

# **Untersuchung der Mikroflora im Sediment von Nonylphenol-belasteten aquatischen Mikrokosmen**

**Miriam Jontofsohn**

**GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,  
Institut für Bodenökologie, Neuherberg**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
eingereicht am 18.03.2002  
Tag der mündlichen Prüfung 17.10.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Nonylphenol</b> .....	<b>1</b>
1.1	Vorkommen und Wirkung .....	1
1.2	Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten .....	2
<b>2</b>	<b>Funktionelle Parameter</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Untersuchungen zur Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft – ein kultivierungsunabhängiger Ansatz</b> .....	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>5</b>
<b>B</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Testsystem</b> .....	<b>6</b>
1.1	Probenentnahme von Sediment und Wasser aus dem Ammersee .....	6
1.2	Aufbau und Befüllung der Mikrokosmen .....	7
1.3	Controlled-Release Dosierung .....	7
1.4	Probenentnahme von Sediment aus den Mikrokosmen .....	8
<b>2</b>	<b>Chemische und physikalische Parameter</b> .....	<b>9</b>
2.1	Trockengewichtsbestimmung .....	9
2.2	Redoxpotential .....	9
2.3	Gesamtstickstoff .....	9
2.4	Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) .....	9
2.5	Nonylphenolgehalt .....	10
<b>3</b>	<b>Funktionelle Parameter</b> .....	<b>10</b>
	Bestimmung der Aminopeptidase - Aktivität .....	10
<b>4</b>	<b>Quantitative Bestimmung von Populationen</b> .....	<b>13</b>
4.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI nach Membranfiltration .....	13
4.2	Epifluoreszenz-Mikroskopie .....	14
<b>5</b>	<b>In situ Einzelzellhybridisierung</b> .....	<b>15</b>
5.1	Fixierungsmethoden .....	15
5.1.1	Paraformaldehydfixierung (PFA-Fixierung) .....	15
5.1.2	Ethanolfixierung: .....	16
5.2	<i>In situ</i> Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden .....	16
5.3	Beschichtung der Objektträger mit Gelatine .....	18
5.4	Hybridisierungsprozedur .....	18
5.5	Bestimmung relativer Populationsanteile nach der <i>in situ</i> Hybridisierung und DAPI-Färbung .....	20
<b>6</b>	<b>Nukleinsäureisolierung</b> .....	<b>21</b>
6.1	Isolierung von rRNA .....	21
6.2	rRNA- und DNA-Isolierung aus Sediment nach Oelmüller et al. (1990; modifiziert) .....	22

<b>7</b>	<b>Analyse der Nucleinsäuren.....</b>	<b>23</b>
7.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
7.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA.....	24
<b>8</b>	<b>In vitro Amplifikation von Nucleinsäuren mittels PCR.....</b>	<b>25</b>
8.1	DNA-Polymerasen.....	26
8.2	Amplifikation der 16S-rDNA-Teilsequenzen.....	26
8.3	Reverse Transkription.....	28
8.3.1	DNA-Verdau.....	28
8.3.2	Einschritt-RT-PCR.....	29
8.3.3	Zweischritt-RT-PCR.....	30
8.4	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	33
8.5	Verdau von Überhängen.....	33
<b>9</b>	<b>Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE).....</b>	<b>34</b>
<b>10</b>	<b>Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels.....</b>	<b>38</b>
<b>11</b>	<b>Konservieren des Polyacrylamid-Gels.....</b>	<b>39</b>
<b>12</b>	<b>Auswertung des Polyacrylamid-Gels.....</b>	<b>39</b>
<b>13</b>	<b>Klonieren von PCR-Produkten.....</b>	<b>42</b>
13.1	Vektor pCR <sup>®</sup> 4 Blunt-TOPO.....	42
13.2	Erzeugung von PCR-Produkten mit blunt ends.....	43
13.3	Klonierungsreaktion.....	43
13.4	Isolierung der Plasmid-DNA.....	45
13.5	Restriktionsverdau.....	45
<b>14</b>	<b>Sequenzieren.....</b>	<b>46</b>
<b>15</b>	<b>Auswertung der Sequenzdaten.....</b>	<b>46</b>
<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>1</b>	<b>VERSUCHSDESIGN.....</b>	<b>47</b>
1.1	Applikation von Nonylphenol und Versuchsperioden.....	47
1.3	Nonylphenolkonzentrationen im Sediment.....	49
<b>2</b>	<b>Chemische und physikalische Parameter.....</b>	<b>50</b>
2.1	Redoxpotentiale im Sediment.....	50
2.2	Gesamtstickstoff.....	52
2.3	Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC).....	52
<b>3</b>	<b>Mikrobielle Funktionsparameter.....</b>	<b>53</b>
	Bestimmung der Aminopeptidase – Aktivität.....	53

<b>4</b>	<b>Mikrobielle Populationsparameter .....</b>	<b>55</b>
4.1	Bestimmung der bakteriellen Gesamtzellzahl.....	55
4.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	57
4.2.1	Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde EUB 338.....	57
4.2.2	Gesamtzellzahl und EUB-hybridisierbare Bakterien.....	58
4.2.3	Abundanz der phylogenetischen Gruppen von Bakterien .....	60
4.3	Analyse der 16S-rDNA-Teilamplifikate in DGGE-Fingerprints.....	61
4.3.1	Präapplikationsperiode .....	62
4.3.2	Applikationsperiode, Tag 25 .....	63
4.3.3	Applikationsperiode, Tag 44 .....	65
4.3.4	Postapplikationsperiode, Tag 80 .....	67
4.3.5	Vergleichende DGGE-Fingerprintanalyse verschiedener Versuchsphasen .....	69
4.4	Optimierung der RT-PCR aus Sediment-rRNA.....	71
	Zweischritt-RT-PCR .....	71
4.5	Analyse der 16S-rRNA-Amplifikate im DGGE-Fingerprint .....	73
	Vergleichende DGGE-Fingerprintanalyse verschiedener Versuchsphasen	73
4.6	Identifizierung der 16S-rDNA- und 16S-rRNA-Amplifikate.....	76
4.6.1	$\alpha$ -Proteobacteria.....	77
4.6.2	$\beta$ -Proteobacteria.....	77
4.6.3	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA .....	78
4.6.4	Verrucomicrobia .....	79
4.6.5	Weitere Sequenzen.....	80
4.6.6	Phytoplankton und bakterielle rRNA aus Sandboden.....	81
<b>D</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>1</b>	<b>Methodische Aspekte.....</b>	<b>83</b>
<b>2</b>	<b>Einfluß von Nonylphenol.....</b>	<b>85</b>
2.1	Funktioneller Parameter (Proteaseaktivität).....	85
2.2	Populationsstruktur.....	86
2.2.1	<i>In situ</i> Hybridisierung mit 16S-rRNA gerichteten-Oligonukleotidsonden..	86
	.....	86
2.2.1.1	Vergleich EUB-hybridisierbarer Zellen mit der Gesamtzellzahl.....	87
2.2.1.2	Abundanz der Bakteriengroßgruppen.....	88
2.2.2	Analyse der Fingerprints und der Klonbanken.....	89
<b>3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>93</b>
<b>E</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>96</b>
<b>F</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>98</b>
<b>G</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>112</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>116</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. A 1:	Struktur und Abbau von Nonylphenol (aus Fent, 1998).....	2
Abb. B 1:	Außenteichanlage am Institut für Bodenökologie.....	7
Abb. B 2:	Darstellung der Substratsättigungskurve und der Trendlinie y von Leu-MCA durch Sedimentbakterien.....	11
Abb. B 3:	Modellsubstrat Leu-MCA (L-Leucin-4-Methyl-7-Coumarinylamid Hydrochlorid).....	11
Abb. B 4:	pCR® 4 Blunt-TOPO Vektor von Invitrogen.....	42
Abb. C 1:	Nonylphenolkonzentrationen in [mg Nonylphenol/(kg TG Sediment)]..	49
Abb. C 2:	Redoxspannung in [V].....	51
Abb. C 3:	Redoxspannung in [V] der unbelasteten Kontrollen (K1 - K4). ....	51
Abb. C 4:	N <sub>Gesamt</sub> .....	52
Abb. C 5:	DOC-Gehalt in Prozent Trockengewicht des eingesetzten Sediments	53
Abb. C 6:	Proteolytische Aktivität [µM/(h g TG).....	54
Abb. C 7:	Gesamtzellzahl (DAPI) *10 <sup>9</sup> /(g FG).....	56
Abb. C 8:	Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde EUB 338.....	58
Abb. C 9:	Verteilung von Bakteriengruppen mit 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden;.....	61
Abb. C 10:	DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Präapplikationsperiode</i> .....	62
Abb. C 11:	Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Präapplikationsperiode</i> .....	63
Abb. C 12:	DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Applikationsperiodes</i> , Tag 25.....	64
Abb. C 13:	Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Applikationsperiodes</i> , Tag 25.....	64
Abb. C 14:	DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Applikationsperiodes</i> , Tag 44.....	66
Abb. C 15:	Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Applikationsperiodes</i> , Tag 44.....	66
Abb. C 16:	DGGE-Fingerprint der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Postapplikationsperiode</i> .....	68
Abb. C 17:	Hierarchische Clusteranalyse der-PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der <i>Postapplikationsperiode</i> .....	68
Abb. C 18:	DGGE-Übersicht-Fingerprint der PCR amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA.....	70
Abb. C 19:	Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA.....	71
Abb. C 20:	Agarosegel zur Zweischritt-Reversen-Transkription-PCR für Sediment-rRNA.....	73
Abb. C 21:	DGGE-Übersicht-Fingerprint der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-rRNA.....	75
Abb. C 22:	Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-rRNA.....	76
Abb. C 23:	„average distance tree“ von 16S-rDNA-Teilsequenzen ( $\alpha$ -Proteobacteria). ....	77
Abb. C 24:	„average distance tree“ von 16S-rDNA- und -rRNA-Teilamplifikaten ( $\beta$ -Proteobacteria). ....	78

Abb. C 25:	„average distance tree“ zu Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA. ....	79
Abb. C 26:	„average distance tree“ zu <i>Verrucomicrobia</i> . ....	80
Abb. C 27:	„average distance tree“ zu <i>Cyanobakterien</i> und Chloroplasten-DNA eukaryotischer Algen. ....	82

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. B 1:	Spezifizierung der eingesetzten 16S- und 23S-rRNA Oligonukleotidsonden.....	17
Tab. B 2:	16S-rRNA spezifische Oligonukleotidprimer.....	28
Tab. B 3:	Kombinationsmöglichkeiten binärer Variablen (aus Backhaus et al., 2000) .....	41
Tab. B 4:	Abstufungen des Korrelationskoeffizienten (aus Bühl und Zöfel, 2000)... ..	41
Tab. C 1:	Probenentnahmetermine und Meßprogramm.....	48
Tab. C 2 A, B, C:	Verhältnis der EUB-hybridisierbaren Zellen in [%].....	59
Tab. G 1:	Standardabweichung der proteolytischen Aktivitäten .....	112
Tab. G 2:	Standardabweichung zur <i>in situ</i> Hybridisierung.....	113
Tab. G 3:	Näherungsmatrix des DGGE-Übersichts- 16S-rDNA-Fingerprints der hierarchischen Clusteranalyse .....	114
Tab. G 4:	Näherungsmatrix des DGGE-Übersichts- 16S-rRNA-Fingerprints der hierarchischen Clusteranalyse .....	115

## ABKÜRZUNGEN

A	Adenin; Ampère
Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
bp	Basenpaar
c	Konzentration
C	Cytosin
cDNA	copy-DNA
d	Tag
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
dNTP	Desoxynukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff ("dissolved organic carbon")
DTT	Dithiothreitolösung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	et alii
FA	Formamid
FG	Feuchtgewicht
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GC	Mol % Guanin und Cytosin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
kb	Kilobasen
l	Liter
Leu-MCA	L-Leucin-4-Methyl-7-Coumarinylamid Hydrochlorid
LDPE	Low Density Polyethylen
m	Milli (10 <sup>-3</sup> ); Meter
M	Molar
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
N <sub>Gesamt</sub>	Gesamtstickstoff
NP	Nonylphenol
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone



rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure (“ribosomal desoxyribonucleic acid”)
RNA	Ribonukleinsäure (“ribonucleic acid”)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (“ribosomal ribonucleic acid”)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Svedberg
s	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TEMED	N, N, N,` N-Tetramethylendiamin
U	Einheiten, Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
Vol	Volumen
w	Gewicht

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg im Rahmen des Querschnittsthemas „Ökotoxikologie“ durchgeführt.

**Mein herzlicher Dank gilt:**

Herrn Prof. Dr. A. Hartmann für die Vergabe des spannenden Themas, sein Interesse am Gelingen der Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine menschliche Art.

Herrn Prof. Dr. J.C. Munch für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. J. Overmann für die freundliche Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. M. Schloter für die sehr kompetente Betreuung, die vielen Diskussionen und für seine Unterstützung bei auftretenden Problemen.

Herrn PD Dr. K.-W. Schramm für die Einbindung am Institut für Ökologische Chemie und für die Möglichkeit auch dort zu arbeiten.

Frau Dr. M. Stoffels für die kompetente, strenge aber auch geduldige Heranführung in die molekulare Mikrobiologie.

Frau Dr. I. Jüttner für ihre ökotoxikologische Konzeption des Versuches und ihre fachliche Betreuung am Institut für Ökologische Chemie.

Herrn Dr. G. Pfister für die freundliche Überlassung der Werte der Nonylphenolkonzentrationen im Sediment.

Frau Dr. G. Severin-Edmaier für die Hilfe bei der Entnahme von Proben und ihrer kollegialen Art.

Meiner Freundin Dr. Siggie Metz, die mich in allen Fragen stets unterstützt und aufmunterte, sowie nie den Glauben an das Ende dieser Arbeit verlor.

Meiner Freundin Dr. Renate Schulze, die auch aus der Ferne ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Frau C. Galonska, Frau A. Schulze und Frau G. Hufnagel für die Hilfe beim Klonieren und bei den Biomassemessungen.

Herrn Dr. H.-J. Bach für die lustige und kooperative Atmosphäre im Labor und sein immer offenes Ohr für all meine Fragen.

Herrn K. Zeller für die Messungen am TOC und seine stets hilfsbereite Art.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für das gute und lockere Arbeitsklima, besonders Frau Regina Adler-Köhler und Herrn Andreas Günthner bei unseren witzigen Tee- und Kaffeerunden auch außerhalb der GSF.

Frau Alexandra Hagn, die mir unermüdlich alle abstrusen Papers per E-Mail schickte. Meinem Mann Thomas Gritschneider, der mittlerweile zum „Fachmann“ für mikrobielle Diversität geworden ist, für sein liebevolles Verständnis und seinen unerschütterlichen Glauben an mich.

## **A Einleitung**

### **1 Nonylphenol**

#### **1.1 Vorkommen und Wirkung**

Nonylphenol ( $C_{15}H_{24}O$ ; Abb. A 1) ist ein Metabolit der Alkylphenolpolyethoxylate. Auf Grund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften machen die Alkylphenolpolyethoxylate ca. 5 % des gesamten Tensidmarktes aus (Fent, 1998). Industriell werden sie in der Textilproduktion, in Agrochemikalien, in der Rohölverarbeitung, in der Lederproduktion und in verschiedenen Reinigungsprodukten eingesetzt (Bennie, 1999). Die jährliche Produktionsrate wird in Deutschland auf 25 000 t und weltweit auf 350 000 t geschätzt (Rippen, 1998). Alkylphenolpolyethoxylat wird in den Kläranlagen unvollständig zu Nonylphenol abgebaut. Dieser Abbau beginnt am hydrophilen Ende des Moleküls. Nonylphenol ist auf Grund seiner geringeren Kettenlänge toxischer als das Ausgangsprodukt (Ahel et al., 1994 - I und II). Es gelangt über die Vorfluter und Klärschlamm in die Gewässer und in das Grundwasser (Pfeifer et al., 1998). Dort lagert es sich wegen seiner lipophilen Eigenschaften im Schlamm und Sediment ab (Bennie, 1999). Die Konzentrationen im Sediment betragen in der Schweiz im Fließgewässer  $2,7 \pm 2,2 \mu\text{g/l}$  und im Grundwasser  $0,96 \pm 0,94 \mu\text{g/l}$  (Ahel et al., 1996). Im brandenburgischen Klärschlamm wurden Konzentrationen von 67 - 214  $\mu\text{g/g}$  Nonylphenol gefunden (Kujawa et al., 1997; Bennie, 1999), im Sediment im Mittelmeer vor Barcelona 6 - 69  $\mu\text{g/g}$  (Chaloux et al., 1994; Bennie, 1999) und im ägyptischen Nilästuar 19 - 44  $\mu\text{g/g}$  (Chaloux et al., 1994; Bennie, 1999). Die heutigen Nonylphenolkonzentrationen in Gewässern liegen in Deutschland und in der Schweiz im Bereich von 0,1 - 1  $\mu\text{g/l}$  (Fent, 1998). Durch *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, daß Alkylphenolpolyethoxylate und ihre Metabolite, insbesondere Nonylphenol, eine schwach östrogene Wirkung auf Fische, Vögel und Säugetiere ausüben (Ahel et al., 1996). Der Mensch inkorporiert durch die tägliche Aufnahme über Lebensmittel ca. 10  $\mu\text{g/d}$  an Nonylphenol. Die Substanz steht im Verdacht, Effekte auf die Reproduktionsfähigkeit des Menschen auszuüben (Holtey-Weber, 2000).

Durch das Aufstellen von Dosis-Wirkungskurven wurde die Toxizität von Nonylphenol gegenüber Mikroorganismen, angegeben als „effective concentrations“ (EC), auf ver-

schiedene Bakterien untersucht. Dabei wurde bei *Vibrio fischeri* der Wert ermittelt, bei dem 50 % der Bakterienkultur nach 5 Minuten keine Biolumineszenz mehr zeigte. Bei *Bacillus subtilis* lag bei der eingesetzten Konzentration nach 2 Stunden keine Hemmung der Sporenkeimung vor (Rippen, 1998):

- *Vibrio fischeri* EC<sub>50</sub> (5 min) = 0,44 mg/l
- *Bacillus subtilis* EC<sub>0</sub> (2 h) = 32 mg/l.

## 1.2 Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten

Der Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten zu Nonylphenol durch Bakterien beginnt unter aeroben Bedingungen am hydrophilen Ende des Moleküls, indem C<sub>2</sub>-Gruppen abgespalten werden (Ahel et al., 1994 - I). Der weitere Abbau von Nonylphenol ist auf Grund des Phenolrings nur sehr schwer möglich (Maki et al., 1994; Ejlertsson et al., 1999; Lye et al., 1999). Bisher sind nur wenige Mikroorganismen bekannt, die in der Lage sind Nonylphenol abzubauen. Dazu zählen *Sphingomonas* sp. (Tanghe et al., 1999), *Candida aquatexoris* sp. nov. und *Candida maltosa* (Vallini et al., 1997; Corti et al., 1995).

