Beziehung zur genetischen Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft. Ein Regressionskoeffizient von $r = 0.95$ (für Hr-Werte $\geq 0.1 \text{ \%d}^{-1}$) zwischen den Hydrolyseraten der β -Glucosidase und der Anzahl der Banden im DGGE-Gel demonstriert die konzentrationsabhängige Kopplung zwischen β -glycosidisch verknüpften Verbindungen und charakteristischen Organismengruppen. Um solche Organismen könnte es sich bei den taxonomischen Gruppen der Banden L handeln (Abb. 3.41), die ausschließlich in Tiefenbereichen mit erhöhten Hydrolyseraten der β -Glucosidase sowie in Bereichen mit erhöhten Abundanzänderungen der Bakterien zu finden waren.

In Bereichen, wo durch die Reoxidation sulfidischen Wassers leicht abbaubare Proteine (Fenchel und Blackburn, 1979) oder Kohlenhydrate für die mikrobielle Gemeinschaft verfügbar wurden, reagierten bevorzugt Opportunisten auf den bereitgestellten organischen Kohlenstoff. In der reoxidierten Chemokline der Gotland See bildeten aerobe heterotrophe Saprophyten in 120 m Tiefe ein Maximum welches mit erhöhten Hydrolyseraten von α -Glucosidasen und Aminopeptidasen, sowie mit den korrespondierenden Turnoverraten von C^{14} -Glucose und H^3 -Leucin zusammenfiel. Da sich in diesen Bereichen Organismen mit hohen Teilungsraten durchsetzen konnten, war hier die taxonomische Diversität relativ erniedrigt. Dies zeigte sich 1994 in der Gotland See, wo sich die Abundanzen aerober heterotropher Saprophyten umgekehrt proportional zur Anzahl der Banden im DGGE-Gel und damit umgekehrt proportional zur genetischen Diversität verhielten.

4.5 Der Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität mikrobieller Gemeinschaften und von Einzelorganismen

Da Chemoklinen im Freiwasser sehr variabel in ihrer vertikalen Ausdehnung sein können, sind mikrobielle Gemeinschaften in derartigen Habitaten zwangsläufig wechselnden Sauerstoff- und Sulfidverhältnissen ausgesetzt (Rheinheimer et al. 1989). Wie wir gesehen haben, führen diese Veränderungen im Lebensraum zu drastischen Umstellungen der taxonomischen Struktur bakterieller Gemeinschaften und ihrer biochemischen Aktivitäten (Donner et al. 1995). In der Chesapeake Bay wurden u.a. tiden- und sturminduzierte interne Wellen für die Reoxidation sulfidischer Wasserschichten verantwortlich gemacht (Sleigh, 1987). In der Ostsee führte der horizontale Eintrag von sauerstoffreichem Nordseewasser in die anoxischen Becken der Gotland See, wie er 1994 erfolgte, in der Chemokline einen Wechsel von sulfidischen zu oxischen Verhältnissen herbei. Im kleineren Maßstab unterstützen derartige Durchmischungsprozesse eine H_2S getriebene Denitrifikation (Brettar und Rheinheimer, 1991). Wie demonstriert wurde, bewirken Durchmischungsprozesse aber andererseits auch einen Transport von unvollständig abgebautem organischem Material aus dem sulfidischen Bereich in den oxischen Bereich der Chemokline und regen hier aerobe Bakterien zu erhöhten Teilungsraten an. Gleichzeitig kann die Sedimentation von organischem Material aus der Primärproduktion im Bereich der Chemokline zu einem saisonalem Anstieg der H_2S -Konzentration führen und eine heterotrophe Denitrifikation

unterstützen (Hattori, 1983). Diese vielfältigen Einflüsse von Sulfid auf die mikrobiellen Gemeinschaften können unter 2 Gesichtspunkten betrachtet werden:

1. Effekte die auftreten, sobald oxisch adaptierte Gemeinschaften mit sulfidischem Wasser in Kontakt kommen;
2. Wenn sulfidisch adaptierte Gemeinschaften oxischen Bedingungen ausgesetzt werden (Hoppe et al., 1990).

Der Gradostat ermöglichte die Untersuchung dieser Durchmischungseffekte unter kontrollierten Bedingungen (Lovitt und Wimpenny, 1981; Wimpenny, 1989; Wimpenny und Abdollahi, 1991).

4.5.1 Der stimulierende Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität mikrobieller Gemeinschaften der Gotland See

Während des Gradostatenexperimentes in der Gotland See 1992 wurden mikrobielle Gemeinschaften aus dem oxischen Bereich der Chemokline mit Gemeinschaften aus dem sulfidischen Bereich unterhalb der Chemokline durchmischt. Bei einer hohen Durchmischungsrate von $D = 1.7 \text{ d}^{-1}$ wurde vorausgesetzt, daß im Gradostaten die chemische Oxidation von Sulfid die biologische Oxidation dominierte. Die kontrollierte Durchmischung von sulfidischem und oxischem Wasser bewirkte die Oxidation von Sulfid. Der hemmende Einfluß des Sulfids auf die zellulären Hydrolyse- und Aufnahmemechanismen war damit beseitigt und das unter sulfidischen Bedingungen angereicherte und unvollständig abgebaute organische Material stand den bakteriellen Gemeinschaften zur Verfügung. Im Gefäß 3 des Gradostaten entsprach die Sauerstoff-Sulfidkonzentration den Bedingungen im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich der Chemokline der Gotland See. Im Gradostaten reagierte die mikrobielle Gemeinschaft wie im natürlichen System auf diesen Effekt mit einem relativen Anstieg der Gesamtbakterienzahlen (s. Kap. 3.8). Bei den unvollständig abgebauten organischen Substanzen, welche durch Einmischung in den oxischen Bereich der Chemokline transportiert wurden, handelte es sich im Vergleich mit komplexen Algenextrakten oder einer sedimentierenden Phytoplanktonblüte um autochthones Material. Die bakteriellen Gemeinschaften waren daher relativ gut an dieses Material adaptiert, so daß sie schnell mit einer vermehrten Zellteilung reagieren konnten. Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen von Berman et al. (1994), daß nährstofflimitierte Bakterien erst nach 24 Stunden auf die Zufuhr von allochthonem organischem Material zunächst mit einem Anstieg der Zellbiomasse reagieren.

Im Mikrokosmos war ein Anstieg der bakteriellen Zellbiomassen als Reaktion auf die Erniedrigung der Sauerstoffkonzentrationen im mikrooxisch-sulfidischen Übergangsbereich zu beobachten. Im Gradostaten reagierte die mikrobielle Gemeinschaft aus der Gotland See beim Wechsel von mikrooxischen zu sulfidischen Bedingungen ebenfalls mit einem schnellen Anstieg der zellulären Biomassen. Die Bakterien waren in der Lage, innerhalb kürzester Zeit auf die wechselnden Sauerstoff-Sulfidverhältnisse im Gradostaten mit einer Umstellung ihres Stoffwechsels zu reagieren. Das Gradostatenexperiment bestätigte die Beobachtungen in der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See indem es die aktivitätssteigernde Wirkung der Durchmischungsprozesse in oxisch-sulfidischen Übergangsbereichen unterstrich. Brettar und Rheinheimer (1991) wiesen auf mikrobielle Gemeinschaften in diesem Bereich hin, deren H_2S

getriebene Denitrifikation sehr schnell auf die Durchmischungsprozesse reagierte. Gleichzeitig konnten Brettar und Rheinheimer (1991) im oxisch-sulfidischen Grenzbereich der Gotland See eine Erniedrigung des C/N-Verhältnisses feststellen und mit einer erhöhten chemoautotrophen Produktion sowie steigenden Biomassen in Einklang bringen. Ein Anstieg der zellulären Biomassen ließ auch im Gradostaten unter mikrooxisch-sulfidischen Bedingungen einen vergleichbaren Effekt vermuten.

Besonders aerobe heterotrophe Saprophyten reagierten auf das Fehlen der Sulfidhemmung und das aus dem sulfidischen Bereich des Gradostaten zugeführte organische Material mit einem Anstieg ihrer Teilungsaktivität (Rheinheimer et al., 1989). Als sogenannte Opportunisten sind diese Organismen auf relativ hohe Substratkonzentrationen angewiesen (Jannasch, 1974). Die anaeroben heterotrophen Saprophyten waren dagegen nicht in der Lage auf die zusätzliche Kohlenstoffquelle mit einer vermehrten Zellteilung zu reagieren, da ihr Stoffwechsel noch an sulfidische Bedingungen adaptiert war. Sie waren daher gegenüber den aerob adaptierten Bakterien im Nachteil. Wie bereits in der Chemokline des Mikrokosmos für die β -Glucosidasen gezeigt, so war die höchste spezifische Aktivität der α -Glucosidasen im mikrooxischen Bereich des Gradostaten mit der Aktivität der aeroben Bakterien assoziiert.

Im Meerwasser ist die Anreicherung von extrem copiotrophen Bakterien auf TCBS-Agar (Kobayashi, 1963; Colwell, 1984) offensichtlich an hohe Konzentrationen von gelöstem organischem Material gebunden (Donner und Reichardt, 1991). Diese Voraussetzungen sind für gewöhnlich im offenen Meer nicht zu finden. Aus dem Tiefenwasser der Gotland See konnten daher auch keine keimfähigen Zellen auf TCBS-Agar angereichert werden. Im Gradosten führte die Durchmischung von oxischem und sulfidischem Wasser zu einem ständigen Kontakt von aerob adaptierten Bakterien mit H_2S . Das Sulfid kann als Zellgift einen physiologischen Schock auslösen, der zur Zelllyse führt (Martinez und Azam, 1993). Das lysierte Zellmaterial könnte copiotrophen Bakterien als Substrat dienen und ihre relative Anreicherung bewirken.

Anreicherungsexperimente in Batch-Kulturen konnten zeigen, daß die als extrem copiotrophe Bakterien bekannten Vibrios unter anoxischen Bedingungen schneller ihr Abundanzmaximum erreichten als unter oxischen Bedingungen (Donner und Reichardt, 1991). Ihre Fähigkeit, schnell zwischen aerob heterotrophen und fermentativem Stoffwechsel umschalten zu können, (Kobayashi, 1963; Colwell, 1984) begünstigt möglicherweise ihre Anreicherung unter den wechselnden Sauerstoff-Sulfidverhältnissen des Gradostaten. Die gute Koinzidenz zwischen dem zellulären Biomasseanstieg, als Indiz für einen metabolischen Umstellungsprozess und den auf TCBS-Agar erfaßten Keimzahlen deutet unter wechselnden oxisch-sulfidischen Bedingungen auch auf eine mögliche Beteiligung copiotropher Organismen bei der Verwertung von organischem Material in Chemoklinen. Um einen solchen Organismus könnte es sich auch bei *Shewanella putrefaciens* handeln (Brettar und Höfle, 1993).