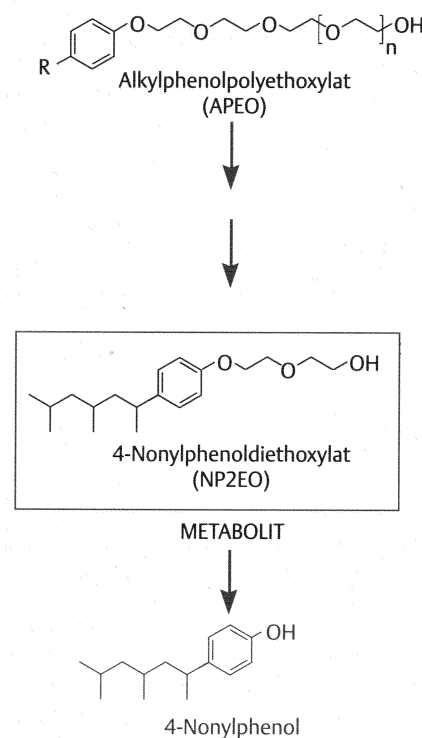


Abb. A 1: Struktur und Abbau von Nonylphenol (aus Fent, 1998).

## **2 Funktionelle Parameter**

Bakterien nehmen innerhalb des „Microbial loops“ aquatischer Systeme aufgrund ihrer Mineralisierungsleistung eine zentrale Stellung ein. Von allen trophischen Ebenen fließt organisches Material zu den Bakterien, die Exkrete anderer Organismen und abgestorbenes organisches Material verwerten. Der Abbau dieses Detritus wird enzymatisch von Bakterien geleistet und kann über die Messung von Enzymaktivitäten verfolgt werden (Lampert und Sommer, 1993).

Dabei stellt der Abbau von Proteinen durch mikrobielle Proteasen einen Schlüsselprozeß für den Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf dar (Bach und Munch, 2000). Während sogenannter proteolytischer Kaskaden werden Proteine in Fragmente mit Hilfe von Proteinasen (Endopeptidasen) zerlegt. Diese Peptide dienen als Substrat der Exopeptidasen (z. B. Aminopeptidasen), die zur Bildung von Aminosäuren führen (Worm und Nybroe, 2001). Durch die Messung der hydrolytischen Aminopeptidase im Sediment wurde ein Enzym erfaßt, das zu über 95 % den Bakterien zuzuordnen ist (Chrost, 1991). Der Umsatz der proteolytischen Aktivität in Süßwassersystemen liegt meist in der gleichen Größenordnung wie die der  $\beta$ -Glukosidase und kann auf dem DOM-Pool bezogen werden, so daß die proteolytische Aktivität als repräsentativ für den enzymatischen Abbau von organischem Material im Sediment angesehen werden kann (Smith et al., 1992; Simon et al., 2000).

## **3 Untersuchungen zur Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft – ein kultivierungsunabhängiger Ansatz**

In der Vergangenheit waren Studien zur Diversität von natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften auf kultivierbare Mikroorganismen beschränkt. Aus diesem Grunde sind das Verständnis und das Wissen der Dynamik natürlicher mikrobieller Populationen auf eine kleine Fraktion von Zellen, die den Kultivierungstechniken zugänglich war, limitiert gewesen (Heuer und Smalla, 1997). Die jeweils kultivierten Bakterien sind abhängig von den speziellen Anreicherungsbedingungen im Labor. Die aus komplexen, natürlichen Habitaten isolierten Reinkulturen von Bakterien hatten numerisch und ökologisch keine Signifikanz zu den tatsächlich vorkommenden Bakterien in natürlichen, mikrobiellen Gemeinschaften (Hengstmann et al., 1999). Insgesamt konnten abhängig von dem jeweiligen Ökosystem nur 0,001 - 15 % der Gesamtzell-

zahl mit allgemeinen DNA-Färbenachweisverfahren mit kultivierungsabhängigen Isolierungsmethoden erfaßt werden (Amann et al., 1995).

Mittlerweile konnten sich neue molekulare Techniken, die auf der Isolierung der gesamten Nukleinsäuren basieren, gefolgt von der Amplifizierung ribosomaler 16S-rDNA- und -rRNA-Fragmente durchsetzen. Für diesen Ansatz werden 16S- und 23S-rRNA-Moleküle gewählt, da diese auf Grund ihrer universellen Verbreitung, ihrer funktionellen Konstanz, des Vorhandenseins von variablen und konservierten Regionen, der Vielzahl unabhängig voneinander mutierender Nukleotide und ihrer Größe gute phylogenetische Markermoleküle sind (Woese et al., 1987).

Die anschließende Analyse der Sequenzunterschiede im DGGE-Fingerprint (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) ermöglicht einen Vergleich zwischen den verschiedenen Proben. Die Identifizierung und phylogenetische Einordnung der Bakterien erfolgen durch Klonierung und Sequenzierung der Organismen (Heuer und Smalla, 1997).

Die Analyse von rDNA- und rRNA-Sequenzen ermöglicht eine Unterscheidung zwischen physiologisch aktiven und inaktiven Bakterien. So werden mit der Untersuchung der rDNA sämtliche, also auch tote und gering aktive Bakterien erfaßt (Josephson et al., 1993). Die Betrachtung der rRNA dagegen zielt auf die metabolisch aktiven Bakterien (Felske, 1999). Die relative Abundanz der rRNA repräsentiert die relative physiologische Aktivität der untersuchten Population, da sie ein Produkt der detektierbaren Zellen und des durchschnittlichen rRNA-Gehalts ist (Amann et al., 1995). Es wird angenommen, daß der rRNA-Gehalt der Bakterienzellen mit der Aktivität der Bakterien korreliert (Spring et al., 2000). Jedoch besitzen die verschiedenen Bakterienspezies eine unterschiedliche Anzahl von Kopien der rRNA-Operons (Klappenbach et al., 2000).

Die PCR-abhängige Analyse und Isolierung von 16S-rDNA und -rRNA alleine können jedoch zu methodeninhärenten Verfälschungen der Populationszusammensetzung führen, die durch die Auswahl des Protokolls der Zell-Lysis und der Nukleinsäureextraktion sowie durch diskriminierendes Primerannealing entstehen können (Wintzingerode et al., 1997). Weitere Artefakte bei der Klonierung stellen Polymerasefehler, sogenannte „Mutations-Hotspots“ und Heteroduplex- und chimäre Sequenzbereiche dar (Speksnijder et al., 2001). Aus diesem Grunde bietet es sich an, eine weitere Iso-

lierungs- und PCR-unabhängige Methode hinzuzuziehen: Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht es, einzelne Bakterien mit spezifisch fluoreszenzmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden direkt in der Probe nachzuweisen. Entsprechend der ausgewählten Zielsequenz können Sonden zur Detektion einzelner Arten und Bakteriengruppen eingesetzt werden (Amann et al., 1995; Amann, 1995). Da jedoch der zelluläre RNA-Gehalt vom physiologischen Status der Zelle abhängt, können bei Zellzählungen mit FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) die Populationen, deren rRNA-Gehalte aufgrund geringer Aktivität limitiert sind, unter der Nachweisgrenze liegen. Eine weitere Fehlerquelle stellt die beschränkte Zellpermeabilität mancher Bakterien dar (Amann and Ludwig, 2000).

#### **4 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der bakteriellen Population im Sediment unter Einfluß endokrin und toxisch wirksamer Substanzen in aquatischen Modellökosystemen. Als Modellchemikalie diente Nonylphenol. Als Modellökosysteme wurden aquatische Mikrokosmen eingesetzt. Diese Arbeit war in ein großes Querschnittsprogramm zur Untersuchung von ökotoxikologischen und östrogen-wirksamen Substanzen in aquatischen Lebensgemeinschaften am GSF-Forschungszentrum eingebettet.

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob sich unter dem Einfluß von Nonylphenol die Populationsstruktur sowie die Aktivität und Funktion der Sedimentmikroflora verändert. Zur Beschreibung der Bakterienpopulation wurde ein kultivierungsunabhängiger Ansatz gewählt, der die Analyse von 16S-rDNA- und -rRNA-Amplifikaten mit *in situ* Hybridisierung 16S-rRNA gerichteter Oligonukleotidsonden kombinierte. Als funktioneller Parameter diente die Proteaseaktivität.



## **B Material und Methoden**

### **1 Testsystem**

#### **1.1 Probenentnahme von Sediment und Wasser aus dem Ammersee**

Sediment und Wasser für die Mikrokosmen stammten aus dem nordwestlichen Uferbereich des Ammersees (Bayern, FRG) südlich der Gemeinde Schondorf. Anfang Mai 1998 wurde Wasser aus ca. 1 m Tiefe und Sediment aus den oberen Sedimentschichten (20 - 30 cm Tiefe) entnommen. Die durchschnittliche Wassertemperatur betrug im Mai 1998 13 °C und der durchschnittliche pH-Wert 8,3 (Sandmann, 2000). Eine Makrophytenkartierung beschreibt diesen Seeabschnitt als oligo-mesotroph (Melzer et al., 1988). Das Sediment der flachen Bucht besteht aus heller lehmartiger Seekreide (Severin-Edmaier, 2000).

#### **Durchführung:**

- Entnahme von ca. 800 l aeroben Sediments;
- Entfernung von größeren Partikeln durch Sieben des Sediments (Siebmaschenweite 63 µm);
- Mischen 2 min in einem Betonmischer;
- Schöpfen von ca. 3600 l Wasser aus dem Uferbereich aus ca. 1 m Tiefe;
- Filtration des Seewassers zur Entfernung von größerem Netzplankton durch eine Gaze (Maschenweite 63 µm);
- Entnahme von Zooplankton durch mehrere Zügen aus dem Litoralbereich;
- Aussortieren der Makroinvertebraten mit Hilfe eines 2 mm Siebs.

Durch die beschriebenen Vorbehandlungen von Wasser und Sediment sollten gleiche Ausgangsbedingungen in den Testsystemen (Mikrokosmen) erzielt und einseitige Räuber-Beute-Beziehungen verhindert werden.

## 1.2 Aufbau und Befüllung der Mikrokosmen

- Einsetzen von 11 zylindrischen Edelstahlbehältern ( $\varnothing$  80 cm, Höhe 60 cm) als Mikrokosmen in die Außenteichanlage;
- Befüllung der Mikrokosmen mit 50 l Sediment  $\cong$  10 cm Füllhöhe, anschließend mit 230 l Wasser  $\cong$  45 cm Füllhöhe auffüllen; insgesamt ca. 55 cm Füllhöhe von Sediment und Wasserkörper;
- Zusetzen des Zooplankton in ausreichender Dichte, nach optischem Abschätzen.

Die Mikrokosmen wurden in einer Außenteichanlage den natürlichen Witterungsschwankungen ausgesetzt. Ein fahrbares gläsernes Dach, das mit einem Niederschlagssensor ausgerüstet war, verhinderte Eintrag von Niederschlagswasser.



**Abb. B 1:** Außenteichanlage am Institut für Bodenökologie GSF-Forschungszentrum, Neuherberg mit Mikrokosmen im Vordergrund (Foto W. Jaser).

## 1.3 Controlled-Release Dosierung

Nonylphenol diffundiert aus semipermeablen LDPE-Schläuchen. Sie waren 2,5 cm breit und besaßen eine Membrandicke von 54  $\mu$ m mit einem Rückhaltevermögen von Molekülen mit  $M > 5000$  g/mol (ORIGO Hb, Taveljö, Schweden). Um die mit Nonylphenol gefüllten Schläuche vor Beschädigungen während der Probenentnahmen zu

schützen, wurden sie in perforierte Edelstahlbehälter in die Mikrokosmenmitte gehängt.

#### **1.4 Probenentnahme von Sediment aus den Mikrokosmen**

Zur Analyse wurden Sedimentkerne aus 0 - 1 cm Tiefe entnommen.

##### **Durchführung:**

- Ausstechen von vier Sedimentkernen, zufallsverteilt, mit Hilfe eines Plexiglasrohres ( $\varnothing$  3 cm);
- Sofortiges Verschließen des Rohrs mit einem Gummistopfen;
- Überführung auf ein Stativ;
- Vorsichtiges Absaugen des Wassers;
- Abschneiden der oberen Sedimentschicht mit einer Dicke von einem Zentimeter mit einem Sedimentschneider;
- Kurzzeitiges Zwischenlagern auf Eis;
- Gewinnung einer Mischprobe aus vier parallel entnommenen Sedimentkernen;
- Lagerung des Sediments (ca. 50 g FG) für die DNA-/RNA-Analyse auf Trockeneis bis zum Einfrieren bei  $-80\text{ °C}$ ;
- Fixierung von ca. 0,5 g FG Sediment mit Paraformaldehyd oder Ethanol (B 5.1);
- Aliquotierung der Mischprobe (ca. 5 g FG) zur Untersuchung des in der Probe befindlichen, gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC), Gesamtstickstoffs ( $N_{\text{Gesamt}}$ ) und Nonylphenols.

## **2 Chemische und physikalische Parameter**

### **2.1 Trockengewichtsbestimmung**

- Einwiegen von 0,5 g - 1 g feuchtem Sediment in vorgewogene, trockene Glaspetrischalen;
- Trocknung bei 105 °C, 24 h bis zur Gewichtskonstanz;
- Rückwiegen der getrockneten Proben;
- Bestimmung des Trockengewichts durch Abzug des Leergewichtes der Petrischalen (VDLUFA, 1991).

### **2.2 Redoxpotential**

Die Messung des Redoxpotentials des Redoxpotentials erfolgte im ersten Zentimeter des Sediments, jeweils in der Mikrokosmenmitte. Dabei wurde die Messung bis zur Konstanz der Werte durchgeführt, mindestens jedoch fünf Minuten. Vor der Untersuchung wurden die Sonde (Sensolyt PtA, Redox-Einstabmeßkette, WTW, Weilheim, FRG) und das Messgerät (ProfiLine pH 197, WTW, Weilheim, FRG) kalibriert. Dabei dienten vom Hersteller mitgelieferte Referenzlösungen als Eichlösungen für die Sonde.

### **2.3 Gesamtstickstoff**

Die getrockneten Sedimentproben (B 2.1) wurden aliquotiert, in Zinnkapseln (Lüdi AG, CH) eingewogen und der Gehalt an Gesamtstickstoff mit einem CN-Analyzer (NA 1500, Carlo Erba, Italien) gemessen. Dabei wurde die jeweilige Probe im O<sub>2</sub>-Strom bei Temperaturen über 1500 °C verbrannt und die dabei entstehenden nitrosen Gase wurden durch elementares Kupfer zu N<sub>2</sub> reduziert. Der in der Probe enthaltene Stickstoff wurde als N<sub>2</sub> in einem Gaschromatographen mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert (Jimenez, 2000).

### **2.4 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)**

Die Sedimentproben wurden mit 2 N HCl angesäuert und der gelöste anorganische Kohlenstoff und Kohlendioxid zuvor durch N<sub>2</sub>-Begasung ausgetrieben. Die quantitative Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) erfolgte mit einem

TOC-5050 (Shimadzu, Japan) durch die Verbrennung an einem Katalysator im O<sub>2</sub>-Strom und anschließende Bestimmung des gebildeten CO<sub>2</sub> mit einem Infrarotgasanalysator (Jimenez, 2000).

## **2.5 Nonylphenolgehalt**

Die Analyse des technischen Nonylphenolgehaltes im Sediment wurde am Institut für Ökologische Chemie (GSF-Forschungszentrum, Weihenstephan) nach einer modifizierten Methode von Veith and Kiwus (1977) durchgeführt (Pfister, unpublished).

## **3 Funktionelle Parameter**

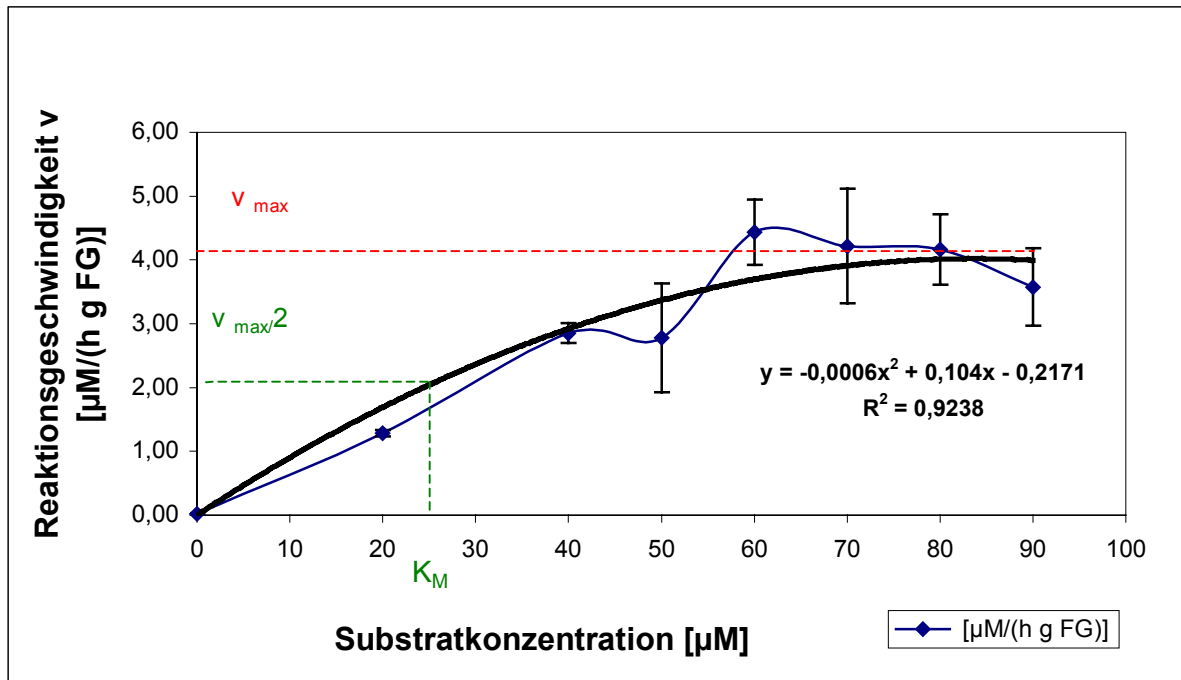
### **Bestimmung der Aminopeptidase - Aktivität**

#### **Prinzip:**

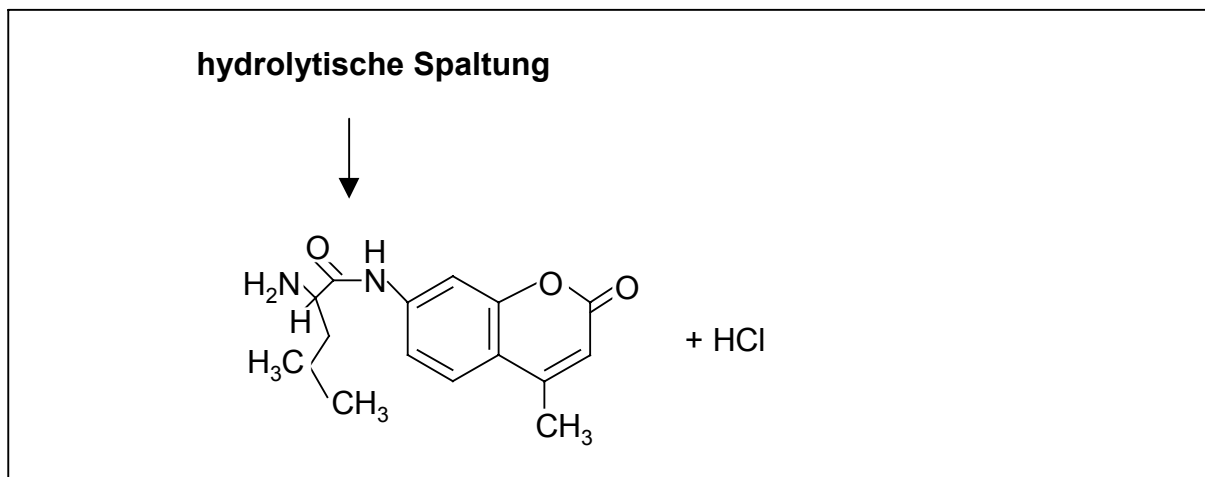
Die Bestimmung des enzymatischen Abbaus von organischer Substanz im Sediment durch die Aminopeptidase beruht auf einer Messung des umgesetzten Substratanalogons Leu-MCA (L-Leucin-4-Methyl-7-Coumarinylamid Hydrochlorid) im Photometer. Dafür besitzt das Modellsubstrat die gleichen strukturellen Eigenschaften wie natürliche Moleküle mit einer Peptidbindung (Hoppe et al., 1988). Peptidasen spalten die Peptidbindung des Modellsubstrats zwischen dem Carbonylkohlenstoff- und Amidstickstoff-Atom hydrolytisch (Abb. B 2). Der verbleibende, nun fluoreszierende Coumarinylamid-Ring wird fluorimetrisch im Photometer nachgewiesen.