4.5.2 Der stimulierende Einfluß von Durchmischung oxisch-sulfidischer Wasserkörper auf die Aktivität von *Shewanella putrefaciens*

Shewanella putrefaciens wurde von Brettar und Höfle (1993) als häufigster kultivierbarer Denitrifizierer im oxisch-anoxischen Übergangsbereich der Gotland See identifiziert. Als Opportunist ist *S. putrefaciens* in der Lage auf eine plötzliche Verfügbarkeit von organischem Material mit einer erhöhten Teilungsaktivität zu reagieren (Brettar und Höfle, 1993) und sowohl aerob heterotroph als auch anaerob heterotroph zu wachsen. Neben Sauerstoff können auch Nitrat (Nealson et al. 1991) und eine Vielzahl anderer Elektronenakzeptoren genutzt werden (Myers und Nealson, 1988). Aufgrund dieser Eigenschaften könnte *S. putrefaciens* sowohl im anoxisch-sulfidischen Bereich, als auch unter suboxisch-anoxischen Bedingungen eine heterotrophe Denitrifikation betreiben. Damit käme diesem Organismus eine bedeutende Rolle bei der Oxidation von organischem Material in Freiwasser-Chemoklinen zu.

Organisches Material, welches unter den sulfidischen Bedingungen nur verlangsamt abgebaut werden konnte (Rheinheimer, 1991), wurde durch den Durchmischungsprozess im Gradostaten in den suboxischen Bereich transportiert. Hier induzierte möglicherweise proteinhaltiges Material die Synthese von Aminopeptidasen. Dies äußerte sich in einem Anstieg der zellspezifischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Aminopeptidasen. *S. putrefaciens* reagierte auf das organische Material unter oxischen Bedingungen mit einer vermehrten Zellteilung. Steigende maximale Hydrolysegeschwindigkeiten der Leucinaminopeptidasen beobachtete auch Chrost (1991) in Süßwasserseen am Ende der Frühlings- und Sommerphytoplanktonblüte. Leucinaminopeptidasen wurden verstärkt produziert, sobald die Proteinkonzentrationen im Wasser signifikant anstiegen, was auf eine Enzyminduktion hinwies (Chrost, 1991)

Wie bereits im Gradostatenexperiment mit bakteriellen Gemeinschaften aus der Gotland See demonstriert wurde, stieg die Aktivität der Ektoenzyme sofort nach der Oxidation des Sulfids und der Aufhebung der Sulfidhemmung wieder an. Der gekoppelte Verlauf zwischen der Hydrolyserate der Aminopeptidasen und der Turnoverrate von H^3 -Leucin demonstrierte diesen Effekt, indem beide Variablen im sulfidfreien Bereich des Gradostaten ein gemeinsames Maximum bildeten (s. Kap. 3.9). Hohe Hydrolyse- und Turnoverraten deuteten hier auf einen erhöhten bakteriellen Umsatz gelöster Aminosäuren. In vergleichbarer Weise reagierte auch die spezifische maximale Hydrolysegeschwindigkeit der α -Glucosidase auf das plötzliche Fehlen der Sulfidhemmung mit einem Anstieg der Werte. Einen vollkommen entgegengesetzten Verlauf zeigte dagegen die spezifische maximale Hydrolysegeschwindigkeit der β -Glucosidase. Obwohl eine Hemmung der ektoenzymatischen Aktivitäten im sulfidischen Bereich zu erwarten ist (Hoppe et al., 1990), stieg die spezifische Aktivität der β -Glucosidase von *S. putrefaciens* nach einem Minimum im anoxischen Bereich unter sulfidischen Bedingungen sogar noch an.

Ein vergleichbarer Verlauf der Hydrolyseraten sowie der maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der β -Glucosidase wurde im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich der Chemokline der Gotland See und im Mikrokosmos beobachtet.

Auch während des Gradostatenexperimentes mit Mischpopulationen aus der Gotland See zeigten hier allerdings die α -Glucosidasen nach einer Erniedrigung im anoxisch-sulfidischen Bereich unter sulfidischen Bedingungen wieder einen leichten Anstieg.

Die Fähigkeit von *S. putrefaciens* unter anoxischen Bedingungen eine anaerobe Denitrifikation betreiben zu können (Nealson et al. 1991), erklärt möglicherweise den Anstieg der spezifischen Aktivität der β -Glucosidase sowie der Esterasen unter sulfidischen Bedingungen. Die unter anoxischen Bedingungen hydrolytisch freigesetzten Carboxylsäuren und Glucosemonomere wurden möglicherweise für die anaerobe heterotrophe Denitrifikation genutzt. Gleichzeitig wurden diese Substrate durch den Durchmischungsprozess in suboxische Bereiche transportiert. Unter Verwendung alternativer Elektronenakzeptoren könnte *S. putrefaciens* diese Substrate weiter verwerten. Für eine relative Anreicherung von Glucosemonomeren unter sulfidischen Bedingungen des Gradostaten spricht der Verlauf der Hydrolyserate der β -Glucosidase sowie der Turnoverrate von C^{14} -Glucose. Der gekoppelte Verlauf beider Variablen endete in einem Bereich mit hohen Sulfidkonzentrationen ($300 \mu\text{M}$). Hier wurde die Turnoverrate stark gehemmt, während die Hydrolyserate weiter anstieg. Eine Folge dieser Entkopplung wäre eine relative Anreicherung von Glucosemonomeren im sulfidischen Bereich des Gradostaten, wie er in dieser Untersuchung und in Studien von Schwarz (1995) bereits für den Mikrokosmos und die Gotland See postuliert wurde. Die Untersuchungen im Gradostaten bestätigten das breite Aktivitätsspektrum von *S. putrefaciens* in oxisch-sulfidischen Gradienten und spiegelten den omnipotenten Charakter dieses Organismus wider.

4.6 Die Bedeutung kultivierbarer Organismen in der Chemokline des Mikrokosmos

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Brettar (1993) konnte *S. putrefaciens* während der Expedition 1993 nicht aus der Chemokline der Gotland See isoliert werden. Dieser Organismus schien besonders nach dem Zusammenbruch und der Sedimentation von Algenblüten von dem erhöhten Angebot an organischem Material profitieren zu können. Im April 1993 war der Probennahme allerdings keine Phytoplanktonblüte vorausgegangen, so daß keine keimfähigen Populationen von *S. putrefaciens* vorlagen. Aus der Chemokline des Mikrokosmos wurden als gramnegative heterotrophe Saprophyten hauptsächlich Pseudomonaden auf ZoBell-Agar isoliert. Goering (1985) und Tiedje (1988) identifizierten Pseudomonaden als dominierende Denitrifizierer, so daß diese Organismen während des Untersuchungszeitraumes möglicherweise die Rolle von *S. putrefaciens* als dominierende Denitrifizierer im Mikrokosmos und in der Gotland See besetzt haben könnten.

Erst nach Zugabe von gelöstem organischem Material in Form eines Algenextraktes wurde *S. putrefaciens* in nennenswerten Keimzahlen auf TCBS-Agar in der Chemokline des Mikrokosmos angereichert. Da *S. putrefaciens* als einziger Organismus aus dem Mikrokosmos auf TCBS-Agar Kolonien bildete entstand der Eindruck, daß sich in diesem Fall die ökophysiologische Gruppe mit der Funktion in der Chemokline deckte. Der Verlauf der *Shewanella*-Keimzahlen in guter Koinzidenz mit den maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten der Esterasen unterstützte diese Annahme. Der Anstieg der Keimzahlen im mikrooxisch-anoxischen Bereich schien ebenfalls zu bestätigen, daß *S. putrefaciens* möglicherweise eine Schlüsselstellung in der Chemokline besetzen könnte. Die DGGE-Analyse zeigte jedoch, daß nach der Zugabe von organischem Material weder *S. putrefaciens* noch ein anderer während dieser Untersuchung isolierter Saprophyt in der Chemokline des Mikrokosmos eine dominierende Rolle spielte. Stattdessen trat

nach der Substratzugabe die taxonomische Gruppe der Bande F (s. Kap. 3.6.4, Abb.3.29 und 3.31) auf. Diese Gruppe repräsentierte im oxischen und anoxischen Bereich des Mikrokosmos einen unbekanntem, nicht auf Zobell-Medium isolierten Organismus. Dieser dominierte etwa zwei Tage nach der Substratzugabe die mikrobielle Gemeinschaft des oxischen und sulfidischen Bereiches der Chemokline.

Langsam wachsende, sog. *autochthone* Bakterien, zeichnen sich unter Nährstofflimitation durch ein hohes kompetitives Potential aus, während *zymogene* Bakterien bei hohen Nährstoffkonzentrationen höchste Wachstumsraten zeigen. Die Übertragung dieses Konzeptes aus der terrestrischen Bakteriologie (Fenchel und Blackburn, 1979), würde die taxonomische Gruppe der Bande F den *zymogenen* Bakterien zuordnen.

In einem vergleichbaren Mesokosmos-Experiment mit einer natürlichen mikrobiellen Süßwasser-Gemeinschaft beobachtete Höfle (1992) ebenfalls zwei Tage nach Zugabe eines Kulturmediums einen Rückgang der taxonomischen Diversität. Es dominierte nur noch ein einziger Organismus, der anhand der 5S rRNA-Sequenz als *Aeromonas hydrophila* charakterisiert wurde (Der copiotrophe Organismus *A. hydrophila* wird heute unter der Gattung *Vibrio* als *V. proteolyticus* geführt).

4.7 Die Identifizierung von Isolaten aus der Chemokline des Mikrokosmos

Bei den Organismen, die aus der Chemokline des Mikrokosmos isoliert und als *S. putrefaciens* und *Pseudomonas sp.* charakterisiert wurden, handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um sehr nahe verwandte Arten. So wurde *S. putrefaciens* in früheren Untersuchungen auch als *Alteromonas putrefaciens* (= *Pseudomonas putrefaciens*) beschrieben (Mac Donell und Colwell, 1985) Der Organismus *S. putrefaciens* wurde von anderen Autoren durch numerisch taxonomische Analysen als *Pseudomonas spp.* eingestuft (Brettar und Höfle, 1993). Auch die DGGE-Analyse ermöglichte mit der verwendeten Primerkombination keine Auftrennung von *Pseudomonas sp.* und *S. putrefaciens*. Die Analysen der Membran-Fettsäuremuster ergab jedoch eine eindeutigere Trennung in zwei Gattungen.

Aber auch die Charakterisierung nahe verwandter Arten anhand des Membran-Fettsäuremusters ist mit Vorsicht zu betrachten. Bei der Fettsäureanalyse wirken sich die Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Salzgehalt, Nährmedium) sehr stark auf die Zusammensetzung des Fettsäuremusters der zu charakterisierenden Organismen aus. Geringe Abweichungen von den standardisierten Kultivierungsbedingungen können daher schon zu einer Fehlbestimmung führen (Thiemann, B., IfM-Kiel, pers. Mittlg.).

Mit Sicherheit handelte es sich jedoch bei dem Typenstamm *Shewanella putrefaciens* (DSM-Nr. 6067) und dem isolierten Wildtyp *Shewanella putrefaciens* um die gleiche Art. Dies zeigten die Übereinstimmungen zwischen den biochemischen Charakterisierungen mit dem API-System 20E (Austin und Lee, 1992) in Kombination mit den Analysen der Membran-Fettsäuremuster. Obwohl das API-System 20NE laut Hersteller (Fa. bioMerieux) für die Charakterisierung von *S. putrefaciens* geeignet ist, konnten weder der Typenstamm noch der Wildtyp eindeutig bestimmt werden.

4.8 Grampositive Bakterien in der Chemokline des Mikrokosmos

Die Wasserkörper in der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See waren in ihrem hydrographischen Ursprung vollkommen verschieden. Trotzdem wurden anhand vergleichbarer mikrobieller Aktivitätsmuster funktionelle Analogien zwischen beiden Systemen aufgezeigt. Obwohl die Chemokline des Mikrokosmos mit Wasser aus der Kieler Förde aufgebaut wurde, wirkte in der Chemokline des Mikrokosmos ein vergleichbarer Selektionsdruck wie in der Chemokline der Gotland See. So war der Organismus *Shewanella putrefaciens* sowohl in Chemokline der Gotland See als auch in der Chemokline des Mikrokosmos präsent, wo er jedoch keine dominierende Rolle spielte.

Trotz der beobachteten Analogien zwischen der Gotland See und dem Mikrokosmos wies der hohe Anteil isolierter grampositiver Bakterien im Mikrokosmos auf deutliche Unterschiede in der taxonomischen Struktur in beiden Systemen hin. Etwa 95% der marinen Bakterien werden als gramnegativ angesehen (ZoBell, 1946). Böden und Sedimente enthalten meist wesentlich höhere Anteile grampositiver Bakterien (Reichardt, 1978), so daß anzunehmen ist, daß sie in Küstennähe über Entwässerungssysteme oder durch Aufwirbelungen der Sedimente in die Wassersäule transportiert werden können. Dies würde den hohen Anteil grampositiver Isolate im Mikrokosmos erklären. Über die relativen Abundanzen und Überlebensraten grampositiver Bakterien in marinen Lebensräumen ist jedoch kaum etwas bekannt (Jensen and Fenical, 1995). Die DGGE-Analysen zeigten jedoch, daß sie in der Chemokline des Mikrokosmos, wie die kultivierbaren gramnegativen Saprophyten, *in situ* vermutlich eine untergeordnete Rolle spielten. Jensen und Fenical (1995) wiesen allerdings darauf hin, daß die Bedeutung grampositiver Bakterien in marinen Lebensräumen vermutlich unterschätzt wird. Ihre Ergebnisse zeigten, daß grampositive Bakterien in küstennahen tropischen Gewässern einen hohen Anteil (25-31%) der mit Algenoberflächen und Sedimenten assoziierten, Kolonien bildenden heterotrophen Bakterien stellten. Mehr als 80% der von ihnen getesteten grampositiven Isolate benötigten Seewasser zum Wachstum und repräsentierten obligate marine Bakterien. Da viele gramnegative Kokken kein Seewasser oder Natriumchlorid zum Wachstum benötigen, werden außerdem viele Isolate aus dem marinen Bereich fälschlicherweise als terrestrische Kontaminanten bezeichnet, ohne daß ihre ökologische Bedeutung im Meer näher untersucht wurde (Jensen und Fenical, 1995). Vor diesem Hintergrund ist nicht notwendigerweise davon auszugehen, daß es sich bei den grampositiven Isolaten um terrestrische Kontaminanten handelt, welche durch den Landabfluß über die Kieler Förde in den Mikrokosmos gelangen konnten. Es ist wahrscheinlicher, daß sie aus dem Sediment stammten.

4.9 Schlußbetrachtungen und Ausblick

In der Anfangsphase dieser Untersuchung stand die Analyse heterotropher mikrobieller Aktivitäten in oxisch-anoxischen Übergangsbereichen von Freiwasser-Chemoklinen im Vordergrund. Da mikrobielle Aktivitäten unter natürlichen Bedingungen einem sukzessiven Wandel unterworfen sind wurde schnell deutlich, daß mehrwöchige *in situ* Prozesstudien erforderlich, in der Praxis aber undurchführbar waren. Als Problemlösung boten sich Untersuchungen im Mikrokosmos an. Eine zentrale Aufgabe war daher die Entwicklung eines

Mikrokosmossystemen, mit dem Freiwasser-Chemokline im verkleinerten Maßstab nachgebildet werden konnten. Es konnte gezeigt werden, daß sich heterotrophe Abbauleistungen sowohl im Mikrokosmos als auch in der Chemokline der Gotland See in mikrobiellen Summenparametern widerspiegeln, die allgemein als Ausdruck bakterieller *in situ*-Aktivitäten interpretiert werden. Die Sauerstoff- und Sulfidregimes der Chemokline üben auf die Physiologie der komplexen Lebensgemeinschaften einen Selektionsdruck aus, der sich in tiefenspezifischen Aktivitätspotentialen niederschlug. Diese Selektionsbedingungen waren anscheinend charakteristisch für das System der Chemokline und wurden sowohl im Mikrokosmos als auch in der Gotland See wiedergefunden. Damit konnte der Mikrokosmos als miniaturisiertes Abbild einer natürlichen Chemokline verifiziert werden.

In einem nächsten Schritt wurden die Aktivitätsprofile in den Chemokline mit charakteristischen taxonomischen Gruppen und Strukturen in Beziehung gesetzt. Die Verknüpfung von Funktions- und Strukturanalyse in Kombination mit einem Mikrokosmosansatz sollte ein neues Fenster für die Beurteilung von dynamischen Prozessen in oxisch-anoxischen Übergangsbereichen öffnen. Die hypothetischen Beziehungen zwischen ektoenzymatischen Aktivitäten und taxonomischen Strukturen der mikrobiellen Gemeinschaften von Chemokline können schematisch in vier Szenarien (Abb. 4.1-1, 2, 3, 4) dargestellt werden.

1: Eine stabile Schichtung sowie eine langanhaltende Unterversorgung mit sedimentierendem Phytoplanktonmaterial führt in der Wassersäule zu oligotrophen Bedingungen. Im oxischen Bereich der Chemokline dominiert die taxonomische Gruppe E (Abb. 4.1-1), welche durch Diffusionsprozesse mit organischem Material aus der chemoautotrophen Produktion im mikrooxischen Bereich versorgt wird. Der mikrooxische Bereich ist sehr schmal und wird durch selbsterhaltende Mechanismen stabilisiert. Dichte Bakterien-schichten wirken wie im oxisch-sulfidischen Grenzbereich von Sedimenten als Diffusionsperren (Jørgensen und Fenchel, 1974). In diesem Bereich kann die heterotrophe Gemeinschaft der taxonomischen Gruppen B und G (Abb. 4.1-1) auf niedrigem Niveau aufrecht erhalten werden, welche durch die autotrophe Produktion der taxonomischen Gruppe A versorgt wird.

2: Durchmischung und Turbulenz (Abb. 4.1-2) führt zu einem Transport von unvollständig abgebautem organischem Material in die oxischen und mikrooxischen Bereiche der Chemokline. Die mikrooxische Zone wird breiter oder teilweise aufgelöst. Im oxischen Bereich reagieren die Opportunisten (s.S. 66, Abb. 3.26) der taxonomischen Gruppe C und auch die Gruppe E auf das organische Material mit der vermehrten Synthese von extrazellulären β -Glucosidasen und auch Esterasen. Der Eintrag von Sauerstoff in den sulfidischen Bereich stimuliert auch hier die Aktivität der Esterasen. Im mikrooxischen Bereich reagieren auch die heterotrophen Gruppen B und G auf das organische Material mit einer Aktivitätssteigerung.

3: Nach Beendigung der Durchmischung restabliert sich die mikrooxische Zone erneut (Abb. 4.1-3). Im oxischen Bereich dominiert nach der erneuten Oligotrophierung wiederum die Gruppe E. Im mikrooxischen Bereich ist die Substratlimitierung aufgrund der autotrophen Produktion verlangsamt. Aber auch hier kommt es zu einer fortschreitenden Erniedrigung der Konzentration β -glycosidischer Verbindungen. Gleichzeitig ist aber auch ein Anstieg der genetischen Diversität (Abb. 4.1-3, neue Gruppen) zu beobachten, wie er bereits in der Chemokline der Gotland See 1994 festgestellt werden konnte. Mit fortschreitender Substratlimitierung wird vermutlich einem

breiteren Spektrum physiologischer Spezialisten eine Koexistenz ermöglicht.

4: Mit der Zugabe eines Algenextraktes in den Mikrokosmos gelangt allochthones Material in die Chemokline, wie es nach der Sedimentation einer Phytoplanktonblüte zu erwarten wäre (Abb. 4.1-4). An hohe Substratkonzentrationen adaptierte Bakterien der Gruppe F dominieren im oxischen und sulfidischen Bereich der Chemokline und verdrängen alle übrigen taxonomischen Gruppen. Sie reagieren im oxischen Bereich mit einer vermehrten Synthese von Gucosidasen und unter sulfidischen Bedingungen mit einer gesteigerten Produktion von Esterasen. Im mikrooxischen Bereich kann sich die Gruppe F nicht etablieren. Hier dominiert weiterhin die an mikrooxische Bedingungen adaptierte heterotrophe Gruppe G.

Das dargestellte hypothetische Szenario weist einerseits auf die Potentiale der angewendeten Methodenkombination und gleichzeitig auf deren Schwäche hin. Das Potential liegt in der Möglichkeit mikrobielle Aktivitätsuntersuchungen und populationsdynamische Studien gleichzeitig und unabhängig von Kultivierungstechniken zu betreiben. Einzelne Banden, die mit charakteristischen biochemischen Signalen assoziiert zu sein scheinen, können aus dem Gel herausgelöst und sequenziert werden. Auf diese Weise können art- oder gruppenspezifischen Sonden konstruiert werden, die auf "Schlüsselorganismen" ausgerichtet sind. Das Auffinden von "Indikatorarten", könnte auch im Zusammenhang mit der zunehmenden Ausbreitung von anoxischen Zonen im Oberflächenbereich von Wattensedimenten von Interesse sein. Im Wattenmeer ist das vorerst fleckenweise "Umkippen" von oberflächlichen Sedimentbereichen ein chronisches Warnsignal geworden und zeigt einen Zustand fortgeschrittener Belastung an (Höpner und Michaelis, 1994). Die relativ einfache Durchführung der DGGE-Technik in Kombination mit der halbautomatisierten Erfassung extrazellulärer Enzymkinetiken in Mikrotiterplatten scheint angesichts der Warnsignale aus dem Wattenmeer ein adäquater Ansatz zu sein, um beispielsweise Bestandteil eines Monitorings zu werden.

Zur Zeit ist die Interpretation der DGGE-Gele allerdings noch mit einigen Unsicherheiten behaftet. Da es sich hier um eine noch nicht etablierte Methode handelt, werden ihre Vorteile und Mängel noch einige Zeit kontrovers diskutiert werden.

Diese Untersuchung mußte sich auf das Aufzeigen möglicher Beziehungen zwischen charakteristischen Strukturveränderungen und bestimmten heterotrophen Aktivitäten im Tiefenprofil der Chemoklinen beschränken. Zwar wurden einige auffällige Aktivitätsmuster mit einigen dominierenden Bakteriengruppen in Beziehung gesetzt, einfache kausale Beziehungen waren aber auch hier nicht direkt nachzuweisen. Einen Schritt in diese Richtung gelang Waver und Muyzer (1995), indem sie nicht nur generell Eubakterien nachwiesen, sondern auch Trennungen von gruppenspezifischen Sequenzabschnitten im DGGE-Gel vornahmen. Ihnen gelang es, durch Amplifikation von mRNA-Abschnitten direkt auf die Anwesenheit und die Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien zu schließen.