Mit Hilfe einer Serie von ansteigenden Substratkonzentrationen kann die Enzymkinetik nach Michaelis-Menten (Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_M$ ) berechnet werden (Stryer, 1995).

In Vorversuchen zeigte sich ein maximaler Umsatz der Aminopeptidasen bei einer Substratkonzentration von 70  $\mu\text{M}$  Leu-MCA (Substratsättigung) und einer Inkubationszeit von einer Stunde (Abb. B 2).



**Abb. B 2:** Darstellung der Substratsättigungskurve und der Trendlinie  $y$  von Leu-MCA durch Sedimentbakterien  
 $v_{max}$ : maximale Geschwindigkeit,  $K_M$ : Michaelis-Konstante.



**Abb. B 3:** Modellsubstrat Leu-MCA (L-Leucin-4-Methyl-7-Coumarinylamid Hydrochlorid) die hydrolytische Spaltung erfolgt zwischen dem markierten C- und dem N-Atom durch Peptidasen.

## Lösungen:

### Stammlösung Leu-MCA (10 mM):

Leu-MCA (Fluka, Deisenhofen, FRG)	0,025	g
Methoxyethanol (Fluka, Deisenhofen, FRG)	100	µl
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	7,696	ml

Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C.

### Eichgerade AMC(10 mM):

AMC (Fluka, Deisenhofen, FRG)	0,1752	g
Methoxyethanol (Fluka, Deisenhofen, FRG)	100	µl
ad H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	10	ml

Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C.

### Sonstiges:

- 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 autoklaviert;
- Boratpuffer pH 10, (Merck, Darmstadt, FRG);
- Ethanol<sub>absolut</sub>, (Merck, Darmstadt, FRG).

## Durchführung:

- Entnahme von 0,5 g Feuchtsediment;
- Zugabe von Leu-MCA (Endkonzentration 70 µM) und 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2;
- Inkubation auf dem Schüttler eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur;
- Abstoppen der Reaktion mit 100 µl Boratpuffer, pH 10;
- Extraktion des produzierten MCA mit 2 ml Ethanol<sub>absolut</sub> ;
- Zentrifugation des Ansatzes 5 min bei 3000 x g zur Abtrennung des Sediments;
- Fluoreszenzmessung (Perkin Elmer, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm;
- Trockengewichtsbestimmung des eingesetzten Sediments (B 2.1).

Die Eichgerade wurde mit der Fluoreszenzmessung von AMC im Konzentrationsbereich von 0 - 10 µM bestimmt.

Zur Erfassung der Hintergrundfluoreszenz des Sediments wurde eine Blindprobe angesetzt. Sie wurde wie eine Vollprobe behandelt, jedoch mit dem Unterschied, daß die Enzymreaktion sofort mit Boratpuffer gestoppt und die Probe auf Eis gelagert wurde. Als interner Standard für die Enzymreaktionsmessungen bzw. Empfindlich-

keitsschwankungen diente der Umsatz einer Proteinase Unit von *Bacillus licheniformis* bei einer Substratkonzentration von 70  $\mu\text{M}$  Leu-MCA innerhalb von 20 Minuten.

## **4 Quantitative Bestimmung von Populationen**

### **4.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI nach Membranfiltration**

#### **Prinzip:**

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid, Sigma, Deisenhofen, FRG) bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA. Er kann zur Visualisierung der Gesamtzellzahl verwendet werden (Porter and Feig, 1980). Das Anregungsoptimum von DAPI liegt bei 365 nm und das Emissionsmaximum bei 418 nm. Durch den DAPI-DNA-Komplex fluoreszieren Zellen intensiv blau, während eine unspezifische Bindung von DAPI an andere Zellstrukturen sowie Sedimentpartikel und Polyanionen wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führt.

In Vorversuchen zeigte eine DAPI-Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eine optimale Signalintensität im Sediment.

#### **Lösungen und Materialien:**

##### DAPI-Stammlösung:

50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DAPI (Sigma, Deisenhofen, FRG) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli Q}}$  gelöst,  
Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt.

##### Sonstiges:

0,1 % (w/v) Na-Pyrophosphatpuffer, steril filtriert;  
0,1 % (w/v) Iminodiacetic (Ionenaustauscher, Sigma, Deisenhofen, FRG),  
steril filtriert; Polycarbonatfilter,  $\varnothing$  25 mm, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  (Nucleopore, Reichelet Chemietechnik, Heidelberg, FRG).



### Durchführung:

- Dispergieren der Mikroorganismen im Sediment in den fixierten Proben (B 5.1) im steril filtrierten 0,1 % Na-Pyrophosphatpuffer unter Zugabe von 0,1 % steril filtrierten Iminodiacetic, 30 sec im Ultraschallbad;
- Anfärbung der Mikroorganismen-DNA mit DAPI 10 min im Dunkeln (Endkonzentration 5 µg/µl);
- Überführung des Filters in eine sterile Petrischale und Trocknen bei Raumtemperatur, lichtgeschützt ;
- Durchführung derselben Prozedur ohne Zellsuspensionszugabe für die Nullprobe, wobei bei Durchsicht des Filters maximal 1 - 2 Bakterien zu detektieren waren.

## 4.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

### Durchführung:

- Einbetten der Polycarbonatfilter oder teflonbeschichteten Objektträger in Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd., London, UK);
- Auszählen der Proben bei 1000 x Vergrößerung unter UV-Anregung mit Hilfe eines Zähllokulars (10 (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen FRG) mit Plan-Neofluar-Objektiven 100 x/ x 10 Teilfelder, Zeiss, Oberkochen FRG) an einem Epifluoreszenz-Mikroskop 1,3 (Ölimmersion), 40 x/0,75 und 20 x/0,50.

Eine statistische Beurteilung erforderte die Auszählung von n mindestens 20 Feldern/Objektträger. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl (Probe)} - \text{Zellzahl (Nullprobe)}}{\text{Zahl der ausgezählten Felder}} * M * V$$

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

Der Wert des Mikroskopfaktors ist vom verwendeten Zähllokular abhängig und auf diesem vermerkt.

$$V = \text{Verdünnungsfaktor} = 1000 \mu\text{l}/x \mu\text{l Probe}$$

## 5 *In situ Einzelzellhybridisierung*

### 5.1 Fixierungsmethoden

#### 5.1.1 Paraformaldehydfixierung (PFA-Fixierung)

##### Prinzip:

Die Fixierung dient zur Erhaltung der Morphologie der Zellen und ermöglicht das Eindringen der Oligonukleotidsonde durch die Membran. Dazu werden die Zellen zunächst mit 4 % Paraformaldehydlösung und anschließend mit Ethanol versetzt. Paraformaldehyd führt zu einer Quervernetzung der Proteine. Für Gram-positive Bakterien ist wegen ihrer unterschiedlichen Zellwandstruktur eine zusätzliche Fixierung mit einem denaturierenden Agens (50 % Ethanol) nötig (Amann et al., 1995).

##### Lösungen:

###### PBS:

130 mM NaCl	7,6	g
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42	g
ad H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1	l
pH 7,4.		

Ethanol<sub>absolut</sub>

##### Durchführung:

Eine 4%ige Paraformaldehydfixierungslösung wurde nach Amann et al., 1990, wie folgt hergestellt:

- Erhitzen von 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 60 °C;
- Einwiegen von 2 g Paraformaldehyd;
- Zutropfen weniger Tropfen einer 1 M NaOH-Lösung zur vollständigen Lösung des Paraformaldehyds ;
- Zugabe von 16,6 ml 3-fach konzentriertem PBS;
- Einstellung des pH-Werts auf 7,2 mit einer 1 M HCl Lösung;
- Sterilfiltration der hergestellten Lösung mittels eines 0,2 µm Einwegfilters; (Satorius, Göttingen, FRG), Gesamtvolumen ca. 50 ml;
- Lagerung bei -20 °C oder für höchstens 2 Tage bei 4 °C.

### **Fixierung der Sedimentproben mit Paraformaldehyd:**

- Mischen von 3 Teilen (v/v) der 4%igen Paraformaldehydfixierungslösung mit 1 Teil Sedimentprobe;
- Inkubation 30 min bis 12 h bei 4 °C;
- Zentrifugation der Sedimentsuspension bei 12000 x g für 5 min;
- Waschen mit PBS und erneute Zentrifugation;
- Resuspendieren in PBS;
- Versetzen mit dem gleichen Volumen eiskalten Ethanol;
- Lagerung der im Sediment fixierten Zellen bei -20 °C.

#### **5.1.2 Ethanolfixierung:**

- Versetzen der Sedimentsuspension mit eiskaltem Ethanol <sup>absolut</sup> im Verhältnis 1:1 und Lagerung bei -20 °C.

### **5.2 *In situ* Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden**

#### **Prinzip:**

Die *in situ* Hybridisierung bietet die Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung einzelner bakterieller Gruppen bezogen auf die Gesamtzellzahl an Bakterien (DAPI). Da neben der Permeabilisierung eine hohe Zahl von Zielmolekülen (rRNA) nötig ist, werden durch die *in situ* Hybridisierung nur aktive Zellen mit hohem Ribosomengehalt erfaßt (Amann et al.,1995).

Dafür werden 16S-rRNA- oder 23S-rRNA-gerichtete fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlich stark konservierten Sequenzbereiche der ribosomalen RNA ist es möglich, spezifisch fluoreszenzmarkierte Sonden auf unterschiedlichen phylogenetischen Niveaus *in situ* einzusetzen und damit die Zielzellen zu visualisieren (Amann et al.,1995).

Die verwendeten Oligonukleotidsonden mit ihrer Spezifizierung sind in Tabelle B.1 aufgeführt.

**Tab. B 1: Spezifizierungen der eingesetzten 16S- und 23S-rRNA-Oligonukleotidsonden**

Bindungsposition; % Formamidkonzentration (FA); NaCl-Konzentration und Volumen im Waschpuffer; Waschung bei 48 °C; Hybridisierung bei 46 °C.

<sup>a)</sup> Position bezogen auf die *E. coli*-Sequenz (Brosius et al., 1981)

Sonde	Zielorganismus	Bindungsposition <sup>a)</sup> (rRNA-Position)	[%] FA <i>in situ</i>	[NaCl] in mM im Waschpuffer	µl 5 M NaCl auf 50 ml Waschpuffer	Referenz
EUB 338	<i>Bacteria</i>	16S, 338-355	0	900	9000	Amann et al., 1990
ALF 1b	<i>α-Proteobacteria</i> , einige Vertreter der <i>δ-Proteobacteria</i> , viele Spirochaeten	16S, 19-35	20	225	2150	Manz et al., 1992
BET 42a	<i>β-Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	35	80	700	Manz et al., 1992
GAM 42a	Kompetitorsonde zu BET 42a <i>γ-Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043 23S, 1027-1043	35 35	80 80	700 700	Manz et al., 1992 Manz et al., 1992
CF 319a+b	Kompetitorsonde zu GAM 42a <i>Cytophaga-Flexibacter</i> - Subphylum	23S, 1027-1043 16S, 319-336	35 35	80 80	700 700	Manz et al., 1992 Manz et al., 1996
HGC 69a	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA	23S, 1901-1918	35	80	700	Roller et al., 1994
LGC 345a+b+c	Gruppe innerhalb der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA	16S, 354-371	20	225	2150	Meier, 1997

### 5.3 Beschichtung der Objektträger mit Gelatine

#### Prinzip:

Die Beschichtung der Objektträger mit Gelatine minimierte das Abspülen der Zellen durch die Hybridisierungsprozedur.

#### Lösungen und Materialien:

Objektträger, teflonbeschichtet mit 6 Aussparungen (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim, FRG);

#### Gelatine-Lösung

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

#### Durchführung:

- Tauchen der sauberen, entfetteten, teflonbeschichteten Objektträger langsam in die noch warme Gelatinelösung;
- Herausnehmen;
- Trocknen bei Raumtemperatur.

### 5.4 Hybridisierungsprozedur

#### Lösungen:

##### Hybridisierungspuffer:

deionisiertes Formamid	x	µl
5 M NaCl (0,9 M)	360	µl
1 M Tris-HCl, pH 8 (20 mM)	40	µl
10 % SDS, sterilfiltriert, 0,01% (Natriumlaurylsulfat)	2	µl
ad H <sub>2</sub> O <sub>steriles Milli Q</sub>	2	ml.

##### Waschpuffer:

1 M Tris-HCl, pH 8 (20 mM)	1	ml
10 % SDS, sterilfiltriert, 0,01% (Natriumlaurylsulfat)	50	µl
5 M NaCl	x	µl
0,5 M EDTA (5 mM, ab 20 % FA)	500	µl
ad H <sub>2</sub> O <sub>steriles Milli Q</sub>	50	ml.

Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers wurde je nach benötigter Stringenz durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen Formamid (Merck, Darmstadt, FRG) modifiziert. Im Waschpuffer wurde die identische Stringenz durch die Variation der NaCl-Konzentration eingestellt, um große Abfallmengen an Formamid zu vermeiden (Tab. B 1).

Beim Einsatz der Oligonukleotidsonde BET 42a für  $\beta$ -Proteobacteria oder der GAM 42a für  $\gamma$ -Proteobacteria war eine Kompetitorsonde erforderlich. Die Oligonukleotidsonde BET 42a unterscheidet sich nur um eine Base von GAM 42a. Um eine Fehlhybridisierung oder falsch positive Hybridisierung zu vermeiden wurde eine unmarkierte Sonde eingesetzt, die mit derselben 16S-rRNA-Region der nicht gewünschten Bakteriengruppe hybridisierte. Gleichzeitig wurde eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet, die mit der 16S-rRNA-Region der zu untersuchenden Zielorganismen spezifisch hybridisierte. Somit war das Fluoreszenzsignal nur an der gesuchten Bakterienpopulation zu detektieren.

Die Markierung der Oligonukleotidsonden erfolgte - außer beiden Kompetitorsonden - mit Cy 3 (5,5'-Disulfo-1,1'-( $\gamma$ -carbopentynyl)-3,3,3', 3'-tetramethylindolocarbo-cyanin-N-hydroxysuccinimidester). Das Anregungsmaximum betrug 554 nm, das Emissionsmaximum 570 nm.

### **Durchführung:**

- Pipettieren von 1 - 30 µl, je nach Zelldichte, der fixierten Umweltprobe auf die Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers;
- Trocknen bei 46 °C;
- Tauchen des Objektträgers 3 min in eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 80 %, 96 %) zur Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen;
- Pipettieren 8 µl des Hybridisierungspuffers mit 1 µl des markierten Oligonukleotids (Konzentration 20 - 50 ng/µl) auf jedes Feld und Vermischen;
- Einsetzen der Kompetitorsonden im Verhältnis 1:1 zum fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid ;
- Überführen des Objektträgers in ein 50 ml Probengefäß, das mit 2 ml Hybridisierungspuffer und mit befeuchtetem Zellstoff für eine feuchte Kammer ausgelegt ist;
- Horizontale Inkubation des Objektträgers in verschlossenen Probengefäßen für 1,5 - 2 h bei 46 °C;
- Abspülen des Objektträgers mit 1 ml 48 °C warmem Waschpuffer;
- Überführen der Probe in ein mit Waschpuffer gefülltes Probenröhrchen, das auf 48 °C erwärmt ist;
- Waschen bei 48 °C für 15 min;
- Vorsichtiges Abspülen des Objektträgers mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und Trocknen bei Raumtemperatur.

### **5.5 Bestimmung relativer Populationsanteile nach der *in situ* Hybridisierung und DAPI-Färbung**

Zur Bestimmung des Verhältnisses der Zahl der fluoreszenzmarkierten Zellen zur Gesamtzellzahl wurde im Anschluß an die Einzellhybridisierung mit DAPI (c = 1 µg/l) nachgefärbt.

### **Durchführung:**

- Beschichtung der Felder auf dem Objektträger mit 10 µl DAPI-Lösung ;
- Inkubation 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur;
- Vorsichtiges Abspülen des Objektträgers mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>;
- Lufttrocknen des Objektträgers im Dunkeln und Einbetten in Citifluor.

### **Mikroskopische Auswertung:**

Die hybridisierten und die DAPI-gefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines Zähllokulars (Zeiss, Oberkochen, FRG) ausgezählt. Da die Fluoreszenzfarbstoffe unter UV-Licht schnell ausbleichen, wurden zuerst die spezifischen Hybridisierungen und dann die DAPI-Färbung ausgewertet. Es wurden jeweils mindestens 20 zufällig ausgewählte Felder ausgezählt.

## **6 Nukleinsäureisolierung**

### **6.1 Isolierung von rRNA**

#### **Vorsichtsmaßnahmen:**

Wegen der besonderen Stabilität und der Aktivität der Ribonukleasen wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit RNA ergriffen (Farrell, 1993). Glaswaren wurden mindestens 2 h bei 200 °C erhitzt. Autoklavierbare Lösungen wurden mit 0,1%igem DEPC (Diethylpyrocarbonat, Sigma, Deisenhofen, FRG) versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die RNasen in den Lösungen zerstört. Anschließend wurden die Lösungen zur Inaktivierung von DEPC autoklaviert. Lösungen, die Amine enthielten, wurden nicht mit DEPC behandelt. Es wurde mit puderfreien Handschuhen gearbeitet und Plastikware doppelt autoklaviert. Zur Anwendung kamen gestopfte Spitzen. Alle Geräte wurden gut gereinigt und mit DEPC behandeltem Wasser ausgespült.



## **6.2 rRNA- und DNA-Isolierung aus Sediment nach Oelmüller et al. (1990; modifiziert)**

### **Prinzip:**

Die Gesamtnukleinsäureextraktion basierte auf einer Zellysis im Homogenisator, unter dem Einsatz von Glasperlen und dem Detergens SDS (Natriumlaurylsulfat). Die Proteinextraktion erfolgte mit einer Phenol-Chloroform-Behandlung.

Bei der Isolierung von rRNA aus Sediment wurde das aliquotierte Sediment schnellst-möglich in einem ERG auf Eis gelagert, in dem das Phenol-Chloroform-AE-Puffer-SDS-Gemisch bereits vorgelegt war. Dies bewirkte eine besonders wirkungsvolle Inaktivierung der Ribonukleasen (Schulze, 1999).