Diese Untersuchung konnte nur einen kleinen Beitrag zur Klärung der drei grundlegenden Fragen der Ökologie der Mikroorganismen leisten, die Aman (1996) als Fragen nach dem "Wer ist wo", "Was tut er da gerade" und " Was könnte er mal machen" formulierte. Eine ganz befriedigende Antwort auf diese Fragen kann auch hier nicht gegeben werden. Bis dieses ehrgeizige Ziel greifbar wird muß daher noch viel methodische Entwicklungsarbeit geleistet werden (Aman, 1996).

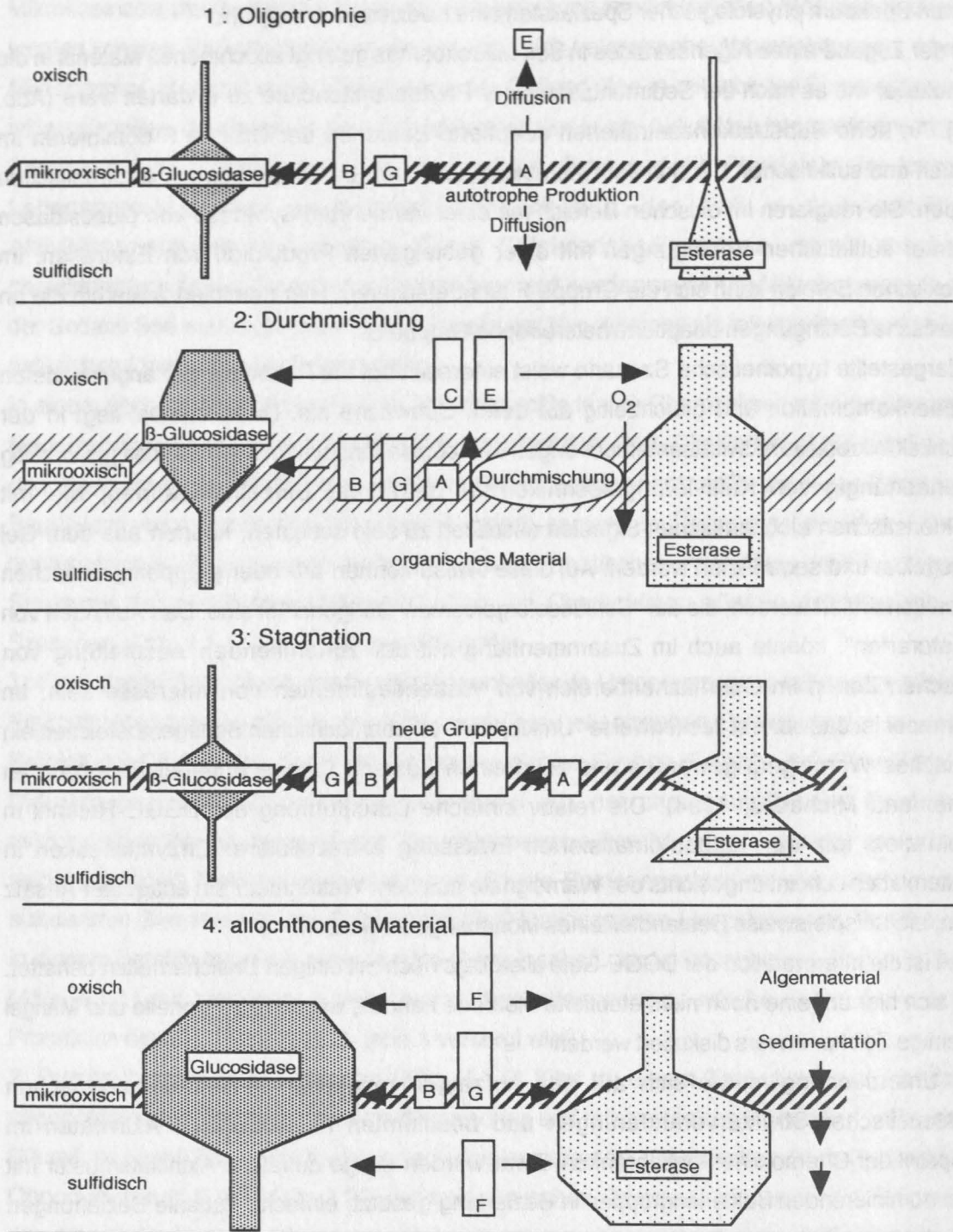


Abb. 4.1: Vereinfachte Darstellung der Verteilungsmuster von ektoenzymatischen Aktivitäten und den Dominanzverschiebungen am Beispiel der in der Chemokline des Mikrokosmos gefundenen taxonomischen Gruppen **A**, **B**, **C**, **E**, **F**, **G**, unter dem Einfluß von

1: Oligotrophie, 2: Durchmischung, 3: Stagnation, 4: Zufuhr von allochthonem Material.

: Die Breite der Flaschen symbolisiert die relativen Aktivitäten der extrazellulären Glucosidasen

: " " " " " " relativen Aktivitäten der extrazellulären Esterasen

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befaßte sich mit der Aufklärung von **Struktur- und Funktionsbeziehungen mikrobieller Gemeinschaften in Chemoklinen (O₂-H₂S Gradienten) im Wasser.**

Neben **in situ Untersuchungen im Gotland Tief** (zentrale Ostsee) wurde ein **Mikrokosmos** als Laborsystem entwickelt und eingesetzt, mit dem natürliche Chemoklinen im verkleinerten Maßstab nachgebildet werden konnten.

Der Mikrokosmos diente gleichzeitig als experimentelle Einheit, um Neuentwicklungen aus dem biotechnologischen Bereich für ökologische Fragestellungen zu nutzen. Zunächst wurden verschiedene Methoden (**Neu- und Weiterentwicklungen**) auf ihre Eignung für die Untersuchungen im Mikrokosmos geprüft.

Mit Hilfe eines weiterentwickelten **Gefrierschöpfers** wurde durch schockartiges Einfrieren kleiner Wassermengen eine kleinskalige Auflösung im oxisch-sulfidischen Übergangsbereich erreicht.

Der Einsatz einer **lichtleitergestützten Sauerstoffsonde** ermöglichte eine kontinuierliche und anströmungsfreie Sauerstoffmessung im oxisch-mikrooxischen Bereich des Mikrokosmos. Die Lichtleitertechnik wurde auch eingesetzt, um ein neues Messprinzip zur Erfassung von **ektoenzymatischen in situ Aktivitäten** in Form eines Prototypen zu entwickeln und zu erproben.

Strukturelle und funktionelle Beziehungen wurden in mikrobiellen Gemeinschaften nachgewiesen, indem die mit einem halbautomatisierten Mikrotiterplattensystem erfaßten **ektoenzymatischen Aktivitäten** mit charakteristischen DNA-Mustern in einem Gradientengel (**DGGE**) verglichen wurden.

Charakteristische mikrobielle Aktivitäten waren auf definierte Tiefenbereiche in den Chemoklinen konzentriert. Während sich die Aktivitätshorizonte in der **Gotland See** über einen Bereich von mehreren Metern erstreckten, waren sie im **Mikrokosmos** auf einen Bereich von wenigen Zentimetern beschränkt.

Gesteigerte mikrobielle Aktivitäten, wie sie vielfach in **oxisch-sulfidischen** Übergangsbereichen beobachtet werden, spiegelten sich in der Chemokline des Mikrokosmos und der Gotland See in erhöhten zellulären **Biomassen** (17-20 fgC Zelle⁻¹) und **Zelldichten** (1.2-1.7 10⁶ Zellen ml⁻¹) wider. Besonders in den **oxischen Bereichen** der Chemokline standen erhöhte extrazelluläre **Glucosidaseaktivitäten mit erhöhten Keimzahlen** aerober heterotropher Saprophyten in Beziehung. Unter **sulfidischen Bedingungen** wurden dagegen gesteigerte **peptidolytische Aktivitäten** in Zusammenhang mit einer erhöhten **Biomasse- und Bakterienproduktion**, die sich vor allem in erhöhten Abundanzen **heterotropher Denitrifizierer** niederschlugen, festgestellt.

Das hohe selbststabilisierende Potential der oxisch-sulfidischen Grenzschicht gegenüber mechanischen Störungen wurde mit der Aktivität **autotropher und heterotropher schwefeloxidierender Bakterien**, die im mikrooxischen Bereich eine Diffusionsbarriere in Form einer dichten Matte (Trübungszone) bildeten, in Zusammenhang gebracht.

Mögliche **Anreicherungen von unvollständig hydrolysierten Kohlenhydraten** wurden im sulfidischen Bereich der Chemokline auf die **toxische Wirkung des Sulfids** und der daraus

resultierenden **Entkopplung** der hydrolytischen Aktivitäten der **Glucosidasen** von den **zellulären Aufnahmemechanismen** zurückgeführt. Die ebenfalls im **sulfidischen Bereich** erhöhten Aktivitäten extrazellulärer **Esterasen** beruhten vermutlich auf der Aktivität fermentierender Bakterien. Außerdem standen sie mit großer Wahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit den unter anoxischen Bedingungen verlangsamt ablaufenden heterotrophen Abbauleistungen. Diese resultierten in den sulfidischen Bereichen der Wassersäule in den von verschiedenen Autoren gefundenen erhöhten Konzentrationen gelöster Carboxylsäuren.

Über **Durchmischungsvorgänge** gelangte dieses angereicherte organische Material in den **oxischen Bereich der Wassersäule** und verursachte hier eine **Stimulation** heterotropher Aktivitäten. Gleichzeitig resultierte die durchmischungsbedingte Zufuhr von organischem Material in einer **Verschiebung der taxonomischen Strukturen und der genetischen Diversitäten**. Mit Hilfe von **DGGE-Analysen** waren **qualitative und halbquantitative Aussagen über Veränderungen der genetischen Diversitäten in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften** möglich. Diese Veränderungen äußerten sich in charakteristischen Bandenmuster des DGGE-Gels und wurden als Umstrukturierungen in der Artenzusammensetzung interpretiert. **Individuelle Banden wurden dabei einzelnen taxonomischen Gruppen zugeordnet**.

Eine experimentell herbeigeführte **Eutrophierung** resultierte in der Chemokline des Mikrokosmos in einer extremen **Reduzierung der genetischen Diversität**, sowie in einem starken **Anstieg der heterotrophen Aktivitäten**. Gleichzeitig wurde eine selektive Anreicherung von ***Shewanella putrefaciens*** beobachtet dessen Keimzahländerungen mit den Aktivitäten der extrazellulären Esterasen koinzidierte. Diesem Organismus wird eine **bedeutende Rolle im Kohlenstoff-Stickstoffkreislauf** der Chemokline der Gotland See zugeschrieben. Die Tatsache, daß *S. putrefaciens* aus dem Mikrokosmos isoliert werden konnte, spricht einerseits für die **ubiquitäre Verbreitung** vieler mariner Bakterien und ist andererseits ein Indiz für die naturnahen Selektionsbedingungen in der Chemokline des Mikrokosmos. **Im Gradostatenexperiment** demonstrierte *S. putrefaciens* seinen **omnipotenten Charakter**, indem er sowohl unter oxischen, anoxischen als auch sulfidischen Bedingungen extrazelluläre Enzyme synthetisierte. Die DGGE-Analysen zeigten jedoch, daß dieser Organismus im Mikrokosmos nicht für die erhöhten ektoenzymatischen Aktivitäten verantwortlich sein konnte. Mit der DGGE gelang eine Trennung zwischen ökophysiologischen Gruppen und biochemischen Aktivitäten im Lebensraum.

Insgesamt konnten mit der **DGGE im Mikrokosmos und in der Gotland See bis zu 10 Banden** im Gel getrennt werden, die verschiedenen taxonomischen Gruppen zugeordnet wurden. Dieser Befund stand in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Höfle und Brettar (1995), die mit Hilfe von 5S RNA-Analysen in der Gotland See durchgeführt wurden.

Durch einen 1994 erfolgten **Einstrom sauerstoffreichen Nordseewassers** in das Tiefenwasser der Gotland See kam es zu einer Reoxidierung im Bereich der Chemokline. Der damit in Zusammenhang stehende **Anstieg der mikrobiellen Aktivitäten** im sulfidfreien Bereich der ehemaligen Chemokline stand in Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen, die im **Mikrokosmos und in Gradostatenexperimenten** durchgeführt wurden.

Koinzidenz zwischen den **Hydrolyseraten der extrazellulären β -Glucosidasen** und den **genetischen Diversitäten** im Tiefenprofil der reoxidierten Chemokline der Gotland See deuteten auf eine **enge Beziehung zwischen β -glycosidisch verknüpften Verbindungen und der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft hin**. **Substratlimitierungen** ermöglichten anscheinend einer größeren Anzahl von Bakteriengruppen mit hohen Substrataffinitäten eine **Koexistenz**, während **hohe Substratkonzentrationen** eine Dominanz weniger **Opportunisten** mit niedrigen Substrataffinitäten zur Folge hatten. Darauf wiesen auch die erhöhten **Saprophytenzahlen** bei gleichzeitig erniedrigter genetischer Diversität in der Gotland See 1994 hin.

Die hier vorgestellten Untersuchungen können zu einem besseren Verständnis von biogeochemischen und populationsdynamischen Prozessen beitragen, wie sie bei möglichen Veränderungen der Sauerstoffzufuhr, bzw. der hydrographisch bedingten Durchlüftung des Tiefenwassers in der Ostsee zu erwarten wären.

6 LITERATUR

- Alexander, M. (1961). *Introduction to Soil Microbiology*. New York, Wiley and Sons.
- Aman, R., (1996). *In situ*-Identifizierung von Mikroorganismen mit rRNS-gerichteten Oligonukleotiden. *Biospektrum*. **1**: 27-31
- Anders, K.-D. (1991). Entwicklung und Einsatz optischer Chemo- und Biosensoren zur Prozeßkontrolle in der Biotechnologie. Dissertation. Universität Hannover.
- Anders, K.-D. and Wehnert, G. Thordsen, O., Scheper, T. (1993). Biotechnological applications of fiber-optic sensing: multiple uses of a fiber-optic fluorimeter. *Sen.Act.* **2**: 395-403.
- Andersin, A.-B. and Sandler, H. (1988). Occurrence of hydrogen sulfide and low oxygen concentrations in the Baltic Deep Basins. *16 th CBO Proceedings* **1**: 102 - 108.
- Austin, B. L. and Lee, J.V. (1992). Aeromonadaceae and Vibrionaceae. In: Board, R.G, Jones, D., Skinner, F.A. (eds.) *Identification methods in applied and environmental microbiology*. Blackwell Scientific Publications.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.-A., Thingstad, F.T. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **10**: 257 - 263.
- Azam, F., Smith, D.C., Steward, G.F., Hagström, Å. (1993). Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.* **28**: 167-179.
- Backhaus, H. (1995). Approaches to fingerprinting of microbial communities by separating ribosomal sequences with temperature gradient electrophoresis. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Bansemir, K. and Rheinheimer, G. (1974). Bakteriologische Untersuchungen über die Bildung von Schwefelwasserstoff in einer Vertiefung der inneren Kieler Förde. *Kieler Meeresforschung*. **30**: 91-98.
- Berman, T., Nawrocki, M., Taylor, G.T., Karl, D.M. (1987). Nutrient Flux between bacteria, bacterivorous nanoplanktonic protists and algae. *Mar. Microb. Food Webs* **2**(2): 69-82
- Berman, T., Hoppe, H.G., Gocke, K. (1994). Response of aquatic bacterial populations to substrate enrichment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**: 173-184
- Billen, G. (1991). Protein degradation in aquatic environments. In: Chrost, R.J. (ed.) *Microbial*

enzymes in aquatic environments. New York, Springer Verlag. 123-143.

Bjørnsen, P. K. (1986). Bacterioplankton growth yield in continuous seawater cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **30**: 91-196.

Bodungen, B. von, Zeitschel, B. (1995). Die Ostsee als Ökosystem. In: Rheinheimer, G. (ed.) *Meereskunde der Ostsee*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. 230-244.

Bölter, M. and Rheinheimer, G. (1987). Numerical analysis of microbial and chemical characters and of saprophytic bacteria from the Baltic Sea. *Bot. Mar.* **30**: 535-544

Brettar, I. (1991a). Denitrification in the water column of the central Baltic. Regulatory factors and microbiological aspects. *Ber. Inst. Meereskd. Christian Albrechts Univ. Kiel.* **208**:145

Brettar, I. and Rheinheimer, G. (1991b). Denitrification in the Central Baltic: Evidence for H₂S-oxidation as motor of denitrification at the oxic-anoxic interface. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**: 2-3.

Brettar, I. and Höfle, M. (1993). Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: abundance and molecular identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **94**: 253 - 265.

Brock, T. D. (1987). The study of microorganisms *in situ*: progress and problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **41**: 1-17.

Chan, C. W. and Suzuki, J. (1993). Quantitative extraction and determination of elemental sulfur and stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1166-1168.

Chrost, R. J. (1981). The composition and bacterial utilization of DOC released by phytoplankton. *KielerMeeresforsch.* **5**: 325-332.

Chrost, R. J. (1989). Characterization and significance of β -glucosidase activity in lake water. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 660-672.

Chrost, R. J. (1990). Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: Overbeck, J., Chrost, R.J. (eds.) *Aquatic microbial ecology. Biochemical and molecular approaches*. New York, Springer. 47-78.

Chrost, R. J. and Overbeck, J. (1990). Substrate-ectoenzyme interaction: significance of β -glucosidase activity for glucose metabolism by aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **34**: 93-98.

- Chrost, R. J. (1991). *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York, Springer Verlag.
- Cole, J. J., Pace, M. L., Caraco, N.F., Steinhart, G.S. (1993). Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: more and larger cells in anoxic waters. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 1627-1632.
- Colwell, R. R. (1984). *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons, USA.
- Daatselaar, M. C. C. and Harder, W. (1974). Some aspects of the regulation of the production of extracellular proteolytic enzymes by a marine bacterium. *Arch. Hydrobiol.* **101**: 21-34.
- Daley, R. J. and Hobbie, J.E. (1975). Direct count of aquatic bacteria by a modified epifluorescent technique. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 875-881.
- Deuser, W.G. (1971). Organic-carbon budget of the Black Sea. *Deep. Sea. Res.* **18**: 995-1004.
- Don, R. H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic. Acids. Res.* **19**: 4008.
- Donner, G. and Reichardt, W. (1991). Phytoplankton: bacterial relationship and incidence of vibrios in brackish coastal waters. *KielerMeeresforsch.* **8**: 278-283.
- Donner, G., Schwarz, K., Hoppe, H.-G., Muyzer, G. (1995accepted). Profiling The Succession Of Bacterial Populations In Pelagic Chemoclines. *Archives of Hydrobiologie* :
- Donough, R. J. M., Sanders, R.W., Porter, K.G., Kirchman, D.L., (1986). Depth distribution of bacterial production in a stratified lake with an anoxic hypolimnion. *App. Environ. Microbiol.* **52** (5): 992 - 1000.
- Düggeli, M. (1924). Bakteriologische Untersuchungen am Ritomsee. *Zeitschrift für Hydrobiologie* **2**: 65-206.
- Düggeli, M. (1934). Bakteriologische Studien am Wasser des Rotsees. *Zeitschrift für Hydrobiologie* **6**: 216-440.
- Engelen, B., Heuer, H., Felske, A., Nübel, U., Backhaus, H. (1995). Application of TGGE to investigate microbial soil communities. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Felske, A., Engelen, B., Nübel, U., Backhaus, H. (1995). Isolation of intact ribosomal RNA from soil. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische

Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,

Fenchel, T. and Blackburn, T. (1979). Bacteria and mineral cycling. *Academic Press* : 225.

Fenchel, T., Kristensen, L.D., Rasmussen, L. (1990). Water column anoxia: vertical zonation of protozoa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **62**: 1 - 10.

Ferris, M. J., Muyzer, G., Ward, D. M. (1995). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified 16S rRNA gene fragments: Detection of bacterial populations in a thermal spring microbial mat. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,

Ferris, M., Muyzer, G., Ward, D. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environm. Microbiol.* **62** (2): 340-346

Fiksdal, L., Pommepuy, M., Derrien, A., Cormier, M. (1989). Production of 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase by *Escherichia coli* exposed to seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2424-2427.

Fischer, S. G. and Lerman, L.S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* . **16**: 191-200.

Fomey, L., Dunbar, J., Zlatkin, I. (1995). Genetic diversity of microbial populations from soils and deep subsurface sediments. Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,

Fründ, C. and Cohen, Y. (1992). Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. *App. Environ. Microbiol.* **58**(1): 70 - 77.

Galvao, H. M. (1990). Die Rolle der Nanoflagellaten im Nahrungsnetz eines Brackwassergebietes (Westliche Ostsee). *Ber. Inst. Meereskd. Christian Albrechts Univ. Kiel.* **201**: 95

Gast, V. and Gocke, K. (1988). Vertical distribution of number, biomass and size spectrum of bacteria in relation to oxic/anoxic conditions in the Central Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **45**: 179 - 186.

Gerlach, S. A. (1988). Stirbt die Ostsee? Schadstoffe und Nährstoffe in der Ostsee und die Veränderungen der Lebensbedingungen in den letzten vierzig Jahren. *Der Mathematisch und Naturwissenschaftliche Unterricht.* **41** (5), 262-276.

- Gerlach, S. A. (1995). Eutrophierung. In: Rheinheimer, G. (ed.) Meereskunde der Ostsee. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. 275-282
- Giesenhausen, H. C. (1994). Bericht des IfM zum biologischen Monitoring in der Ostsee für das Jahr 1994. 70-108.
- Giesenhausen, H. C. (1996). Bakterielle Aktivität im Pelagial des Untersuchungsgebietes Boknis Eck: ein Vergleich zwischen Deckschicht und bodennaher Wasserschicht. Dissertation. Universität Kiel.
- Gocke, K. (1977). Comparison of methods for determining the turnover times of dissolved organic compounds. *Mar. Biol.* **42**: 131 - 141.
- Gocke, K. (1989). Bakterielle Stoffaufnahme im aeroben und anaeroben Milieu der Ostsee. *Ber. Inst. Meereskd. Christian Albrechts Univ. Kiel.* **188**: 40 - 47.
- Gocke, K. (1995). Mikrobielle Stoffumsetzungen. In: Rheinheimer, G. (ed.) Meereskunde der Ostsee. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. 123-130
- Goering, J. J. (1985). Marine denitrification. Denitrification in the nitrogen cycle. New York, Plenum Press. 192-224.
- Goss, W. A. and Cook, T.M. (1974). Nalidixic acid - Mode of action. Antibiotics. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. 174.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (1983). Methods of Seawater Analysis. Deerfield Beach, Florida, Basel, Weinheim, Verlag Chemie.
- Hattori, A. (1983). Denitrifikation an dissimilatory nitrate reduction. In: Carpenter, E.J., (eds.) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, New York. 31-63
- Hengstmann, U. and Liesack, W. (1995). Excision of main 16S rDNA bands from complex denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) pattern for further analysis - a bias related problem ? Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Hobbie, J. E., Daley, R.J., Jasper, S. (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *App. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.
- Höfle, M. G. (1988). Taxonomic structure of bacterial communities in mixed cultures as measured by low molecular weight RNA profiles. *Arch. Hydrobiol.* **31**: 71-77.