### **Materialien und Lösungen:**

HomogenisiergefäÙe (Braun, Melsungen, FRG), 2 h bei 200 °C gebacken;

Homogenisator (Braun, Melsungen, FRG);

Plastiktrichter mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub> ausgespült;

Glasperlen (0,17 - 0,18; Braun, Melsungen, FRG);

DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub>;

AE-Puffer 20 mM Natriumacetat, pH 5,5;

Roti®-Phenol-Chloroform-Lösung (Roth, Karlsruhe, FRG);

Roti®-Phenol-Lösung (Roth, Karlsruhe, FRG);

25 % (w/v) Natriumlaurylsulfat (SDS) steril filtriert;

Natriumacetat-Lösung 3 M Natriumacetat, pH 5,2;

96 % Ethanol (Merck, Darmstadt, FRG);

70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, FRG);

RNase-Inhibitor 40 Units/µl (Roche, Penzberg, FRG).

### **Durchführung:**

- Zerteilen des gefrorenen Sediments in ca. 5 g-Stücke mit einer vorher gereinigten und abgeflamten Säge;
- Zügige Überführung der Sedimentsuspension in auf Eis gelagerte Homogenisierungsgefäße;
- Zugabe von 1 Vol AE-Puffer, 1 Vol Phenol-Chloroform-Lösung, 1/10 Vol SDS und 1 Vol Glasperlen;
- 2 min Homogenisieren bei Raumtemperatur;
- Zentrifugation der lysierten Zellen zur Phasentrennung bei 3000 x g, 4 °C für 10 min;
- Abheben der oberen, wäßrigen nukleinsäurehaltigen Phase und diese mit 1 Vol Phenol versetzen, erneut zentrifugieren;
- Wiederholen dieser Prozedur 2 - 3 mal, bis keine deutliche Interphase mehr sichtbar ist;
- Fällung der oberen, wässrigen, Phase mit 1/10 Vol Natriumacetat-Lösung und 2 Vol 96 % Ethanol über Nacht bei -20 °C;
- Zentrifugation des Nukleinsäuregemisches bei 4 °C, 10 000 x g, 15 min;
- Waschen des Zellpellets in 5 ml 70%igen Ethanol und erneute Zentrifugation;
- Vorsichtiges Abpipettieren des Ethanols;
- Trocknen des Pellets ca. 1 - 2 h bei Raumtemperatur;
- Aufnahme des Pellets in 50 µl DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub>;
- Hinzufügen von 1 µl (40 Units/µl) RNase-Inhibitor (Roche, Penzberg, FRG) und Portionierung des Nukleinsäuregemisches;
- Lagerung bei -20 °C.

## **7 Analyse der Nukleinsäuren**

### **7.1 Agarose-Gelelektrophorese**

#### **Prinzip:**

Zur Überprüfung von DNA-/rRNA-Präparationen oder Fragmenten diente die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001). Die Nukleinsäuren wurden dabei innerhalb eines elektrischen Feldes in der Agarosematrix ihrer Größe nach aufgetrennt.

## Lösungen und Materialien:

Agarose (Biomzym, Hess. Oldendorf, FRG);

### 50 x TAE-Puffer, pH 8,0:

2 M Tris-HCl	242	g
0,05 M Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	18,61	g
Eisessig	57,1	ml
ad H <sub>2</sub> O	1	l.

### Ethidiumbromidlösung:

Endkonzentration in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1,5	µg/ml.
---	-----	--------

### Auftragspuffer pH 8,0:

0,25 % Bromphenolblau (w/v)  
0,25 % Xylencyanol (w/v)  
15 % Ficoll 400 (w/v)  
50 mM EDTA.

### Apparatur:

Horizontal Gel Electrophoresis System BRL, Rockville, USA.

## Durchführung:

- Lösen von 1 - 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle;
- Mischen der Proben mit 1/10 Vol Auftragspuffer;
- Elektrophoretische Auftrennung bei maximal 120 mA ca. 2 h bei konstanter Stromstärke;
- Färbung des Gels ca. 30 min mit Ethidiumbromid;
- Visualisierung des Nukleinsäuregemisches mit UV-Licht bei 254 nm und Dokumentation.

## 7.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde ein Aliquot einer Nukleinsäurelösung in einem Spektralphotometer (UV-1202 Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, FRG) bei 260 nm vermessen (Clark und Swika, 1977). Für die

Konzentrationsberechnung gelten näherungsweise folgende Zusammenhänge (Cryer et al., 1975):

doppelsträngige DNA	1 OD <sub>260</sub>	≅	50 µg/ml
einzelsträngige DNA	1 OD <sub>260 oligo</sub>	≅	20 µg/ml
einzelsträngige RNA	1 OD <sub>260</sub>	≅	40 µg/ml

OD = optical density

Die Reinheit einer DNA-Lösung kann anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) und 280 nm (OD<sub>280</sub>) überprüft werden. Bei einer reinen DNA-Probe liegt der Quotient aus (OD<sub>260</sub>)/(OD<sub>280</sub>) bei 1,8 - 2,0. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen, höhere auf eine Verunreinigung mit RNA hin (Sambrock und Russell, 2001).

## **8 *In vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR**

### **Prinzip**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Ehrlich et al., 1988) ist ein enzymatisches Verfahren, das zur *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte dient. Zwei Oligonukleotid-Primer hybridisieren mit der komplementären Matrizen-DNA und flankieren die zu amplifizierende Zielsequenz. Diese kann wenige bis mehrere tausend Basenpaare lang sein. Die PCR umfaßt drei Schritte:

1. Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA;
2. Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die Zielsequenz (Annealing);
3. Verlängerung der 3'-Enden der gebundenen Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase

## 8.1 DNA-Polymerasen

- **Goldstar™ Red** (Eurogentec, Seraing, Belgien):  
Thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus spec.*, besitzt eine 5'→3' Exonukleaseaktivität, die Nukleotide vor der Polymerase abbaut. Zusätzlich produziert sie 3'-dA-Überhänge.
- **AmpliTaq® DNA Polymerase, Stoffel Fragment** (Perkin Elmer, USA):  
Thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die eine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt, d. h., die am 3'-Ende falsch angehefteten gepaarten Nukleotide werden entfernt. Zusätzlich läßt die größere Hitzestabilität eine höhere Denaturierungstemperatur zu, so daß sich diese Polymerase besonders für die Amplifikation von GC-reichen Templaten oder komplexen Sekundärstrukturen eignet.

## 8.2 Amplifikation der 16S-rDNA-Teilsequenzen

### Prinzip:

Es wurden Teilsequenzen der 16S-rDNA aus Umwelt-DNA amplifiziert. Über die Vorwärtsprimer wurde zusätzlich eine GC-reiche Region eingeführt, damit die doppelsträngige DNA im DGGE-Gel durch den Harnstoff-Formamidgradienten nicht vollständig aufgetrennt werden konnte. Die folgenden Schritte zur Präparation wurden gering modifiziert nach Bergmüller (persönliche Mitteilung) übernommen.

Der Reaktionsansatz für Sediment DNA mit AmpliTaq® DNA Polymerase, Stoffel Fragment (Perkin Elmer, USA) besteht aus folgenden Materialien:

Reaktionspuffer (10 x)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	µl
Nukleotidlösung 10 mM (Roche, Penzberg, FRG)	0,5	µl
Primer F-968-GC (10 µM)	1	µl
Primer R-1401 (10 µM)	1	µl
DMSO (Sigma, Deisenhofen, FRG) 100 %	2,5	µl
BSA (Sigma, Deisenhofen, FRG) 3 %	5	µl
DNA (0,1 ng - 1 µg)	x	µl
Polymerase (10 U/µl)	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50	µl.

**Durchführung:**

- Pipettieren der Reaktionsansätze in ein 0,5 ml ERG;
- Mitführen einer Kontaminationskontrolle ohne Zugabe von DNA bei jedem Amplifikationsexperiment sowie eine Positivkontrolle mit Reinkultur-DNA;
- Amplifikation in einem PCR-Cycler (Trio, Biometra, Göttingen, FRG) mit folgendem Temperaturprogramm:

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Phase</i>	<i>Anzahl der Zyklen</i>
95 °C	10 min	Hotstart <sup>1)</sup>	1
80 °C	Pause	Einpipettieren der Polymerase	1
94 °C	1 min	Denaturierung	} 25 - 27 x <sup>3)</sup>
54 °C	1 min	Annealing <sup>2)</sup>	
72 °C	1 min	Elongation <sup>4)</sup>	
72 °C	10 min	abschließende Elongation	1
4 °C	Pause.		

<sup>1)</sup> Hotstart:

Der „Hotstart“ soll die Primerverlängerung von unspezifisch gebundenen Primern verhindern (Chou et al., 1992). Die Polymerase wird erst nach dem ersten Denaturierungsschritt einpipettiert.

<sup>2)</sup>  $T_{An}$  – optimale Annealingtemperatur eines Primers:

Sie ist abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers und liegt meist einige Grad Celsius über der Dissoziationstemperatur  $T_D$ , wobei  $T_D$  nur ein ungefährender Wert ist. Davon ausgehend muß  $T_{An}$  empirisch ermittelt werden.

Formel zur Berechnung von  $T_D$  (Sambrook und Russell, 2001):

$$T_D (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

A, T, C, G – Anzahl der jeweiligen Basen im Oligonukleotid.

<sup>3)</sup> je nach Intensität.

<sup>4)</sup> Die Elongationsdauer ist abhängig von der Basenpaarlänge des Amplifikats. Bei einer Länge von 150 bp - 500 bp wurde eine Elongationsdauer von 1 min gewählt.

- Überprüfung der PCR Amplifikate in einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. B 7.1).
- Der Ansatz für Reinkultur-DNA zur Herstellung von Standards für DGGE wurde in wenigen Punkten im Vergleich zum Reaktionsansatz für Sediment-DNA verändert:
  - Erhöhung des MgCl<sub>2</sub> auf eine Endkonzentration von 3 mM;
  - Verzicht auf die Zugabe von BSA.

### Verwendete Oligonukleotidprimer:

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von Interactiva (Ulm, FRG) bezogen und sind in Tabelle B 2 aufgeführt. Sie amplifizieren eine hoch konservierte 16S-rRNA-Region der Prokaryonten (Felske et al., 1996).

**Tab. B 2:**                      **16S-rRNA spezifische Oligonukleotidprimer**  
 F: „Vorwärts-Primer“, bindet an den (-) Strang;  
 R: „Rückwärts-Primer“ bindet an den (+) Strang;  
 \* F-968-GC und \*R-1401 publiziert bei Nübel et al., 1996.  
<sup>a)</sup>Position bezogen auf die E. coli-Sequenz (Brosius et al., 1981).

Primer	Bindungsstelle <sup>a)</sup>	Sequenz
* F-968-GC	968 - 984	5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC3'
* R-1401	1385 - 1401	5'CGGTGTGTACAAGGCC3'

## 8.3 Reverse Transkription

### 8.3.1 DNA-Verdau

#### Lösungen:

DNase I , 10 U/μl (Roche, Penzberg, FRG)

#### Durchführung:

DNA/RNA-Gemisch	5	μl
DNase I , 10 U/μl	1	μl.

- Inkubation 30 min bei 4 °C;
- Denaturieren 3 min bei 94 °C.

### 8.3.2 Einschritt-RT-PCR

#### Prinzip:

Um RNA mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen, hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) und einer anschließenden PCR eine komplementäre DNA (cDNA). Bei der Einschritt RT-PCR wird eine Polymerase verwendet, die sowohl RNA als auch DNA als Matrize akzeptiert. Damit wird nur eine Polymerase benötigt und die Reaktion kann in einem Gefäß ablaufen. Für die Einschritt-Reverse Transkription wurde die hitzestabile *T. thermophilus*-( $T_{th}$ )-DNA-Polymerase verwendet.

#### Material und Lösungen:

- $T_{th}$  5 U/ $\mu$ l (Roche, Penzberg, FRG);
- 5 x RT-PCR-Puffer (Roche, Penzberg, FRG);
- 25 mM MnOAC (Roche, Penzberg, FRG);
- Nukleotidlösung 10 mM (Roche, Penzberg, FRG);
- Vorwärtsprimer F-968-GC (50 pmol/ $\mu$ l);
- Rückwärtsprimer R-1401 (50 pmol/ $\mu$ l);
- RNase und DNase freies H<sub>2</sub>O (Sigma, Deisenhofen, FRG).

#### Durchführung:

##### Mastermix 1 (M 1)

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Nukleotidlösung	1,5 $\mu$ l	300 $\mu$ M
Vorwärtsprimer F-968-GC	0,45 $\mu$ l	450 nM
Rückwärtsprimer R-1401	0,45 $\mu$ l	450 nM
Template-RNA	x $\mu$ l	0,1ng - 1 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O		ad 25 $\mu$ l.



**Mastermix 2 (M 2)**

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
RT-PCR-Puffer	10 µl	1 x
Mn(OAc) <sub>2</sub>	5 µl	2,5 mM
T <sub>th</sub> -Polymerase	1 µl	5 U
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl.

Zusammenpipettieren von M1 und M2 in ein ERG mit Endvolumen 50 µl und Anwendung des folgenden Temperaturprofils:

Temperatur	Dauer	Phase	Anzahl der Zyklen
60 °C	30 min	RT-Reaktion	1 x
94 °C	1 min	Denaturieren	1 x
94 °C	0,5 min	Denaturieren	} 35 x
46 °C	30 sec	Annealing	
72 °C	45 sec	Elongation	
72 °C	7 min	Elongation	1 x.

**8.3.3 Zweischnitt-RT-PCR****Prinzip:**

Bei der Zweischnitt-Reverse-Transkriptase-(RT)-PCR werden zwei Polymerasen verwendet. Zuerst wird die RNA mit einer Reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese), die nur RNA als Matrize akzeptiert. Anschließend erfolgt in einem zweiten Schritt die Vervielfältigung der cDNA mit einer DNA abhängigen Polymerase. Dafür wurde die Reverse Transkriptase aus einer genetisch veränderten Variante der *Moloney Murine Leukaemia* (M-MuLV-RT, Expand Reverse Transkriptase<sup>TM</sup>; Roche, Penzberg, FRG) eingesetzt.

### **Materialien und Lösungen:**

Expand Reverse Transkriptase <sup>TM</sup> (Roche, Penzberg, FRG);  
Puffer RT 5 x (Roche, Penzberg, FRG);  
100 mM DTT (Roche, Penzberg, FRG);  
dNTP 10mM (Roche, Penzberg, FRG);  
RNase Inhibitor (Roche, Penzberg, FRG);  
Vorwärtsprimer;  
Rückwärtsprimer;  
Taq Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien) ;  
Puffer 10 x (Eurogentec, Seraing, Belgien);  
MgCl<sub>2</sub>;  
RNase und DNase freies Wasser (Sigma, Deisenhofen, FRG).

### **PCR-Zusätze:**

T4 gene 32 proteine (Roche, Penzberg, FRG);  
DMSO (Sigma, Deisenhofen, FRG);  
BSA (Rinder Serum Albumin, Sigma, Deisenhofen, FRG).

### **Negativkontrolle:**

Als Negativkontrolle wurde das nach B 6.2 isolierte Nukleinsäuregemisch eingesetzt. Die DNA wurde mit dem Enzym DNase I (Roche, Penzberg, FRG) 30 min bei 4 °C verdaut, so daß nur rRNA übrig blieb. Der Erststrangsyntheseansatz erfolgte ohne Zugabe von Reverser Transkriptase und wurde beim Zweitstrangsyntheseansatz wie eine Vollprobe behandelt. Nur nach negativem Ergebnis dieser Kontrolle wurden die übrigen Sedimentproben der weiteren Analyse unterzogen.

### **Durchführung:**

Die RT-PCR gliederte sich in folgende Schritte:

- a) DNA-Verdau (B 8.3.1),
- b) Denaturieren und Primerannealing,
- c) cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase (Erststrangsynthese),
- d) Zweitstrangsynthese.

Im einzelnen:

b) Denaturieren und Primerannealing:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
RNA	1 - 4 $\mu$ l	ca. 1 $\mu$ g
Rückwärtsprimer	x $\mu$ l	50 pM
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	

Denaturieren 10 min bei 65 °C und anschließend die Reaktion auf Eis abstoppen.

c) cDNA-Synthese mittels Reverse Transkriptase (Erststrangsynthese):

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Puffer RT 5 x	4 $\mu$ l	1 x
100 mM DTT	2 $\mu$ l	10 mM
d NTP 10mM	2 $\mu$ l	1 mM
RNase Inhibitor 50U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	50 U
BSA 3%	5 $\mu$ l	0,375 %
T4 gene 32 proteine	1 $\mu$ l	
RT 50 U/ml	1 $\mu$ l	50 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	

Erststrangsynthese 1 h bei 42 °C.

d) Zweitstrangsynthese**M1**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
dNTP 10mM	1 $\mu$ l	0,2 mM
Vorwärtsprimer	x $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Rückwärtsprimer	x $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
cDNA	1 - 4 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l.	

**M2**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Puffer 10 x	5 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub>	6 $\mu$ l	2,5 mM
DMSO	2,5 $\mu$ l	5 %
Taq Polym. (Eurogentic)	1 $\mu$ l	1,5 U
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l.	

Pipettieren zweier separater Mastermixe M1 und M2 auf Eis;

Anschließend M1 und M2 in ein gemeinsames ERG überführen und Temperaturprofil aus B 8.2 anwenden.

**8.4 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit dem QIAquick-PCR-Purification Kit (Quiagen, Hilden, FRG). Gebrauchsfähige Puffer wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei absorbiert die DNA in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration und bei einem pH-Wert > 7,5 an eine Silika-Gel-Membran. Kontaminationen passieren diese Membran oder werden durch einen Waschschrift entfernt. Die Elution der DNA erfolgte in 30  $\mu$ l EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

**8.5 Verdau von Überhängen****Prinzip:**

Mung Bean Nuklease verdaut verbleibende 5'- und 3'-Überhänge des PCR-Produkts, so daß „blunt ends“(stumpfe) Enden entstehen (Henikoff, 1984).

### **Materialien:**

Mung Bean Nuclease Kit 105 U/μl (Stratagene, Belgien)  
Loading Buffer (Sigma, Deisenhofen, FRG)

### **Durchführung und Reaktionsansatz:**

- Verdünnen der Mung Bean Nuclease vor dem Einsatz mit Dilution Buffer 1:50.

#### Reaktionsansatz

PCR-Produkt	15	μl
Mung Bean Puffer (10x)	3	μl
Mung Bean Nuclease (1:50)	1,5	μl
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	ad 30	μl.

- Verdau bei 37 °C für 10 min;
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 μl Loading Buffer.

## **9 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)**

### **Prinzip:**

DGGE trennt DNA-Fragmente gleicher Länge, jedoch unterschiedlicher Sequenz auf. Die Auftrennung beruht auf der abnehmenden elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit eines doppelsträngigen DNA-Stranges in einem Polyacrylamidgel, das einen linearen Gradienten eines Denaturierungsmittels, beispielsweise Harnstoff und Formamid, enthält (Muyzer and Smalla, 1998). Die Aufschmelzung mit zunehmendem Denaturierungsgrad der DNA-Fragmente vollzieht sich aufgrund unterschiedlicher Schmelzdomänen innerhalb der Basensequenz. Domänen mit hohem GC-Gehalt zeigen ein anderes Wanderungsverhalten als Domänen mit niedrigem GC-Gehalt. Mit einer GC-reichen Sequenz (40 - 45 Basen), bei der eine GC-Klammer über eine PCR am 5'Ende des Vorwärtsprimers assoziiert ist, verhindert die komplette Strangtrennung während der Elektrophorese.