- Höfle, M. G. and I. Brettar (1990a). Correlation between microbial activity and taxonomic structure in the water column of the Central Baltic. *Proceedings Of The Fourth International Workshop On The Measurement Of Microbial Activities In The Carbon Cycle In Aquatic Ecosystems. Straskrabova* : 237.
- Höfle, M. G. (1990b). RNA chemotaxonomy of bacterial isolates and natural microbial communities. Aquatic microbial ecology. Biochemical and molecular approaches. New York, Springer. 129-159.
- Höfle, M. G. (1992). Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3387-3394.
- Höfle, M. G. and Brettar, I. (1995). Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the central Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* **40**(5): 868-874.
- Höpner, T. H. and Michaelis, H. (1994). Sogenannte "schwarze Flecken" - ein Eutrophierungssymptom des Wattenmeeres. In: Lozan, J.L., Racher, E., Reise, K., Westernhagen, v.H., Lenz, W. (eds.) Warnsignale aus dem Wattenmeer. Berlin, Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Hoppe, H.-G. (1993). Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (eea) measurement of bacteria. In: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (eds.) Aquatic Microbial Ecology. Boca Raton, Lewis Publishers. 423 - 431.
- Hoppe, H.-G. (1991). Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: Chrost, R.J. (ed.) Microbial enzymes in aquatic environments. New York, Springer Verlag. 60-83.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 299 - 308.
- Hoppe, H. G., Kim, S.J., Gocke, K. (1988). Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake. *App. Environ. Microb.* **54**(3): 784 - 790.
- Hoppe, H.-G., Gocke, K., Kuparinen, J. (1990). Effects of H₂S on heterotrophic substrate uptake, extracellular enzyme activity and growth of brackish water bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **64**: 157 - 167.
- Imhoff, J. F. (1988). Anoxygenic phototrophic bacteria. In: Austin, B. (ed.) Methods in aquatic

- bacteriology. Wiley, Chichester. 207-240.
- Imhoff, J. F., Schneider, A., Podgorsek, L. (1995). Correlation of viable counts, metabolic activity of sulphur-oxidizing bacteria and chemical parameters of marine sediments. *Helgoländer Meeresunters.* **49**: 223-236.
- Jannasch, H. W. and Jones, G.E. (1959). Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* **4**: 128-139.
- Jannasch, H. W. (1974). Steady state and the chemostat in ecology. *Comment. Limnology and Oceanography* . **19**: 716-720.
- Jannasch, H. W., Wirsen, C.O., Molyneaux, S.J. (1991). Chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Black Sea. *Deep-Sea Res.* **38**(2): S1105-S1120.
- Jensen, P. R. and Fenical, W. (1995). The relative abundance and seawater requirements of grampositive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microb. Ecol.* **29**: 249-257.
- Jørgensen, B. B. and Fenchel, T. (1974). The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Mar. Biol.* **24**: 189-201.
- Jørgensen, B. B. (1983). Processes at the sediment - water interface. In: Bolin, B., Cook, R. (eds.) *The Major Biogeochemical Cycles and their Interactions*. New York, John Wiley & Sohns. 21, ed. 477 - 509.
- Jørgensen, B. B. and Revsbech, N. P. (1989). Oxygen uptake, bacterial distribution, and carbon-nitrogen-sulfur cycling in sediments from the Baltic Sea-North Sea transition. *Ophelia* **31**(1): 29-49.
- Jørgensen, B. B. and Bak, F. (1991). Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegatt, Denmark). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(3): 847-856
- Jørgensen, B. B., Fossing, H., Wirsen, C. O., Jannasch, H. W. (1991). Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline. *Deep. Sea. Res.* **38**(2): S1083-S1103
- Joint, I. R. and Morris, R. J.(1982). The role of bacteria in the turnover of organic matter in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **20**: 65-118.
- Karl, D. M., Knauer, G.A., Martin, J.H. (1988). Downward flux of particulate organic matter in the ocean: a particle decomposition paradox. *Nature* **332**: 438-441.
- Karner, M. and Herndl, G. J. (1992). Extracellular enzymatic activity and secondary production in

free-living and marine snow associated bacteria. *Mar. Biol.* **113**: 341-347

- King, G. M. (1986). Characterization of β -glucosidase activity in intertidal marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 373-380.
- Kirchman, D. L., K'Neas, E., Hodson, R. (1985). Leucin incorporation and its potential as measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 599-607.
- Kirchman, D. L. (1992). Incorporation of thymidine and leucine in the subarctic Pacific: application to estimating bacterial production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **82**: 301-309.
- Kirchman, D. L., Newell, S.Y., Hodson, R.E. (1986). Incorporation versus biosynthesis of leucine: implications for measuring rates of protein synthesis and biomass production by bacteria in marine systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **32**: 47-59.
- Klump, J. V. and Martens, C.S. (1983). Benthic nitrogen regeneration. In: Carpenter, E.J., Capone, D.G. (eds.) Nitrogen in the marine environment. Academic press, New York. 411-457.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., Kuwabara, S. (1963). A new selective isolation medium for the *Vibrio* group (modified Nakanishi medium - TCBS agar). [In Japanese]. *Jap. J. Bacteriol.* **18**: 387-392.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1978). A tentative direct microcopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415-420.
- Kohls, O., Anders, K.-D., Scheper, T. (1994). Optische Sauerstoffmessung in Zellimmobilisaten. *Bioforum.* **17**: 44-48.
- Krambeck, C. (1979). Applications and limitations of the Michaelis-Menten equation in microbial ecology. *Arch. Hydrobiol.* **12**: 64-76.
- Krembs, C. (1995). The examination of a method and its relevance to sample the distribution of aquatic microorganisms on the scale of micrometers to centimeters. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Kuenen, J. G. (1975). Colourless sulphur bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant and Soil* . **43**: 49-70.
- Lee, S. and Fuhrman, J. A. (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1298-1303.

- Leser, T. D. (1995). Validation of microbial community structure and ecological functional parameters in an aquatic microcosm designed for testing genetically engineered microorganisms. *Microb. Ecol.* **29**: 183-201.
- Lovitt, R. W. and Wimpenny, W.T. (1981). The Gradostat: a bidirectional compound chemostat and its application in microbiological research. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 261 - 268.
- MacDonell, M. T. and Colwell, R.R. (1985). Phylogeny of Vibrionaceae and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. appl. Microbiol.* **6**: 171-182.
- Margalef, R. (1979). Diversity. In: Sournia (ed.). Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO, Paris. 251-260
- Marschall, C., Frenzel, P., Cypionka, H., (1993). Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate - reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **159**: 168 - 173.
- Martens, C. S. (1984). Recycling of organic carbon near the sediment-water interface in coastal environments. *Bull. Mar. Sci.* **35**: 566-575.
- Martin, J.H., Knauer, G.A., Karl, D.M., Broenkow, W.W. (1987). VERTEX: carbon cycling in the northeast Pacific. *Deep-Sea Res.* **34**: 267-285.
- Martinez, J. and F. Azam (1993). Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **92**: 89-97.
- Matthäus, W. (1978). Allgemeine Entwicklungstendenzen im Sauerstoffregime des Tiefenwassers der Ostsee. *Fischereiforschung.* **16**: 7-14.
- Matthäus, W. (1986). Charakteristische Eigenschaften von Stagnationsperioden im Tiefenwasser der Ostsee. *Beitr.Meereskunde.* **55**: 39 - 53.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. (1988). The characterization of enzymatically amplified DNA separations. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**: 491-423.
- Meghji, K., Ward, O.P., Araujo, A. (1990). Production, purification, and properties of extracellular carboxyl esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *App. Environ. Microbiol.* **56**(12): 3735-3740.
- Meyer-Reil, L.-A. (1991). Ecological aspects of enzymatic activity in marine sediments. In: Chrost, R.J. (ed.) Microbial enzymes in aquatic environments. New York, Springer Verlag. 84-

95.

- Millero, F. J. (1991). The oxidation of H₂S in the Chesapeake Bay. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* **33**(5): 521-527.
- Mopper, K. and Kieber, D.J. (1991). Distribution and biological turnover of dissolved organic compounds in the water column of the Black Sea. *Deep - Sea Research.* **38**(2): S1021 - S1047.
- Mopper, K. and Lindroth, P. (1982). Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 336-347.
- Münster, U. (1991). Extracellular enzyme activity in eutrophic and polyhumic lakes. In: Chrost, R.J. (ed.) *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York, Springer Verlag. 96-122.
- Murray, J. W., Jannasch, H. W., Honjo, S., Anderson, R. F., Reeburgh, W. S., Top, Z., Friederich, G. E., Codispoti, L. A., Izdar, E. (1989). Unexpected changes in the oxic/anoxic interface in the Black Sea. *Nature.* **338**(6214): 411-413.
- Muyzer, G., De Wall, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis analysis of polymerase chain reaction - amplified genes coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* **59**(3): 695 - 700.
- Muyzer, G. (1995). Theoretical and practical aspects of DGGE of DNA fragments. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany.
- Myers, C.R. and Nealson, K.H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science.* **240**: 1319-1321.
- Nealson, K. H., Myers, C.R., Wimpee, B.B. (1991). Isolation and identification of microbial Mn (IV)- reducing potential in the Black Sea. *Deep. Sea. Res.* **38**: S907-S920.
- Odum, E. P. (1971). *Fundamentals of Ecology*. Philadelphia, London, Toronto, W. P. Saunders.
- Omerod, K. S. (1988). Distribution of some non-phototrophic bacteria and active biomass (ATP) in the permanently anoxic fjord Framvaren. *Mar. Chem.* **23**: 243-256.
- Overbeck, J. (1972). Zur Struktur und Funktion des aquatischen Ökosystems. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **85**(10-12): 553-577.