Es wurde ein Harnstoffgradient im Bereich von 45 % - 62 % eingesetzt. Für die Untersuchungen von Proben mit dem eingesetzten Primerpaar F-968-GC/R-1401 in der Umweltprobe wurde dies als optimal im perpendikulären Gel ermittelt (Suhadloc et al., 2000). Die Polyacrylamid-(PAA)-Konzentration betrug 6 %.

### Materialien und Lösungen:

D GENE® (Bio-Rad, München, FRG);

Glasplatten: 16 x 20 cm und 18 x 20 cm pro Gel;

Spacer: 1 mm;

Kamm mit 25 Taschen: 1 mm;

Gradientenmischer: 50 ml (Hoefer, Pharmacia, San Francisco, USA);

Peristaltikpumpe (Ismatec, Zürich, CH);

100 kb-Ladder (MBI Fermentas, St. Leon, FRG);

40 % Polyacrylamid (PAA) 37,5:1 (Bio-Rad, München, FRG);

50 x TAE (B 7.1);

40 % Formamid (Amresco, Ohio, USA);

7M Harnstoff (Sigma, Deisenhofen, FRG);

Ammoniumpersulfat (APS; Sigma, Deisenhofen, FRG);

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED; Sigma, Deisenhofen, FRG);

Probenauftragspuffer (B 7.1);

H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub>.

### Durchführung:

- Waschen der Glasplatten mit Geschirrspülmittel und H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, anschließend Säubern mit Ethanol<sub>absolut</sub> ;
- Zusammensetzen der Glasplatten und Spacer zu einer Gelkassette nach Angaben des Herstellers;
- Imprägnieren der Glasplatten mit Gelglide (Bio-Rad, München, FRG)
- Zusammenpipettieren und Lagerung der Denaturierungsstammlösungen bei 4 °C wie folgt:

#### 0 % Denaturierungslösung:

6 % PAA, 37,5:1	40 % PAA	15	ml
1 x TAE-Puffer	50 x TAE	2	ml
ad H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>		100	ml.

100 % Denaturierungslösung:

6 % PAA, 37,5:1	40 % PAA	15	ml
40 % Formamid		40	ml
7 M Harnstoff		42	g
1 x TAE-Puffer	50 x TAE	2	ml
ad H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>		100	ml.

APS-Lösung:

10 % Ammoniumpersulfat (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub>.

Dye-Solution:

0,5 % Bromphenol Blau (w/v)

0,5 % Xylene Cyanol (w/v)

1 x TAE-Puffer.

Gellösungen zur Erstellung eines 45% - 62%igen Harnstoffgradienten für ein paralleles Gel:

45 % - Lösung:

0 % Denaturierungslösung	6,6	ml
100 % Denaturierungslösung	5,4	ml
APS (10 %)	50	µl
TEMED	10	µl.

62 % - Lösung

0 % Denaturierungslösung	4,6	ml
100 % Denaturierungslösung	7,4	ml
Dye-Solution	30	µl
APS (10 %)	50	µl
TEMED	10	µl.

Probenauftragsgel 0 %

0 % Denaturierungslösung	8	ml
APS (10 %)	50	µl
TEMED	10	µl.

### Durchführung:

- Zusammensetzen des Gradientenmischers nach Herstellerangaben;
- Verbinden der Pumpe mit dem Gradientenmischer und der Gelkassette über einen Schlauch;
- Zugeben eines Magnetrührers in die Mischkammer;
- Versetzen des Schlauchendes mit einer Kanüle, damit die Gellösung in die Kassette tropfen kann;
- Pipettieren der 62%igen Denaturierungslösung in die Mischkammer und der 45%igen Denaturierungslösung in die Reservoirkammer des Gradientenmischers zur Herstellung des Gradienten;
- Zügiges Tropfen des Polyacrylamidgemisches mit Hilfe der Peristaltikpumpe (Ismatec) in die Gelkammer;
- Vorbereitung des Auftragsgels, Stecken des Probenauftragskamms;
- Auspolymerisieren des Gels für 2 h;
- Herstellen von 8 l 1 x TAE-Laufpuffer (vgl. B 7.1);
- Vorheizen auf 62 °C im Puffertank;
- Einhängen des auspolymerisierten Gels in den Puffertank;
- Auftragen der nach B 8 behandelten Proben auf das PAA-Gel;
- Auftragen des Reinkultur-DNA-Standards, Vorbereitung wie in B 8.4 - 8.6 beschrieben;
- Mischen von jeweils 5 µl Reinkultur-DNA mit 3 µl Auftragspuffer und Pipettieren in eine Tasche;
- Reinkultur-DNA-Standards:
  - Bacillus megaterium*
  - Bacillus thuringiensis*
  - Pseudomonas chlororaphis*
  - Erwinia chrysanthemi*
  - Escherichia coli*;
- Laufbedingungen: 100 Volt bei 18 h und 60 °C.



## 10 Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels

Zur Silberfärbung wurde ein modifiziertes Protokoll von Suhadloc et al., 2000 eingesetzt.

### Durchführung und Lösungen:

- Ansetzen der Lösungen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ , frisch;
- Transferieren bei Flüssigkeitswechsel zwischen den verschiedenen Wannen auf einer Kopierfolie.

#### **Fixierung**

Eisessig		50	ml	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	ad	500	ml	mindestens 30 min;

#### **Waschen**

$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	ca.	250	ml	3 x 2 min;
--------------------------------------	-----	-----	----	------------

#### **Silberreaktion**

$\text{AgNO}_3$ (Sigma, Deisenhofen; FRG)	0,37	g	
Formaldehyd 37 % (w/v) (Merck, Darmstadt, FRG)	0,25	ml	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	250	ml	25 min;

#### **Waschen** (Wanne wechseln)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	250	ml	2 x 0,5 min;
--------------------------------------	-----	----	--------------

#### **Entwickeln** (Wanne wechseln)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ , wasserfrei (Sigma, Deisenhofen, FRG)	6,25	g	
Formaldehyd 37 % (w/v) (Merck, Darmstadt, FRG)	0,25	ml	
Natrium-Thiosulfat 2 % (w/v)	0,25	ml	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	250	ml	10 - 15 min;

### **Stoppen**

EDTA-Na <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	3,65	g	
(Sigma, Deisenhofen, FRG)			
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	250	ml	10 min;

### **Konservieren**

Glycerin	30	ml	
(100 %; Merck, Darmstadt, FRG)			
Ethanol <sub>reinst, absolut</sub>	75	ml	
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	ad	300	ml
			mindestens 30 min.

### Natrium-Thiosulfat-Stammlösung (2 % w/v):

Na-Thiosulfat-Pentahydrat	3,14	g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O (Sigma, Deisenhofen, FRG)		
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	ad	100
ml		
steril filtrieren.		

## **11 Konservieren des Polyacrylamid-Gels**

- Auflegen des Gels auf eine feuchte Cellophanfolie (Amersham, Freiburg, FRG);
- Überschichten mit ca. 10 ml Konservierungslösung (B 10);
- Abdecken mit einer zweiten Cellophanfolie;
- Fixieren des Gels in einem Gelrahmen;
- Trocken des Gels 2 Tage flach bei 38 °C, lichtgeschützt;
- Lagern des Gels (lichtgeschützt) bis zur Auswertung.

## **12 Auswertung des Polyacrylamid-Gels**

### **Prinzip:**

Die Auswertung der Polyacrylamidgele erfolgte von Hand, wobei das Bandenmuster in ein Raster eingeteilt wurde und auf das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein einer Bande überprüft wurde. Dabei wurde die eventuelle Verschiebung der Laufstrecke von maximal 1 - 2 mm miteinbezogen und jeweils der richtigen Bande zugeordnet.

Zur Auswertung der Fingerprints wurde die hierarchischen Clusteranalyse angewandt. Sie bildet anhand von vorgegebenen Variablen Gruppen von Objekten. Bei diesen Variablen kann es sich um die Banden einer Spur auf dem DGGE-Fingerprint handeln. Die Mitglieder einer Gruppe (Cluster) sollen eine möglichst ähnliche Variablenausprägung aufweisen, die Mitglieder verschiedener Gruppen eine unähnliche Variablenausprägung. Bei der hierarchischen Clusteranalyse bildet am Anfang jedes Objekt ein eigenes Cluster. Anschließend werden die ähnlichsten Objekte zu einem Cluster vereinigt (Bühl und Zöfel, 2000).

Zur Berechnung dieser hierarchischen Clusteranalyse wurde das Ähnlichkeitsmaß nach *Jaccard* verwendet. Es spiegelt die Ähnlichkeit zwischen zwei Objekten wider: Je größer der Wert des Ähnlichkeitsmaßes, desto ähnlicher sind sich zwei Objekte; die Werte liegen zwischen 0 und 1.

Bei binären Variablenausprägungen, -in diesem Fall Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Bande im Bandenmuster innerhalb einer Spur im DGGE-Fingerprint, - wird entweder der Wert 1 (Variable vorhanden) oder der Wert 0 (Variable nicht vorhanden) zugewiesen.

Im Fall binärer Merkmale beim Vergleich zweier Objekte lassen sich bezüglich einer Variable vier Fälle unterscheiden (Tab. B 3):

- bei beiden Objekten ist die Variable vorhanden (a);
- nur Objekt 2 weist die Variable auf (b);
- nur Objekt 1 weist die Variable auf (c);
- bei beiden Objekten ist die Variable nicht vorhanden (d).

**Tab. B 3: Kombinationsmöglichkeiten binärer Variablen (aus Backhaus et al., 2000)**

Objekt 1	Objekt 2	
	Variable vorhanden (1)	Variable nicht vorhanden (0)
Variable vorhanden (1)	<b>a</b>	<b>c</b>
Variable nicht vorhanden (0)	<b>b</b>	<b>d</b>

Ähnlichkeitsmaß nach *Jaccard*:  $\frac{a}{a+b+c}$

Der *Jaccard*-Koeffizient mißt den relativen Anteil gemeinsamer Variablen bezogen auf die Variablen, die mindestens bei einem Objekt vorkommen (Backhaus et al, 2000).

Zur Beschreibung der Größe des Koeffizienten wurden folgende Abstufungen gewählt (Tab. B 4):

**Tab. B 4: Abstufungen des Korrelationskoeffizienten (aus Bühl und Zöfel, 2000)**

Wert	Interpretation
bis 0,2	sehr geringe Korrelation
bis 0,5	geringe Korrelation
bis 0,7	mittlere Korrelation
bis 0,9	hohe Korrelation
über 0,9	sehr hohe Korrelation

Die Ähnlichkeitsmatrix wurde mit dem Programm SPSS (Version 10) erstellt und das Ergebnis in einem Dendrogramm visualisiert. Das Programm identifizierte die jeweils zusammengefaßten Cluster und die Werte des Koeffizienten bei jedem Schritt. Dabei wurden nicht die Originalwerte, sondern die relativen Werte dargestellt. Zusammengefaßte Cluster wurden durch senkrechte Linien gekennzeichnet.

## 13 Klonieren von PCR-Produkten

### 13.1 Vektor pCR<sup>®</sup> 4 Blunt-TOPO

Der Plasmidvektor pCR<sup>®</sup> 4 Blunt-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Groningen, NL) macht sich die Eigenschaften der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus zunutze. Sie erkennt die Region am Phosphodiestergerüst nach der 5'-CCCTT-Sequenz, in die das Insert ligiert werden soll und bewirkt die vorübergehende Spaltung eines der beiden DNA-Vektorstränge (Shuman, 1994). Die zuvor erzeugten „stumpfen“ Enden (blunt ends, vgl. B. 13.2) der zu klonierenden PCR-Produkte werden mit Hilfe der Topoisomerase I und dem geschnittenen Plasmidvektor wieder zu einem DNA-Strang verknüpft. Zusätzlich enthält dieser Vektor ein lethales *ccdB*-(control of cell death)-Gen. *CcdB* ist ein bakterielles Toxin, das auf die DNA-Gyrase (Enzym der Topoisomerase II, zur vorübergehenden Spaltung beider DNA-Stränge) zielt. Die Ligation von blunt-end-PCR-Produkten verhindert die Expression des *ccdB*-Gens und ermöglicht nur das Wachstum von Bakterien, die das Insert enthalten. Somit wird eine Überprüfung (Screening) nach positiven Klonen überflüssig.

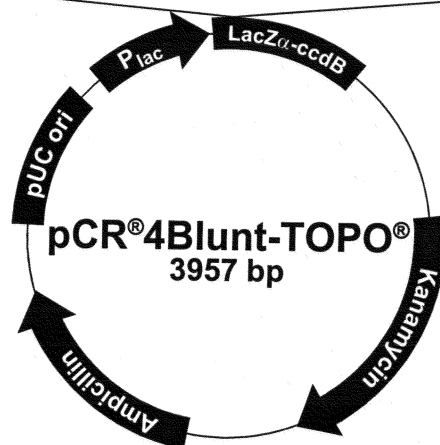
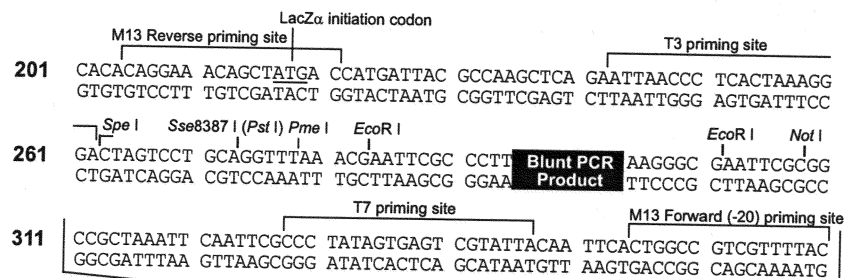


Abb. B 4: pCR<sup>®</sup> 4 Blunt-TOPO Vektor von Invitrogen.

## 13.2 Erzeugung von PCR-Produkten mit blunt ends

### Materialien:

T 4-DNA-Polymerase  $\geq 1$ Unit/  $\mu$ l, (Roche, Penzberg, FRG)

T 4-DNA-Polymerase Puffer 5 x (Roche, Penzberg, FRG)

Nukleotide 10 mM (Roche, Penzberg, FRG).

### Durchführung:

- Anfertigen der PCR-Produkte, wie in B. 8 beschrieben, mit der Taq-Polymerase;
- Behandeln mit T4-Polymerase (Roche, Penzberg, FRG) zum Verdau der 3`A-Überhänge durch die Taq-Polymerase.

### Reaktionsansatz

PCR-Ansatz	44	$\mu$ l
T 4 DNA Polymerase Puffer (5 x)	9	$\mu$ l
Nukleotidlösung, 10 mM	1	$\mu$ l
T 4 DNA Polymerase ( $\geq 1$ Unit/ $\mu$ l)	5	$\mu$ l.

Inkubation 4 h bei 37 °C.

## 13.3 Klonierungsreaktion

### Lösungen und Materialien:

#### Salzlösung, steril filtriert:

NaCl	1,2	M
MgCl <sub>2</sub>	0,06	M.

#### SOC Medium, steril filtriert:

Tryptone	2 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
MgCl <sub>2</sub>	10	mM
MgSO <sub>4</sub>	10	mM
Glucose	20	mM.

Vektor:

pCR<sup>®</sup> 4 Blunt-TOPO,  
high copy number plasmid.

Kompetente Zellen:

TOPO10 cells (*Escherichia coli*).

LB (Luria-Bertani) Medium (autoklavieren):

Tryptone	1 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
NaCl	1 %	(w/v)
pH 7,0		
Ampicillin	100	µg/ml

(Zugabe nach dem Autoklavieren).

Bei LB-Agarplatten zusätzliche Zugabe von 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren.

**Ligation:**

PCR-Produkt	4	µl
Salzlösung	1	µl
Vektor	1	µl.

- Vorsichtiges Mischen des Reaktionsansatzes und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur;
- Kühlung des Reaktionsansatzes auf Eis.

**Transformation:**

- Pipettieren und leicht Mischen von 2 µl des Ligationsansatzes in die 50 µl Lösung der kompetenten Zellen;
- Inkubieren 30 min auf Eis;
- Hitzeschockreaktion: 30 sec bei 42 °C;
- Sofortiges Abkühlen auf Eis;
- Zugabe von 250 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur;
- Inkubieren 1 h bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler.

**Ausplattieren:**

- Ausplattieren von je 30  $\mu$ l, 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l pro Reaktionsansatz auf eine LB-Platte mit Ampicillin, c = 100  $\mu$ g/ml;
- Inkubieren bei 37 °C über Nacht.

**Analyse der positiven Klone:**

- Überführen von ca. 10 einzelnen Kolonien pro Platte in LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin;
- Ansetzen einer Übernachtskultur bei 37 °C, im Inkubationsschüttler.

**13.4 Isolierung der Plasmid-DNA**

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit QIA prep8 Miniprep (Quiagen, Hilden, FRG) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Prozedur basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim and Doly, 1979), gefolgt von der Absorption der DNA an einer Silikamembran in Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration. Eluiert wurde in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>reinst.</sub> (Sigma, Deisenhofen, FRG).

**13.5 Restriktionsverdau**

Zur Überprüfung des Klonierungsansatzes wurde die Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde das Restriktionsenzym EcoR I (MBI Fermentas, St.Leon, FRG) eingesetzt, da es Schnittstellen vor und nach dem Insert besitzt. Anschließend wurde der Restriktionsverdau auf einem Agarosegel ( B 7.1) sichtbar gemacht.

Das Enzym wurde entsprechend den ihm beigelegten Produktbeschreibungen zusammen mit den mitgelieferten 10-fachen Inkubationspuffern eingesetzt.

**Reaktionsansatz:**

DNA-Lösung	5	$\mu$ l
Inkubationspuffer	2,5	$\mu$ l
Restriktionsenzym	10	U
ad H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	25	$\mu$ l.



- Inkubieren 12 h bei 37 °C;
- Erhitzen des Reaktionsansatzes für 20 min bei 65 °C, zur Inaktivierung.

## **14 Sequenzieren**

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma Toplab in Martinsried bei München, FRG, durchgeführt. Hierfür wurde folgender Primer verwendet:

---

M13 Forward (-20):	5'GTA AAA CGA CGG CCA G 3'
--------------------	----------------------------

---

## **15 Auswertung der Sequenzdaten**

Um die Bakterien identifizieren und in phylogenetische Gruppen einordnen zu können, war es notwendig, die erhaltenen Sequenzen in sogenannte Alignments schon bekannter Sequenzen einzupassen. Dies erfolgte mit der paarweisen Anordnung homologer Positionen an dieselbe Stelle und vollzog sich in drei Schritten:

- i) Alle Sequenzpaare wurden separat angeordnet, "aligned", um eine Distanzmatrix zu berechnen, die die Divergenzen für jedes Paar bestimmt.
- ii) Ein Leitbaum, „guide tree“ wurde aufgrund dieser Distanzmatrix berechnet.
- iii) Die Sequenzen wurden fortschreitend zugeordnet und den Verästelungen des Leitbaums zugewiesen (Thompson et al., 1994).

Die Alignments wurden mit dem Programm Blast (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und Clustal W, <http://www.embl-heidelberg.de> angefertigt und mit bereits sequenzierten und verwandten Organismen in einem „average distance matrix tree“ verglichen.