- Overbeck, J. (1973). Über die Kompartimentierung der stehenden Gewässer - Ein Beitrag zur Struktur und Funktion des limnischen Ökosystems. Sonderdruck: *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, Saarbrücken. 211-223
- Overbeck, J. and Chrost, R. J. (1990). Aquatic microbial ecology. Biochemical and molecular approaches. New York, Springer.
- Oviatt, C. A., Perez, K.T., Nixon, S.W. (1977). Multivariate analysis of experimental ecosystems. *Helgoländer Meeresunters.* **30**: 30-46.
- Pace, N. R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **8**: 1-55.
- Paisley, R. Ed. (1994). Training Manual MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. Newark, Delaware 19711 U.S.A, MIDI, Inc. 115 Barksdale Professional Center.
- Peduzzi, P. and Herndl, G. J. (1992). Zooplankton activity fueling the microbial loop: Differential growth response of bacteria from oligotrophic and eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.* **37**(5): 1087-1092
- Piker, L. (1995). Dynamik der Sulfatatmung und ihre Bedeutung für die Kohlenstoff-Mineralisierung in Ostsee-Sedimenten. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Pomeroy, L. R. (1974). The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience* **24**: 499-504.
- Priest, F. G. (1984). Extracellular enzymes. Wokingham, U.K., Van Nostrand Reinhold.
- Pritchard, P. H. and Bourquin, D.W. (1994). The use of microcosms for evaluation of interactions between pollutants and microorganisms. *Advances in Microbial Ecology*. Plenum, New York: 133-215.
- Rath, J. and Herndl, G.J. (1994). Characteristics and diversity of β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) activity in marine snow. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 807-813.
- Rehnstam, A.-S., Bäckman, S., Smith, D.C., Azam, F., Hagström, Å. (1993). Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**: 161-166.
- Reichardt, W. (1978). Einführung in die Methoden der Gewässer-Mikrobiologie. Stuttgart, G. Fischer Verlag.
- Rheinheimer, G. (1991). Mikrobiologie der Gewässer. 5 Aufl., Jena, Fischer.

- Rheinheimer, G., K. Gocke, Hoppe, H.-G. (1989). Vertical distribution of microbiological and hydrographic-chemical parameters in different areas of the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **52**(1): 55-70.
- Riemann, B. and Azam, F. (1992). Measurements of bacterial protein synthesis in aquatic environments by means of leucine incorporation. *Mar. Microb. Food Webs.* **6**(2): 91-105.
- Rogers, J. E. and W. B. Whitman (1991). Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Roszack, D. B. and Colwell, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365-379.
- Rozzak, D. B. and Colwell, R.R. (1987). Metabolic Activity of Bacterial Cells Enumerated by Direct Viable Count. *App. Environ. Microbiol.*, **53**(12): 2889 - 2983.
- Roy, S.K., Raha, S.K., Dey, S.K., Chakrabarty, S.L. (1988). Induction and catabolite repression of β -glucosidase synthesis in *Myceliophthora thermophila* D-14 (=ATCC 48104). *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2152-2153.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Lubitz, W. (1995). Detection of bacteria in biodegraded wall paintings using DGGE Analysis of 16S rDNA fragments. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany.
- Saiki, R. K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487-491.
- Schauder, R. and Schink, B. (1989). *Anaerovibrio glycerini* sp. nov. an anaerobic bacterium fermenting glycerol to propionate, cell matter, and hydrogen. *Arch. Microbiol.* **152**: 473-478
- Schlegel, H. G. (1985). Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart.
- Schmitt-Biegel, B., Obst, U. (1989). Rationelle fluorimetrische Bestimmung von Enzymaktivitäten in vivo und der Biomasse (DNA) auf Microtiterplatten. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* **22**: 165

- 167.

- Schultz, J. S. (1992). Biosensoren. Spektrum der Wissenschaft, Sonderdruck. 2-8.
- Schütt, C. (1990). Plasmids and their role in natural aquatic bacterial communities. Aquatic microbial ecology. Biochemical and molecular approaches. New York, Springer. 160-184.
- Schwarz, K. (1995). Mikrokosmos- und Felduntersuchungen zur mikrobiellen Aktivität in oxisch-sulfidischen Chemoklinen im marinen Pelagial. Dissertation. Universität Kiel.
- Seppänen, H. and Voipio, A. (1971). Some bacteriological observations made in the northern Baltic. *Merentutkimuslait. Julk./Havsforskningsinst. Skr.* **233**: 43-48.
- Simon, M. and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **51**: 201 - 213.
- Smith, C. D., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F. (1992). Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*. **359**: 139 - 142.
- Sleigh, M. A. (ed.) (1987). Microbes in the sea. Ellis Horwood Limited.
- Smalla, K., Gebhard, F., van Elsas, J.D. (1995). Direct DNA extraction from environmental samples-State of the art. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F. (1992). Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*. **359**: 139-142.
- Somville, M. (1984). Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1181-1185.
- Sorokin, Y. I. (1983). The Black Sea. Estuaries and enclosed seas, ecosystems of the world. New York, Elsevier. 253-292.
- Stadler, R., Detmar, M., Stephanek, K., Bangemann, C., Orfanos, C.E. (1989). A rapid fluorometric assay for the determination of keratinocyte proliferation in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 532-534.
- Stigebrandt, A. and Wulff, F. (1987). A model for the dynamics of nutrients and oxygen in the Baltic proper. *J. Mar. Res.* **45**: 729-759.
- Süßmuth, R., Eberspächter, J., Haag, R., Springer, W. (1987). Biochemisch-mikrobiologisches

Praktikum. Stuttgart, New York.

- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms*. New York, Wiley. 179 - 244.
- Tuttle, J. H. and Jannasch, H.W. (1972). Occurrence and types of Thiobacillus-like Bacteria in the Sea. *Limnol. Ocean.* **17**(4):
- Tuttle, J. H. and Jannasch, H.W. (1973a). Sulfide and thiosulfate-oxidizing bacteria in anoxic marine basins. *Mar. Biol.* **20**: 64-70.
- Tuttle, J. H. and Jannasch, H.W. (1973b). Dissimilatory reduction of inorganic sulfur by facultatively anaerobic marine bacteria. *J.Bac.* **115**: 732-735.
- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Soulas, G. (1995). Limits of DGGE in the detection of sequence variation in selected bacterial communities. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Vendrick, E. L. (1978). How many cells to count? Phytoplankton manual. Monographs of oceanographic methodology. 167-180.
- Wawer, C. and Muyzer, G. (1995). Genetic diversity of *Desulfovibrio spp.* in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of (NiFe) hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(6): 2203-2210.
- Weiss, M. S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., Schultz, G.E. (1991). Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science.* **254**: 1627-1630.
- Wetzel, R. G. (1991). Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and interspecific communication. In: Chrost, R.J. (ed.) *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York, Springer Verlag. 6-28.
- Williams, P. J. and Askew, C. (1968). A method of measuring the mineralisation by microorganisms of organic compounds in the sea. *Deep-Sea Res.* **15**: 365-375.
- Wimpenny, J. W. T. (1989). Laboratory Model Systems for the Experimental Investigation of Gradient Communities. In: Cohen, J., Rosenberg, E. (eds.) *Microbial Mats*. Washington, DC, American Society for Microbiology. 366 - 383.
- Wimpenny, J. W. T. and Abdollahi, H. (1991). Growth of mixed cultures of *Paracoccus denitrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans* in homogeneous and in heterogeneous culture

- systems. *Microb. Ecol.* **22**: 1 - 13.
- Witzel, K.-P. (1995). Diversity of nitrifying bacterial populations in lakes. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,
- Wrangstadh, M., Conway, P.L., Kjelleberg, S. (1989). The role of an extracellular polysaccharide produced by the marine *Pseudomonas* sp. S9 in cellular detachment during starvation. *Can. J. Microbiol.* **35**: 309-312.
- Wrangstadh, M., Szewzyk, U., Östling, J., Kjelleberg, S. (1990). Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2065-2072.
- Wright, W. T. and Hobbie, J.E. (1966). Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* **47**: 441-461.
- Zehnder, A. J. B. (ed.). (1988). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons.
- Zimmermann, R. (1977). Estimation of bacterial numbers and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In: Rheinheimer, G. (ed.) *Microbial ecology of brackish water environment*. Ecological studies. Springer Verlag, Berlin.
- ZoBell, C. (1946). *Marine Microbiology. A Monograph on Hydrobacteriology*. Waltham, Chronica Botanica Co.
- Zouboulis, C., Garbe, C., Krasagakis, K., Krüger, S., Schröder, K., Orfanos, C.E. (1995). A flurometric rapid microassay to identify antiproliferative compounds for human melanoma cells in vitro. Dpt. of Dermatology, University Medical Center Steglitz, University of Berlin, Germany.
- Zwart, G., van Agterveld, M., Eenhorn, H., Laanbroek, H. (1995). Application of DGGE to study bacterial diversity in freshwater ecosystems. Beiheft: Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Germany,

7 ANHANG

Abkürzungen

H ₂ S	Sulfid
O ₂	Sauerstoff
Ar	Argon
NO ₃ ⁻	Nitrat
C/N	Kohlenstoff-Stickstoff Verhältnis
GBZ	Gesamtbakterienzahl
TVDC	Total Viable Direct Count
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose
cfu	cell forming unit
MPN	Most Probable Number
Hmax	potentielle maximale Hydrolysegeschwindigkeit
Kt+Sn	Enzymaffinität (Michaelis-Menten-Konstante) und Substratpool
Hr	Hydrolyserate
Tr	Turnoverrate
BSP	bakterielle Sekundärproduktion
MUF	Methylumbelliferyl
EEA	ektoenzymatische Aktivität
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
LMW	Low Molecular Weight
PCR	Polymerase Chain Reaction
bp	Basepair
DNA	Deoxyribonucleic acid
U	Unit
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	messenger RNA
tRNA	transport RNA
16S rDNA	16S Untereinheit der ribosomalen DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
APS	AmmoniumPersulfat
MIS	Microbial Identification System
S	Salinität

Die verwendeten Lösungen und Medien

Das Quiagen-Lyseprotokoll (Fa. Diagen) zur Extraktion und Reinigung genomischer, bakterieller Gesamt-DNA

Abzentrifugiertes Zellmaterial in 1 ml Quiagen-Lysepuffer B1 + 200 mg RNase A resuspendieren, und zugeben von

- 1.) 20 ml Lysozym-Lösung (100 mg Lysozym auf 1 ml Milli-Q Wasser)
- 2.) 45 ml Protease K-Lösung (20 mg Protease K auf 1 ml Milli-Q Wasser)

Nach einer Inkubation bei 37 °C für 60 Minuten im Wasserbad folgt nach Zusatz von 350 µl Puffer B2 eine weitere Inkubation bei 55 °C für 60 Minuten.

Vor dem Auftragen der lysierten Zellsuspension auf die Reinigungssäulen werden pro Probe je eine QIAGEN Genomic-tip 20/G Säule mit 2 x 1 ml Puffer QBT equilibriert. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Probe folgt eine Waschung mit 3 x 1 ml Puffer QC und die Elution mit 2 x 1 ml Puffer QF. Das Eluat wird in 2 ml Eppendorfhütchen aufgefangen und die DNA nach Zusatz von 1.4 ml Isopropanol unter Rollbewegungen gefällt.

Die pelletierte DNA (Zentrifugation bei 15 000 x g für 15 Min.) wird in kaltem Ethanol (70 %) resuspendiert, erneut abzentrifugiert und für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lösung der DNA erfolgt nach Zugabe von 50 µl TE-Puffer (oder sterilem Milli-Q Wasser) über Nacht im Kühlschrank. Diese DNA dient als Ausgangs-DNA ("template") für die PCR-Reaktionen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Quiagen-Puffer-Systeme:

Puffer B1:	50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, 0.5 % Tween-20,
Lyse-Puffer	0.5 % Triton X-100, pH 8.0
Puffer B2:	3 M GuHCl, 20 % Tween-20, pH 5.5
Lyse-Puffer	
Puffer QBT:	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol,
Equilibrierungs-Puffer	0.15 % Triton X-100, pH 7.0
Puffer-QC:	1.0 M NaCl, 50 mM MOPS,
Wasch-Puffer	15 % Ethanol, pH 7.0
Puffer-QF:	1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl,
Elutions-Puffer	15 % Ethanol, pH 8.5
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Zusammensetzung des 10 x PCR Puffers

100 mM Tris-HCl (pH9), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 0.1 % (wt/vol) Gelatine, 1 % (vol/vol) Triton X-100.

Zusammensetzung der "gel loading solution"

Bromphenol blau, 0.05 % wt/vol; Saccharose, 40 % wt/vol; EDTA, 0.1 M, pH 8.0; Lauryl Sulfat Natrium (SDS), 0.5 % wt/vol (Fa. Sigma).

Zusammensetzung des 10 x TAE-Elektrophoresepuffers (pH 7.4)

48.68 g Tris-Acetat (400 mM)

27.22 g Na-Acetat (200 mM)

3.72 g Na₂-EDTA (10 mM)

mit Milli-Q Wasser auf 980 ml auffüllen und mit 20 ml 96 % Essigsäure auf pH 7.4 einstellen.

Die Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer

Primer P1: 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG
GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3'

Primer P2: 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'

Primer P3 :5'-GTG GAC TAC CAG GGT ATC - 3'

Zusammensetzung der PCR

Die PCR Amplifikationen erfolgten in dem Thermozykler 'MJ - Research' (Biozyme).

Die PCR für ein 20 µl Volumen wurde in 0.5 ml Eppendorfhütchen durchgeführt.

14 µl steriles Milli-Q Wasser.

2 µl 10 x PCR Puffer

1 µl Deoxyribonucleosid triphosphat-Lsg.(1mM)

1 µl Primer P1 (10 mM)

1 µl Primer P2 (10 mM)

1 µl gereinigte DNA (250 ng)

20 ml Mineralöl (Sigma)

0.25 U *Taq* DNA Polymerase**Die benötigten Acrylamid-Stammlösungen :**

40 % (wt/vol) Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid-N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid, 37:1):

100 g Acrylamid

2.7 g Bis-Acrylamid

auf 250 ml mit Milli-Q Wasser auffüllen

Lösung A:

8% (wt/vol) Acrylamidlösung mit 80% Denaturierungsbedingungen:

20 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung

32 ml Formamid (Sigma), deionisiert mit

Mixed Bed Resin (Sigma)

34 g Harnstoff (GIBCO BRL, ultra pur)

5 ml 10 x TAE-Elektrophoresepuffer

mit Milli-Q Wasser auf 100 ml auffüllen.

Lösung B:

8 % (wt/vol) Acrylamidlösung mit 0% Denaturierungsbedingungen:

20 ml 40% Acrylamid-Stammlösung
5 ml 10x TAE-Elektrophoresepuffer
mit Milli-Q Wasser auf 100 ml auffüllen.

Verwendete Medien und Nährböden

ZoBell - Agar:

Zusammensetzung des Brackwasser-Hefextrakt-Pepton-Agars nach Oppenheimer & ZoBell (Reichardt, 1978).

<u>Komponenten (g/l)</u>	
Bacto-Pepton	: 5.0
Hefeextrakt	: 1.0
Agar	: 15.0
(NH ₄)Fe(SO ₄) ₂ x 6H ₂ O	: 0.01
Standardseewasser (SSW), S = 15	
pH: 7.6.-7.8	
Inkubation: 18 - 20°C	
14 - 21 Tage	

Der vor dem Autoklavieren (30 Min. bei 120 °C) eingestellte pH-Wert betrug 7.8. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der Agar in 20 ml Portionen auf Petrischalen verteilt und nach vollständigem Erstarren ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Platten bis zum Gebrauch bei 10 °C im Kühlschrank deponiert.

Flüssigmedium für MPN-Bestimmungen:

Für die Quantifizierung NO₃⁻ reduzierender Bakterien durch die 'MPN'-Technik ("Most Probable Number") wurde ZoBell-Flüssigmedium mit 5 g l⁻¹ KNO₃⁻ als einzigem Elektronenakzeptor verwendet.

TCBS - Agar:

('Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar' als Fertig-Nährboden von Merck)

<u>Komponenten (g/l)</u>	
Pepton aus Casein	: 5.0
Pepton aus Fleisch	: 5.0
Hefeextrakt	: 5.0
Natriumcitrat	: 10.0
Natriumthiosulfat	: 10.0
Ochsengalle getrockn.	: 5.0
Natriumcholat	: 3.0
Saccharose	: 20.0

NaCl	: 20.0
Eisen (III) citrat	: 1.0
Thymolblau	: 0.04
Agar-Agar	: 14.0

pH des gebrauchsfertigen Nährbodens bei 37 °C:
8.6 \pm 0.1. Die Inkubation erfolgte bei
Zimmertemperatur. Die Inkubationsdauer betrug
24-48 Std.

Es wurden 88 g/l des gebrauchsfertigen Agars in H₂O dest. suspendiert und 15 Min. eingeweicht. Anschließend wurde bis zum vollständigen Auflösen gekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der Agar in 20 ml Portionen auf Petrischalen verteilt. Die erkalteten Platten wurden für 1 Stunde im Trockenschrank bei 60 °C vorgetrocknet und bis zum endgültigen Gebrauch bei 10 °C im Kühlschrank gelagert. Die Beimpfung der Platten erfolgte nach der Spatelmethode (s.o.).

BBL-Trypticase Soy Broth - Standardmedium (Becton Dickinson)

Dieses Medium wurde als Standardmedium für alle Isolate eingesetzt, die für eine biochemische Charakterisierung anhand ihrer Membran-Fettsäuremuster vorgesehen waren.

Komponenten in g/l

Pancreatic Digest of Casein	: 17
Papaic Digest of Soybean Meal	: 3
NaCl	: 5
Dipotassium Phosphate	: 2.5
Dextrose	: 2.5

Es wurden 30 g des gebrauchsfertigen Mediums mit 15 g Agar und 10 g NaCl versetzt und in 1 Liter H₂O dest. gelöst (S = 15).

Die Inkubation erfolgte bei 15 °C in einem temperaturkonstanten Raum. Die Inkubationsdauer betrug 14 Tage.

Medium für autotrophe- heterotrophe schwefeloxidierende Bakterien

70 % modifiziertes Meerwasser:

Komponenten in g/l

NaCl	: 27.3
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	: 2.7
KCl	: 0.75
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	: 0.4
KBr	: 0.14
NH ₄ Cl	: 0.25
KH ₂ PO ₄	: 1.68

Agar-Agar	: 15
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	: 5 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O	: 0.5 mM
1 ml VA-Vitaminlösung	
1 ml SLB-Spurenelementlösung	
pH 7.2	
(Imhoff, 1988; Imhoff, 1995)	

Protokoll für die Fettsäuremethylveresterung an ganzen Zellen (MIDI)

- Etwa 40 mg Zellmaterial wurden mit einer Impföse nach Anzucht auf Agarplatten (BBL-Trypticase Soy Broth) auf den Boden eines 10 ml-Pyrex-Röhrchen aufgetragen.

Es folgte:

- Zugabe von 1 ml einer Lösung aus 1.5 ml H₂O dest./1.5 ml Methanol/0.45 g NaOH.
- 5-10 Sekunden mischen (Whirlmix), dann für 5 Minuten bei 100 °C im Kochwasserbad kochen.
- 5-10 Sekunden mischen, dann erneut für 25 Minuten im Kochwasserbad kochen.
- Proberöhrchen im Leitungswasser abkühlen.
- Proberöhrchen mit 2 ml einer Lösung aus 3.25 ml 6 N HCl (= HCl konz./H₂O dest. 1:2, vol/vol) und 2.75 ml Methanol versetzen.
- Proberöhrchen für 5-10 Sekunden mischen und für 10 Minuten bei 80±1 °C im Wasserbad inkubieren.
- Proberöhrchen schnell unter fließendem Leitungswasser abkühlen.
- Zugabe von 1.25 ml einer Lösung aus Hexan/tert-Butylether 1:2 (vol/vol).
- Proberöhrchen für 10 Minuten auf dem Über-Kopf-Schüttler ausschütteln.
- unter Durchstoßen der Phasengrenzfläche nach ca. 3 Minuten Phasentrenzeit die Unterphase abziehen (Pasteurpipette und Peleusball) und verwerfen, Oberphase im Röhrchen belassen.
- Zugabe von 3 ml einer Lösung aus 1.08g NaOH/9ml H₂O dest. zur Oberphase, außerdem 0.4 ml NaCl-Lsg. (30 %, partikelfrei).
- 5 Minuten auf dem Über-Kopf-Schüttler ausschütteln.
- Zentrifugation der Mischung ohne Tarierung in 15 ml Röhrchen-bei 4 °C, 2000 UpM.
- Röhrchen unter sorgfältiger Vermeidung von Erschütterungseinflüssen (Gefahr der Durchmischung des Zweiphasensystems) aus der Zentrifuge und den Adaptern entnehmen und in Ständer stellen.
- Abziehen von ca. 66 % der Oberphase mit einer reinen Pasteurpipette und Transfer in ein HP-Probenvial in einem geeigneten Ständer neben der Probe stehend.

Synthese von Tris (4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)- ruthenium (II)-chlorid und perchlorat

Das für die faseroptische Sauerstoffmessung verwendete Fluorophor war nicht im freien Handel erhältlich und wurde über dem Rückfluß nach Anders (1991) synthetisiert.

Eine Lösung von 50 mg Kaliumaquapentachlororuthenat (III) (K₂{RuCl₅(H₂O)}), Aldrich) in 5 ml dest. Wasser wurde mit einem Tropfen 0.6 N HCL (bzw. HClO₄) angesäuert und gerade zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise eine Suspension von 137 mg 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin ([Ligand], Aldrich) in 3 ml Dimethylformamid (Merck) gegeben. Die

Mischung wurde nun ca. 20 Minuten unter Rückfluß erhitzt, wobei sich der Ligand vollständig auflöste. Sobald die Lösung eine dunkelgrüne Farbe angenommen hatte, wurde heiß von eventuell vorhandenem Feststoff (überschüssiger Ligand) abfiltriert. Zu dem noch heißen Filtrat gab man 75 mg in wenig Wasser gelöstes Natriumhypophosphit ([5.25 Äquivalente], Aldrich) und erhitzte weitere 1-2 Stunden unter Rückfluß. Die resultierende tiefrote, klare Reaktionslösung wurde nun mit ca. 1 ml 6 N HCl (bzw. HClO₄) langsam unter leichtem Schütteln angesäuert, wobei ein dunkelroter (orangefarbener) Niederschlag ausfiel, der heiß abfiltriert und mit viel Wasser gewaschen wurde. Das so erhaltene Produkt, {Ru(ph₂phen)₃}Cl₂ bzw. {Ru(ph₂phen)₃}(ClO₄)₂, wurde an der Luft getrocknet. Es konnten Ausbeuten von ca. 76% bezogen auf Ru erzielt werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurde die Substanz aus heißem Ethanol/Wasser-Gemisch (1:1 v/v) umkristallisiert. (Anders, 1991).