## **C Ergebnisse**

### **1 Versuchsdesign**

#### **1.1 Applikation von Nonylphenol und Versuchsperioden**

- Applikation von technischem 4-Nonylphenol ( $C_{15}H_{24}O$ , Sigma, Deisenhofen, FRG) in sieben Konzentrationsstufen N1 - N7 mit Hilfe der „controlled release Dosierung“ (B 1.3, nach Pfister, unpublished);
- Angestrebte Nominalkonzentrationen im Wasser:

N 1	10	$\mu\text{g/l}$
N 2	40	$\mu\text{g/l}$
N 3	70	$\mu\text{g/l}$
N 4	100	$\mu\text{g/l}$
N 5	130	$\mu\text{g/l}$
N 6	160	$\mu\text{g/l}$
N 7	190	$\mu\text{g/l}$

- Vier Mikrokosmen als Kontrolle (K), ohne Zusatz von Nonylphenol.

#### Versuchsphasen:

- *Präapplikationsperiode:* 22 Tage (25.5. - 15.6.1998),  
Schaffung gleicher Ausgangsbedingungen in allen Mikrokosmen;
- *Applikationsperiode:* 45 Tage (16.6. - 30.7.1998),  
Dosierung mit Nonylphenol;
- *Postapplikationsperiode* 42 Tage (31.7. - 10.9.1998),  
Keine Dosierung mit Nonylphenol, zur Verfolgung von Abklingungsreaktionen  
in den Mikrokosmen.

## 1.2 Probenentnahmeschema

**Tab. C 1: Probenentnahmetermine und Meßprogramm während der verschiedenen Versuchsperioden**  
 \*Probenentnahme von unbehandeltem, direkt entnommen Ammerseesediment

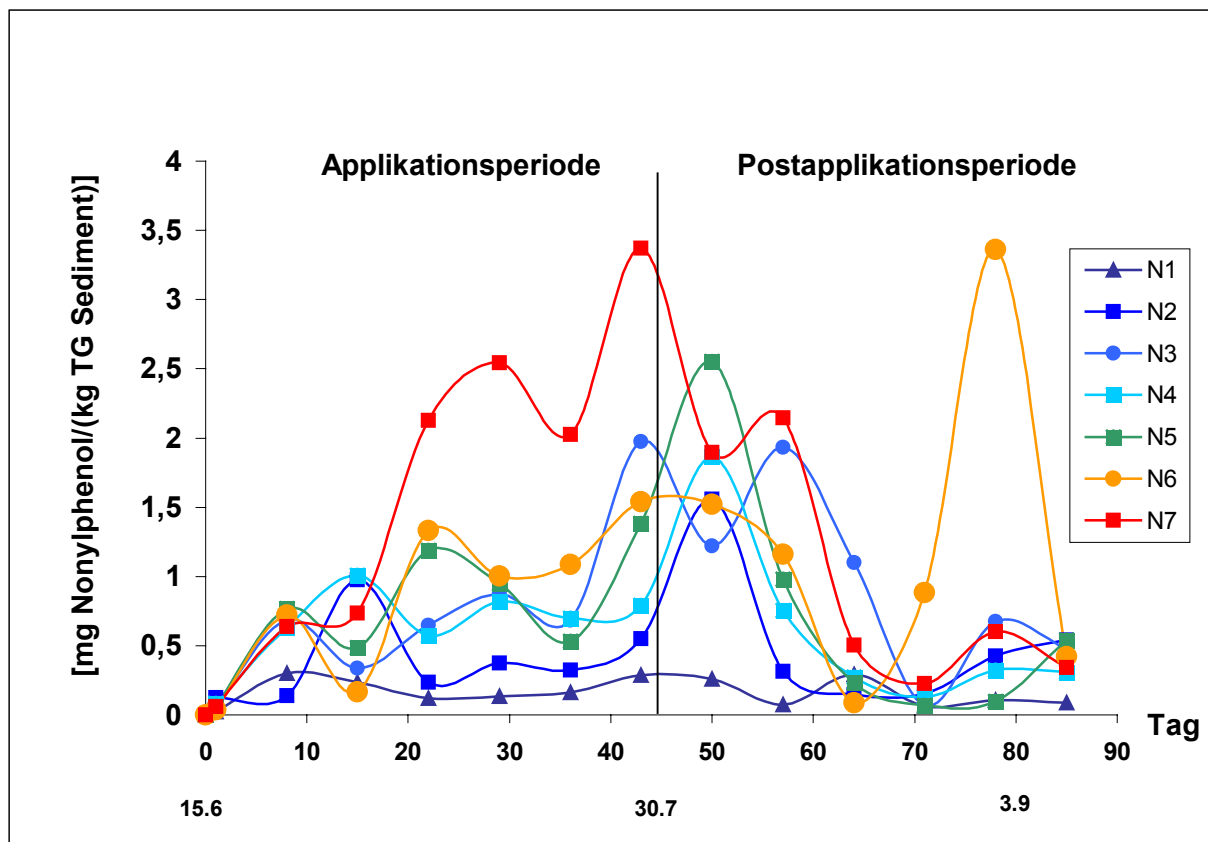
Messungen	Präapplikationsperiode	Applikationsperiode	Postapplikationsperiode
Redoxmessung	wöchentlich	wöchentlich	wöchentlich
Proteolytische Aktivität	–	wöchentlich	wöchentlich
C/N-Analyse	–	1 - 2 wöchentlich	1 - 2 wöchentlich
Gesamtzellzahl	–	Tag 36	Tag 57 und Tag 71
<i>In situ</i> Hybridisierung mit FISH	–	Tag 36	Tag 57 und Tag 71
16S-rDNA/rRNA-DGGE-Fingerprint	24.3.1998* und 25.5.1998	Tag 25 und Tag 44	Tag 80
Phylogenetische Einordnung der 16S-rDNA und -rRNA-Sequenzen	25.5.1998 (K und N7)	Tag 44 (K und N7)	Tag 80 (K und N7)

### 1.3 Nonylphenolkonzentrationen im Sediment

Die Nonylphenolkonzentrationen (Pfister, unpublished) im Sediment werden den im folgenden dargestellten Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen gegenüber gestellt. Die Ergebnisse der Nonylphenolmessungen sollen hier kurz vorgestellt werden:

Es wurden sieben Mikrokosmen mit 10 µg/l - 190 µg/l Nonylphenol in Lösung eingesetzt (B 1.3). Während der Applikationsperiode stieg die Nonylphenolkonzentration am Tag 43 im niedrigst dosierten Mikrokosmos N1 auf 0,3 mg/(kg TG Sediment) und im höchst dosierten Mikrokosmos N7 auf 3,4 mg/(kg TG Sediment) an (Abb. C 1).

Während der Postapplikationsperiode am Tag 85 sank die Konzentration der Testsubstanz in Mikrokosmos N1 auf 0,1 mg/(kg TG Sediment) und in Mikrokosmos N7 auf 0,4 mg/(kg TG Sediment) ab. Eine Ausnahme bildete Mikrokosmos N6 am Tag 78.



**Abb. C 1:** Nonylphenolkonzentrationen in [mg Nonylphenol/(kg TG Sediment)] während der Applikations- und Postapplikationsperiode in den verschiedenen Mikrokosmenvarianten N1 - N7.

## **2 Chemische und physikalische Parameter**

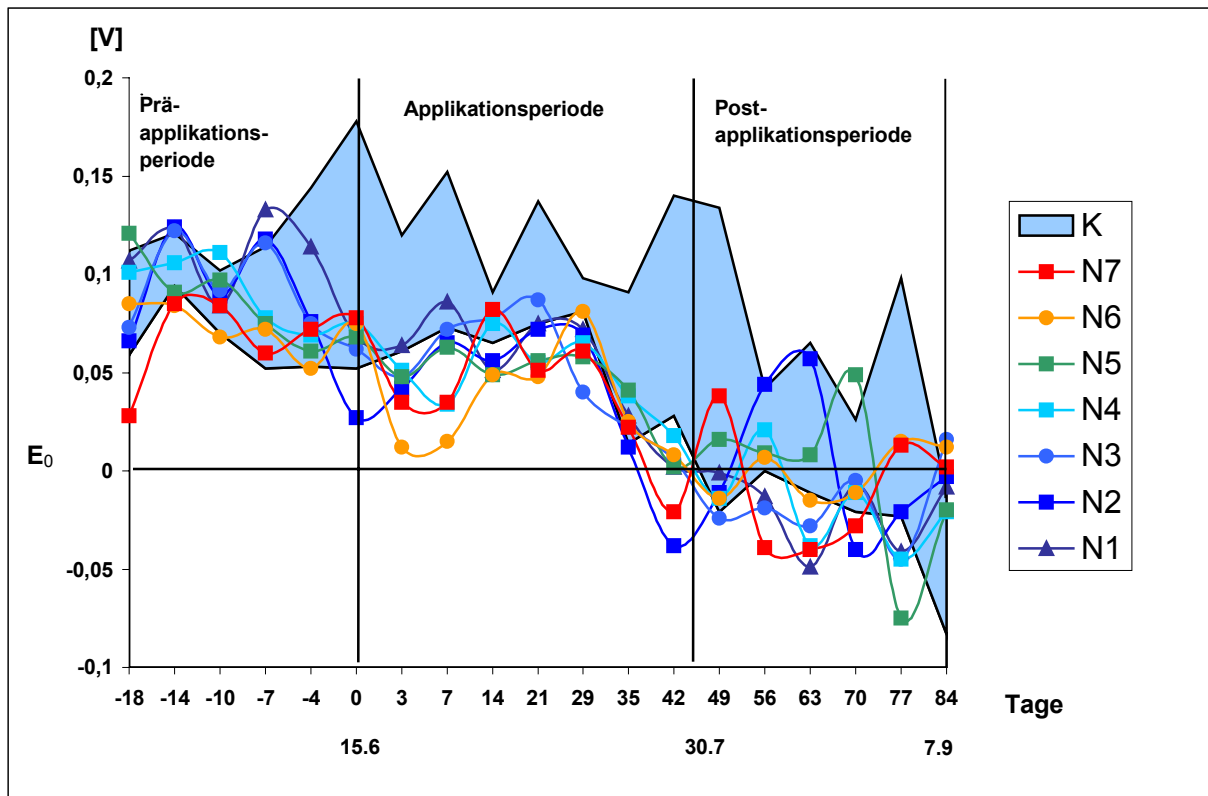
### **2.1 Redoxpotentiale im Sediment**

Die Redoxspannung wurde im ersten Zentimeter des Sediments gemessen (B 2.2). Das Redoxpotential sank während des Versuchs in den negativen Meßbereich (Abb. C 2).

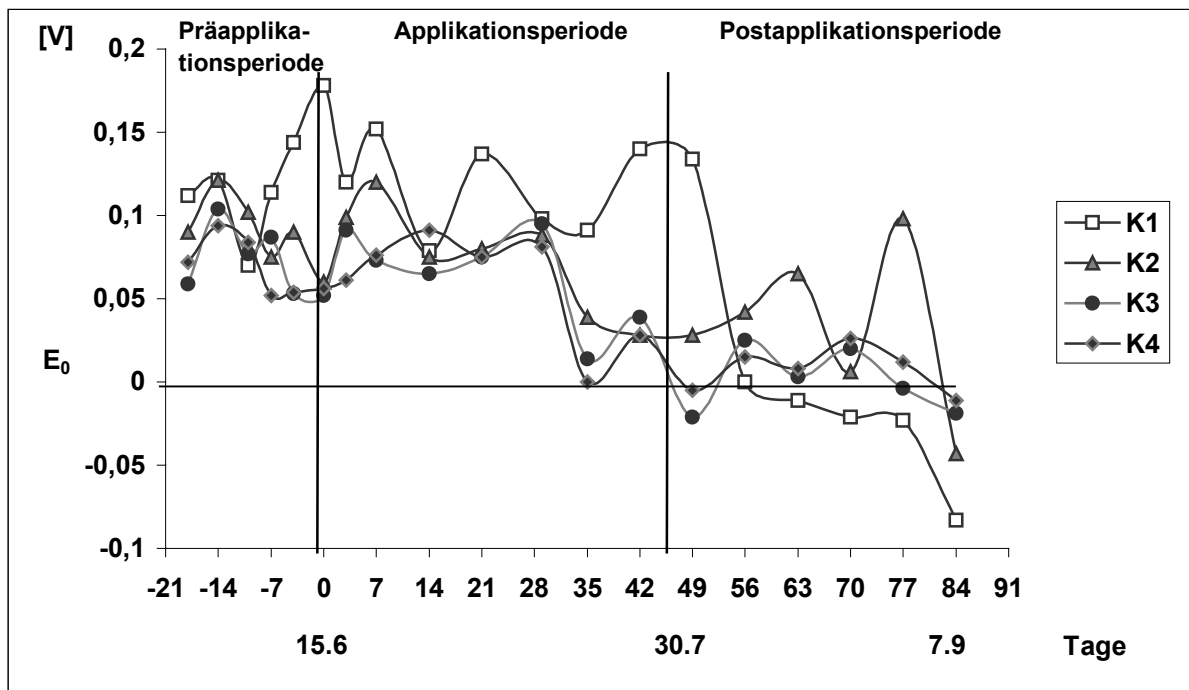
Während der Präapplikationsperiode lag das Redoxpotential bei ca. 0,05 - 0,15 V. Ein Unterschied zwischen den einzelnen noch undosierten Mikrokosmen war nicht zu erkennen.

In der Applikationsperiode zeigte sich ein Unterschied zwischen belasteten und unbelasteten Varianten. Das Redoxpotential in den nicht belasteten Kontrollen (K) war höher als in den mit Nonylphenol dosierten Mikrokosmen (Abb. C 2 und C 3).

In der Postapplikationsperiode nahm das Redoxpotential bis auf ca. -0,1 - 0 V ab. Es konnten tendenziell höhere Redoxspannungen in den nicht belasteten Mikrokosmen gemessen werden.



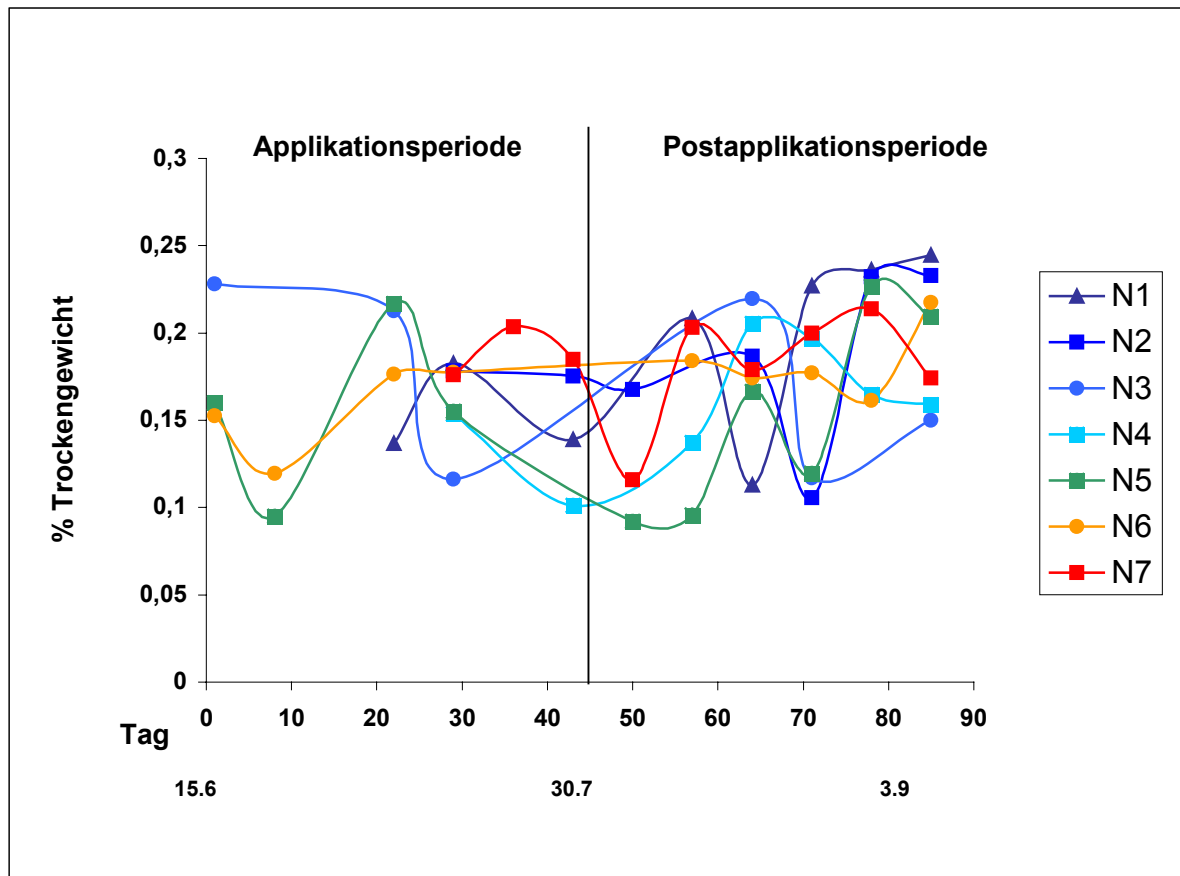
**Abb. C 2:** Redoxspannung in [V] in den belasteten Mikrokosmen N1 - N7 sowie in den Kontrollen K, wobei jeweils der maximale und der minimale Wert dargestellt sind. Die x-Achse stellt zur besseren Übersicht eine normierte Zeitachse dar.



**Abb. C 3:** Redoxspannung in [V] der unbelasteten Kontrollen (K1 - K4).

## 2.2 Gesamtstickstoff

Der Gesamtstickstoffgehalt des Mikrokosmensediments lag im Bereich von 0,1 - 0,3 % des Trockengewichts (Abb. C 4). Da der Gesamtstickstoffgehalt sowohl im Mikrokosmos N1 als auch im Mikrokosmos N7 während des gesamten Versuchszeitraums in diesem Bereich variierte, ist keine saisonale oder durch Nonylphenol hervorgerufene Abhängigkeit zu erkennen.

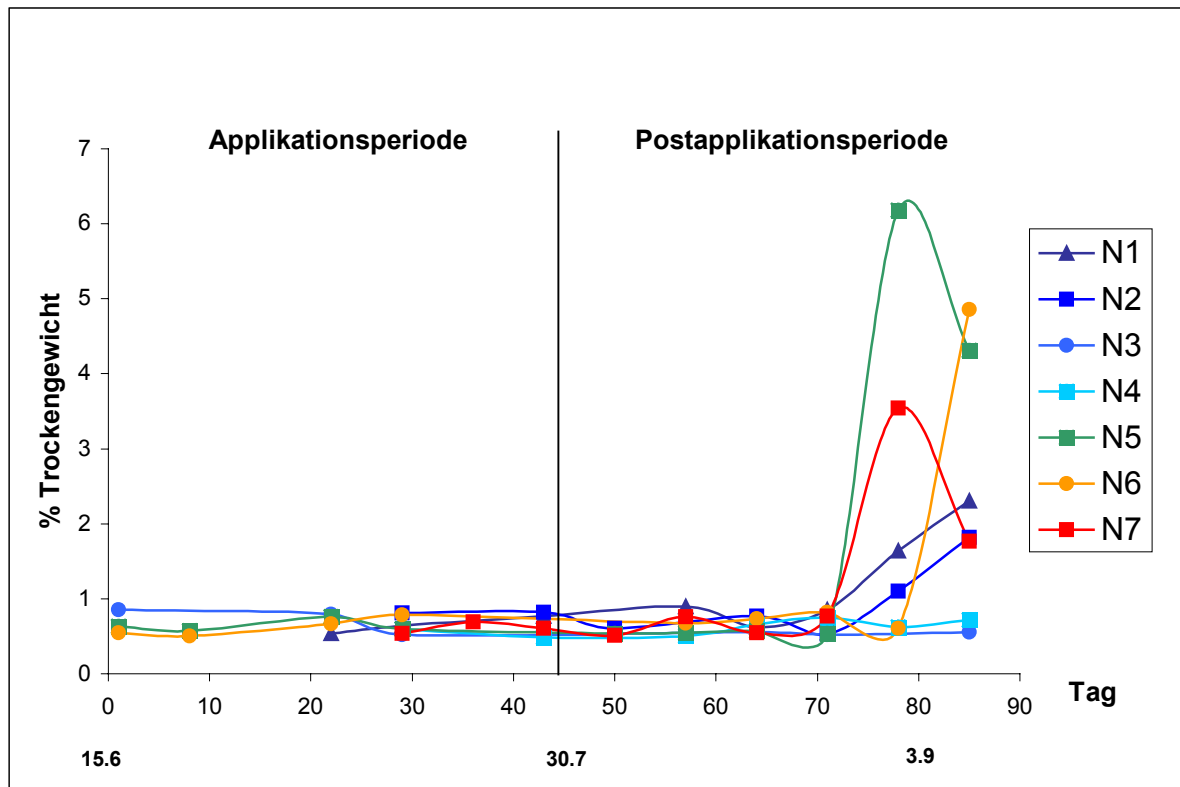


**Abb. C 4:**  $N_{\text{Gesamt}}$  während der Applikations- und Postapplikationsperiode, bezogen auf das Trockengewicht des eingesetzten Sediments in Prozent; N1 - N7: Bezeichnung der Mikrokosmenvarianten.

## 2.3 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Der DOC-Gehalt betrug während der ersten 65 Tage ca. 1% des Sedimenttrockengewichts (Abb. C 5). Am Tag 78, während der Postapplikationsperiode stieg der DOC-Gehalt in den höher dosierten Mikrokosmen (N5 und N7) auf das 7- bzw. 4-fache an. Am Tag 82 zeigte der zweithöchst dosierte Mikrokosmos N6 einen 6-fachen Anstieg der DOC-Konzentration im Sediment. Auch in den niedrigst dosierten

Mikrokosmen (N1 und N2) war ein Anstieg des DOC-Gehaltes gegen Ende der Postapplikationsperiode zu erkennen. Jedoch zeigte sich in den Mikrokosmen mit einer mittleren Nonylphenolkonzentration (N3 und N4) kein Anstieg der DOC-Konzentration während der gesamten Versuchsdauer. Wenn die Standardabweichung bei zwei Stichproben  $> 2\%$  der Kovarianz betrug, wurde eine dritte Stichprobe gemessen.



**Abb. C 5:** DOC-Gehalt in Prozent Trockengewicht des eingesetzten Sediments während der Applikations- und Postapplikationsperiode; N1 - N7: Bezeichnung der Mikrokosmenvarianten.

### 3 Mikrobielle Funktionsparameter

#### Bestimmung der Aminopeptidase - Aktivität

Um den Einfluß von Nonylphenol auf die mikrobielle Stoffumsetzung im Sediment während der Applikations- und der Postapplikationsperiode zu bestimmen, wurde die proteolytische Aktivität der Bakterien im ersten Zentimeter des Mikrokosmensediments untersucht (B 3).

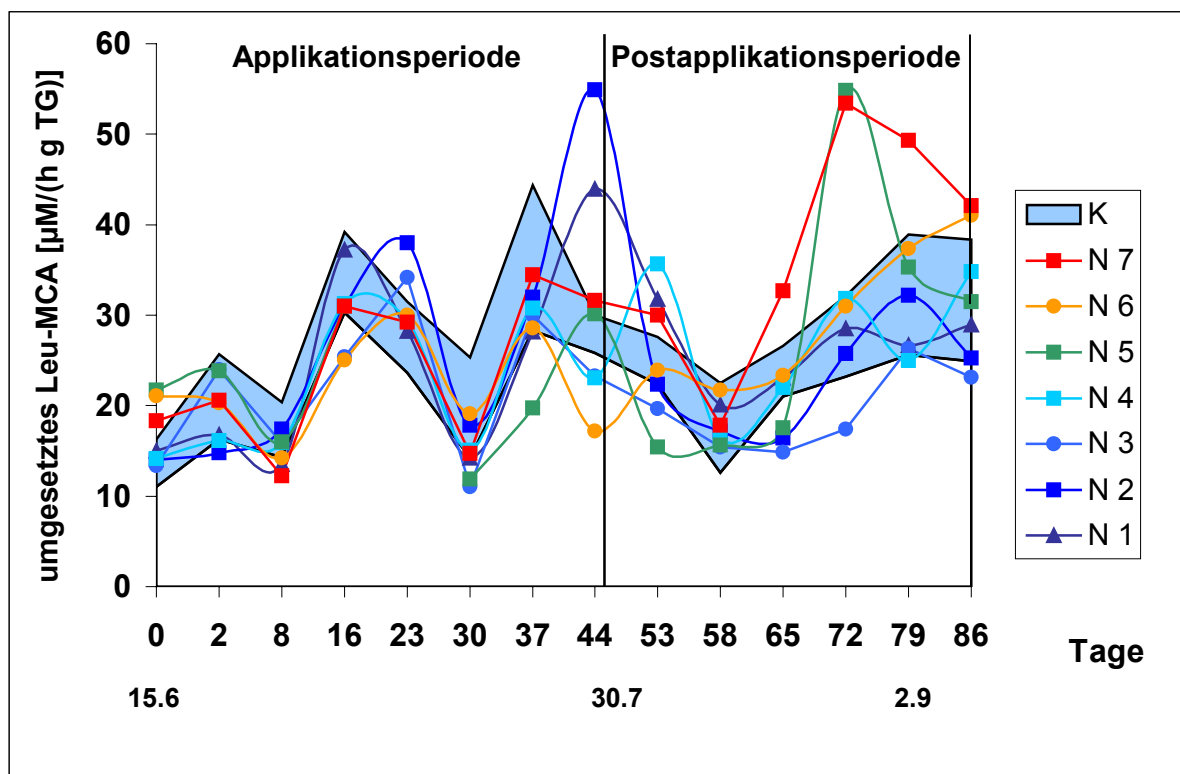


Die Proteaseaktivität zwischen den belasteten und den Kontrollmikrokosmen variierte von 10 - 55  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$ .

Gegen Ende der Applikationsperiode zeigten die niedrig belasteten Mikrokosmen N1 und N2 eine erhöhte proteolytische Aktivität von 44 bzw. 55  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$  gegenüber den Kontrollen.

Deutliche Unterschiede zwischen den dosierten Mikrokosmen und den Kontrollen waren vor allem gegen Ende der Postapplikationsperiode zu erkennen. Dort zeigten die hochbelasteten Mikrokosmen N5 und N7 ein von den Kontrollen abweichendes Verhalten. In den Mikrokosmen N5 und N7 lag die Proteaseaktivität mit ca. 55  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$  deutlich über der Aktivität der Kontrollen von  $K_{\text{max}}$  34  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$  und  $K_{\text{min}}$  20  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$  (Abb. C 6).

Die Standardabweichungen zu den einzelnen Meßpunkten sind im Anhang, Tab G 1 zu finden.



**Abb. C 6: Proteolytische Aktivität  $[\mu\text{M}/(\text{h g TG})]$  in den belasteten Mikrokosmen N1 - N7 und in den Kontrollmikrokosmen K, bei den Kontrollmikrokosmen sind die maximalen und die minimalen Werte dargestellt. Die x-Achse stellt zur besseren Übersicht eine normierte Zeitachse dar.**

## **4 Mikrobielle Populationsparameter**

### **4.1 Bestimmung der bakteriellen Gesamtzellzahl**

Die Gesamtzellzahl der Bakterien wurde mit Hilfe der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI ausgezählt (B 4). Gegen Ende der Applikationsperiode (Tag 36) und in der Postapplikationsperiode (Tag 57 und Tag 71) wurden Bakterienzählungen durchgeführt.

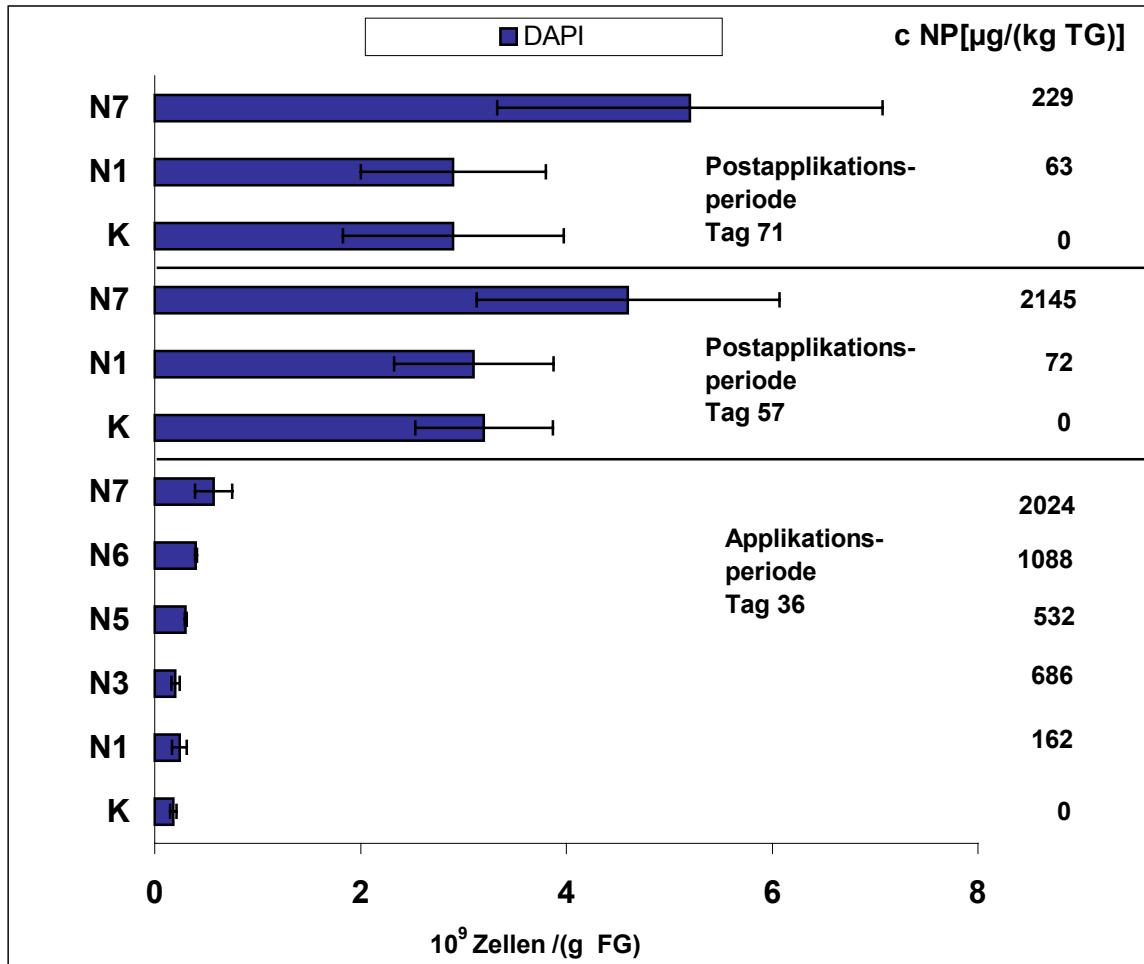
Am Tag 36 während der Applikationsperiode wurden die dosierten Mikrokosmen N1, N3, N5, N6, N7 und eine Mischprobe aus den 4 nicht dotierten Kontrollmikrokosmen ausgewertet. Die Gesamtzellzahl stieg von  $2 \cdot 10^8$  /(g FG) in Mikrokosmos N1 bis auf  $6 \cdot 10^8$  /(g FG) in Mikrokosmos N7 gegenüber von  $2 \cdot 10^8$  /(g FG) in den Kontrollmikrokosmen. Mit zunehmender Nonylphenolbelastung der Mikrokosmen stieg die Gesamtzellzahl (Abb. C 7).

Mit Hilfe des t-Tests für normalverteilte Werte konnte ermittelt werden, ob der Anstieg der Gesamtzellzahl in den verschiedenen dosierten Mikrokosmen während der Applikationsperiode eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollmikrokosmen darstellt. Bei einem Signifikanzniveau von 95 % unterschieden sich die Mikrokosmen N7, N6 und N5 signifikant gegenüber den Kontrollmikrokosmen. Die niedrig dosierten Mikrokosmen N1 und N3 zeigten bei einem Signifikanzniveau von 95 % keine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl gegenüber den Kontrollen.

Beim Vergleich des höchst dosierten Mikrokosmos N7 gegenüber der Mikrokosmen N1, N3, N5 und N6 konnte eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl bei einem Signifikanzniveau von 95 % berechnet werden.

Während der Postapplikationsperiode wurden die Sedimentproben vom Tag 57 und 71 ausgewertet. Die Gesamtzellzahl aus Proben des niedrigst dosierten Mikrokosmos N1 und des höchst dosierten Mikrokosmos N7 wurde mit der aus den Kontrollmikrokosmen verglichen. Im Mikrokosmos N7 war zu beiden Zeitpunkten (Tag 57 und Tag 71) die Zellzahl mit 4,6 bzw.  $5,2 \cdot 10^9$  /(g FG) am höchsten, wobei gegen Ende der Postapplikationsperiode die Gesamtzellzahl am stärksten anstieg. Die Gesamtzellzahl des Mikrokosmos N1 und der der Kontrollmikrokosmen lag zu beiden Zeitpunkten in etwa auf demselben Niveau bei ca.  $3 \cdot 10^9$  /(g FG) (Abb. C 7).

Bei Anwendung des t-Tests und eines Signifikanzniveaus von 95 % zeigten die jeweiligen Werte des höchst belasteten Mikrokosmos N7 gegenüber denen des niedrigst belasteten Mikrokosmos N1 und denen der Kontrollmikrokosmen eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl zu beiden Zeitpunkten der Postapplikationsperiode.



**Abb. C 7:** Gesamtzellzahl (DAPI) \*10<sup>9</sup>/(g FG) in den belasteten Mikrokosmen N1 - N7 sowie in den unbelasteten Kontrollen K.

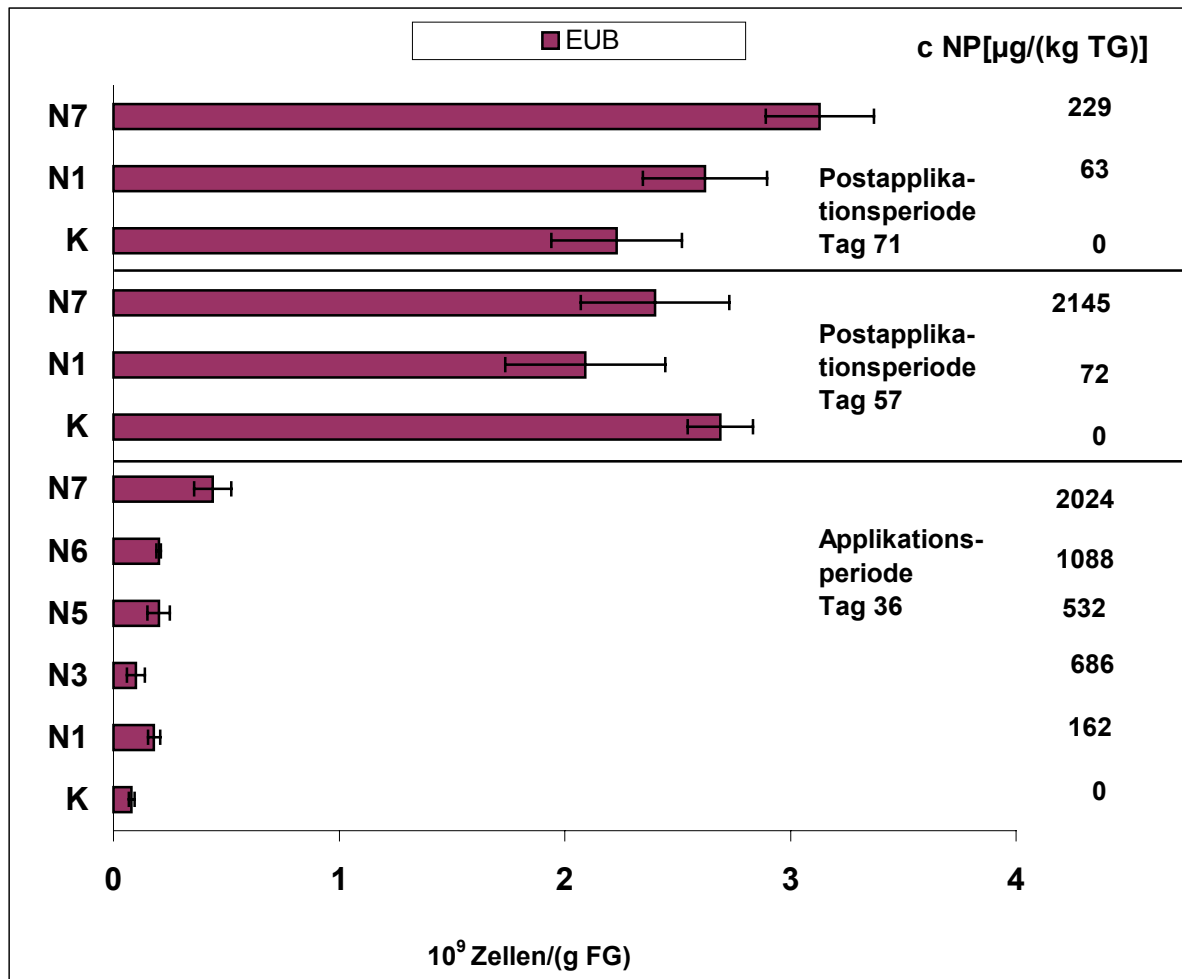
## 4.2 Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH)

### 4.2.1 Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde EUB 338

Die 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonde EUB 338 hybridisiert mit der 16S-rRNA der Domäne Bacteria in der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (B 5). Die zentrale Rolle der Ribosomen als Ort der Proteinbiosynthese ermöglicht es Veränderungen der zellulären rRNA einer bestimmten Population mit Wachstumsparametern oder dem Umsatz eines gegebenen Substrates zu koppeln (Amann und Ludwig, 2000).

Während der Versuchsdauer nahm die Zahl der mit EUB hybridisierbaren Zellen zu (Abb. C 8). Innerhalb der verschiedenen Konzentrationsvarianten der mit Nonylphenol dosierten Mikrokosmen N1, N3, N5, N6 und N7 konnten am Tag 36 der Applikationsperiode gegenüber den Kontrollmikrokosmen erhöhte EUB Zählungen ermittelt werden (Abb. C 8). Mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test für nicht normalverteilte Werte und bei einem Signifikanzniveau von 95 % zeigten die dosierten Mikrokosmenvarianten N1, N3, N5, N6 und N7 gegenüber den Kontrollmikrokosmen eine signifikante Erhöhung der EUB-hybridisierbaren Zellen. Mit Ausnahme beim niedrigst dosierten Mikrokosmos N1 zeigte sich eine Zunahme der EUB detektierbaren Zellen mit ansteigender Nonylphenolkonzentration.

An den Tagen 57 und 71 der Postapplikationsperiode zeigten die jeweiligen Werte des Mikrokosmos N7 gegenüber denen des Mikrokosmos N1 eine Erhöhung der EUB-hybridisierbaren Bakterien (Abb. C 8). Am Tag 71 der Postapplikationsperiode konnte eine signifikante Erhöhung der EUB-detektierbaren Zellen in dem niedrigst dosierten Mikrokosmos N1 und im höchst belasteten Mikrokosmos N7 gegenüber den Kontrollmikrokosmen mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test und bei einem Signifikanzniveau von 95 % ermittelt werden.



**Abb. C 8:** Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde EUB 338 in den belasteten Mikrokosmen N1 - N7 sowie den Kontrollen K.

#### 4.2.2 Gesamtzellzahl und EUB-hybridisierbare Bakterien

Sowohl die Gesamtzellzahl als auch die der hybridisierbaren Bakterien nahmen in den untersuchten Sedimentproben in der Applikations- und Postapplikationsperiode zu. In der Applikationsperiode (Tag 36) zeigten sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zahl der mit der 16S-rRNA-gerichteten EUB 338-Sonde detektierbaren Bakterien eine Zunahme mit ansteigender Nonylphenolkonzentration (Abb. C 7 und C 8). In der Postapplikationsperiode erhöhten sich sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zahl der mit der EUB 338 Sonde detektierbaren Zellen bis auf den 10-fachen Wert. Mit Ausnahme von Tag 57 nahm sowohl die Gesamtzellzahl (DAPI) als auch die Zahl der mit EUB-hybridisierbaren Zellen zwischen höchst belastetem Mikrokosmos und niedrigst belastetem Mikrokosmos gegenüber der Kontrolle zu.

Das Verhältnis der mit der 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonde EUB detektierbaren Zellen und der Gesamtzellzahl (DAPI) variierte zwischen 44 und 90 %, wobei die Gesamtzellzahl (DAPI) 100 % gesetzt wurde (Tab. C 2 A, B, C). Die berechneten Verhältnisse zeigten keinerlei Korrelation mit dem Nonylphenolgehalt im Sediment .

**Tab. C 2 A, B, C:** Verhältnis der EUB-hybridisierbaren Zellen in [%]  
die Gesamtzellzahl (DAPI) wurde 100% gesetzt.

**A**

<b>Applikationsperiode, Tag 36</b>	<b>c NP[<math>\mu\text{g}/(\text{kg TG})</math>]</b>	<b>% EUB</b>
K	0	44
N1	162	75
N3	686	50
N5	532	67
N6	1088	50
N7	2024	77

**B**

<b>Postapplikationsperiode, Tag 57</b>	<b>c NP[<math>\mu\text{g}/(\text{kg TG})</math>]</b>	<b>% EUB</b>
K	0	84
N1	72	67
N7	2145	52

**C**

<b>Postapplikationsperiode, Tag 71</b>	<b>c NP[<math>\mu\text{g}/(\text{kg TG})</math>]</b>	<b>% EUB</b>
K	0	77
N1	63	90
N7	229	60

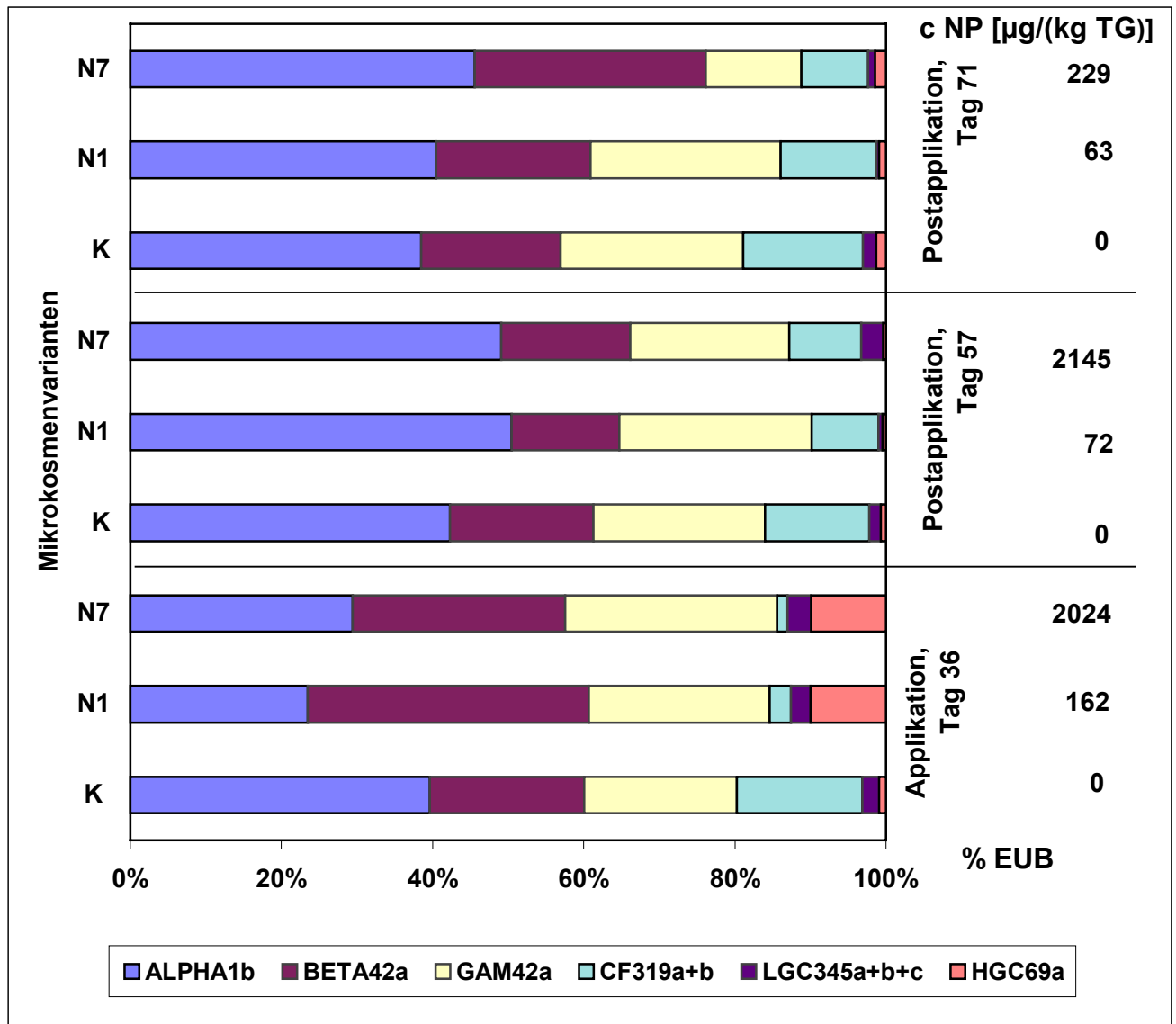
### 4.2.3 Abundanz der phylogenetischen Gruppen von Bakterien

Die Bestimmung der Abundanz der Bakteriengroßgruppen erfolgte durch Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) mit 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (B 5). Die verwendeten Sonden sind in Tab. B 1 aufgeführt. Dafür wurden in der Applikationsperiode am Tag 36 Proben aus dem niedrigst dosierten Mikrokosmos N1, aus dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 und eine Mischprobe aus 4 Kontrollen untersucht. Die Standardabweichungen finden sich in Tab. G 2, Anhang. Alle Prozentangaben beziehen sich auf 100 % EUB detektierbare Bakterien.

Zu allen Zeitpunkten und in allen Mikrokosmenvarianten bildeten die  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria und die  $\gamma$ -Proteobacteria die Bakteriengruppen mit den höchsten Abundanzen von jeweils ca. 18 - 53 %.

Die Abundanzen vom *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum, von Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA und Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt der DNA lagen zwischen ca. 1 % bis maximal ca. 15 %. Während die *Cytophaga-Flexibacter* Gruppe in den beaufschlagten Mikrokosmen N1 und N7 gegenüber ca. 15% in den Kontrollen auf ca. 2 % signifikant zurückging (Kruskal-Wallis-Test, Signifikanzniveau 95%), nahmen die Bakterien mit hohem G+C Gehalt der DNA in der Applikationsperiode signifikant (Kruskal-Wallis-Test, Signifikanzniveau 95%) gegenüber ca. 1 % in den Kontrollen auf ca. 12% in den dosierten Mikrokosmen zu (Abb. C 9).

Während der Postapplikationsperiode wurden Proben aus den Mikrokosmen N1, N7 und den Kontrollen am Tagen 57 und 71 analysiert. In der Postapplikationsperiode nahm die Population der Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C Gehalt der DNA auf weniger als 1% ab und zeigte kein abweichendes Verhalten zu den unbehandelten Kontrollen. Bei den weiteren untersuchten Bakteriengruppen war keine Reaktion auf das eingebrachte Nonylphenol zu erkennen (Abb. C 9).



**Abb. C 9:** Verteilung von Bakteriengruppen mit 16S-rRNA gerichteten-Oligonukleotidsonden; die Gesamtzahl der hybridisierbaren Zellen, die mit Oligonukleotidsonde EUB detektiert worden sind, wurde zu 100 % gesetzt.

### 4.3 Analyse der 16S-rDNA-Teilamplifikate in DGGE-Fingerprints

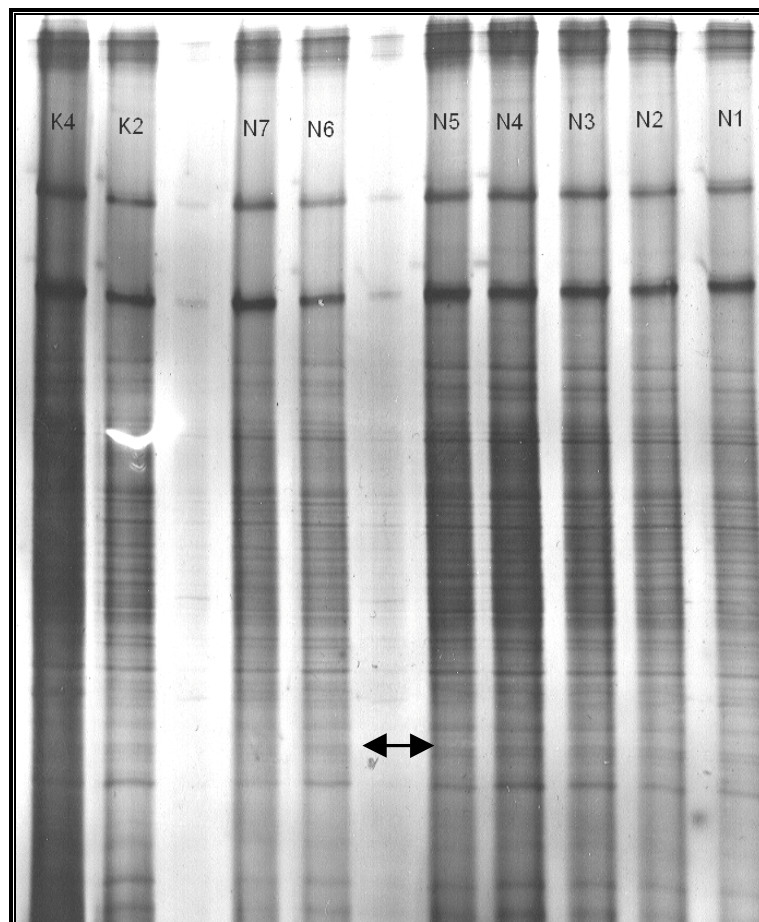
Zur Analyse der DNA aus dem ersten Zentimeter des Mikrokosmensediments wurde das Nukleinsäuregemisch nach den in B 6 - B 8 beschriebenen Methoden isoliert und amplifiziert. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe einer Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) (B 9 - B 11). Die Analyse dieser Fingerprints wurde mit der hierarchischen Clusteranalyse durchgeführt (B 12).



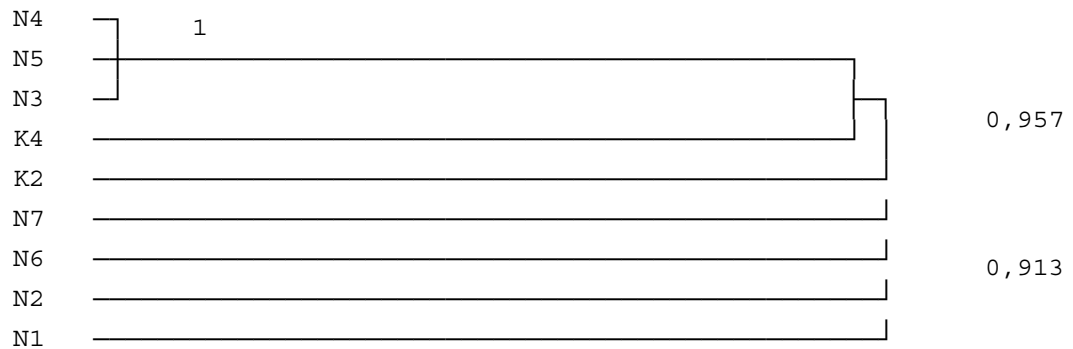
### 4.3.1 Präapplikationsperiode

Die bakterielle Diversität in der Präapplikationsperiode wurde am 25.5.1998 kurz nach dem Aufbau der Mikrokosmen in der Außenteichanlage mit Hilfe der DGGE-Fingerprintmethode charakterisiert. Die DGGE-Fingerprints zeigten bei der visuellen Betrachtung ein komplexes Bandenmuster der amplifizierten 16S-rDNA-Teilsequenzen mit bis zu 33 auswertbaren Banden pro Mikrokosmos (Abb. C 10).

Bei einem Vergleich der Bandenmuster mittels der hierarchischen Clusteranalyse zeigten die Banden ein sehr ähnliches Muster mit einem Korrelationskoeffizienten  $> 0,913$  (Abb. C 11). Die Pfeile kennzeichnen die Bandenunterschiede auf den Fingerprints.



**Abb. C 10:** DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Präapplikationsperiode* am 25.5.1998 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K2 und K4. Die Pfeile markieren die Bandenunterschiede.

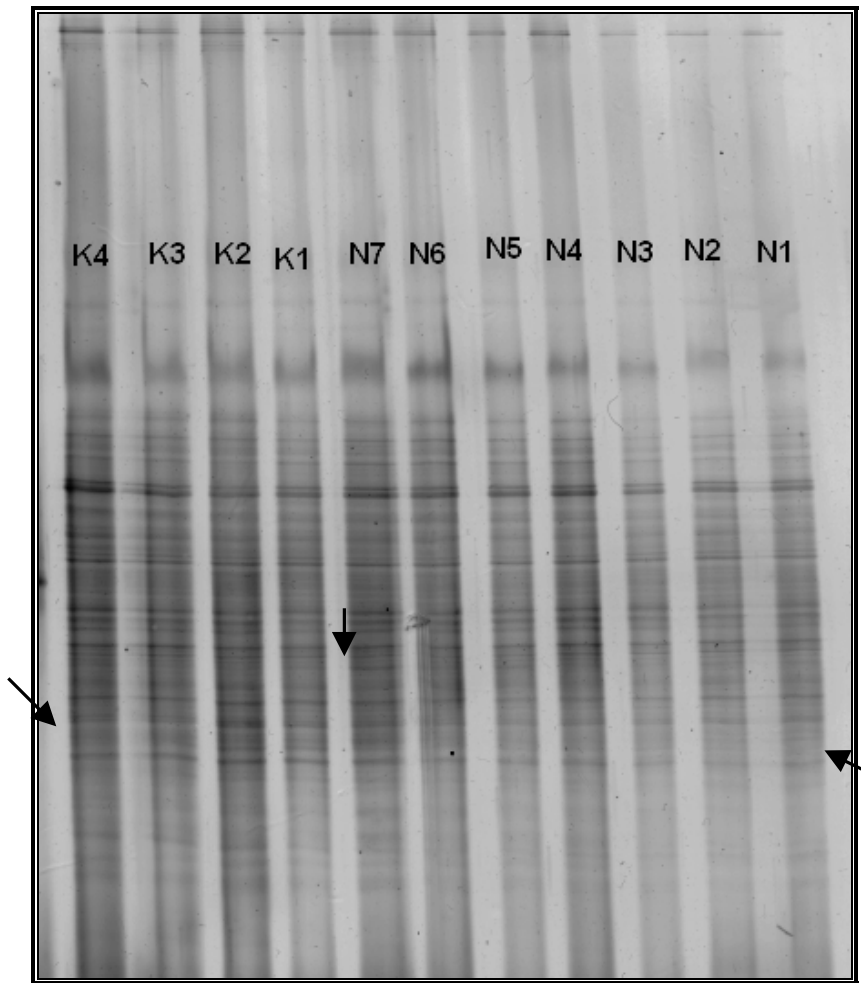


**Abb. C 11:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Präapplikationsperiode* am 25.5.1998 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K2 und K4.

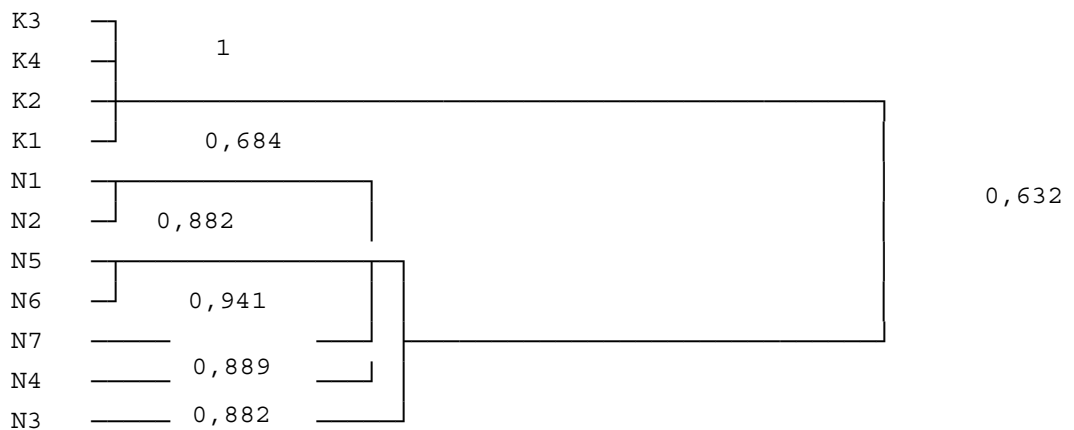
#### 4.3.2 Applikationsperiode, Tag 25

Am Tag 25 nach Applikationsstart konnten im DGGE-Fingerprint aus dem 16S-rDNA Bandenmuster durchschnittlich 26 Banden zur Auswertung mittels der hierarchischen Clusteranalyse herangezogen werden. Die Pfeile kennzeichnen die Bandenunterschiede auf den Fingerprints (Abb. C 12).

Mittels dieser Clusteranalyse war die Unterteilung in die Kontrollgruppen und in die belasteten Mikrokosmen möglich. Zur Unterscheidung beider Gruppen ließ sich ein *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient von 0,632 berechnen (Abb. C 13). Untereinander wies die Kontrollgruppe einen *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 1 auf, d.h., sie zeigte ein identisches Bandenmuster. Die 16S-rDNA innerhalb der applizierten Mikrokosmen zeigte *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 1 bis 0,882 auf, wobei keine Linearität zu dem Nonylphenolgradienten erkennbar war. Dennoch unterschied sich der niedrigst belastete Mikrokosmos N1 von dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 mit einem *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,833.



**Abb. C 12:** DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Applikationsperiode* am Tag 25 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K4. Die Pfeile markieren die Bandenunterschiede.



**Abb. C 13:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Applikationsperiode* am Tag 25 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K4.

### 4.3.3 Applikationsperiode, Tag 44

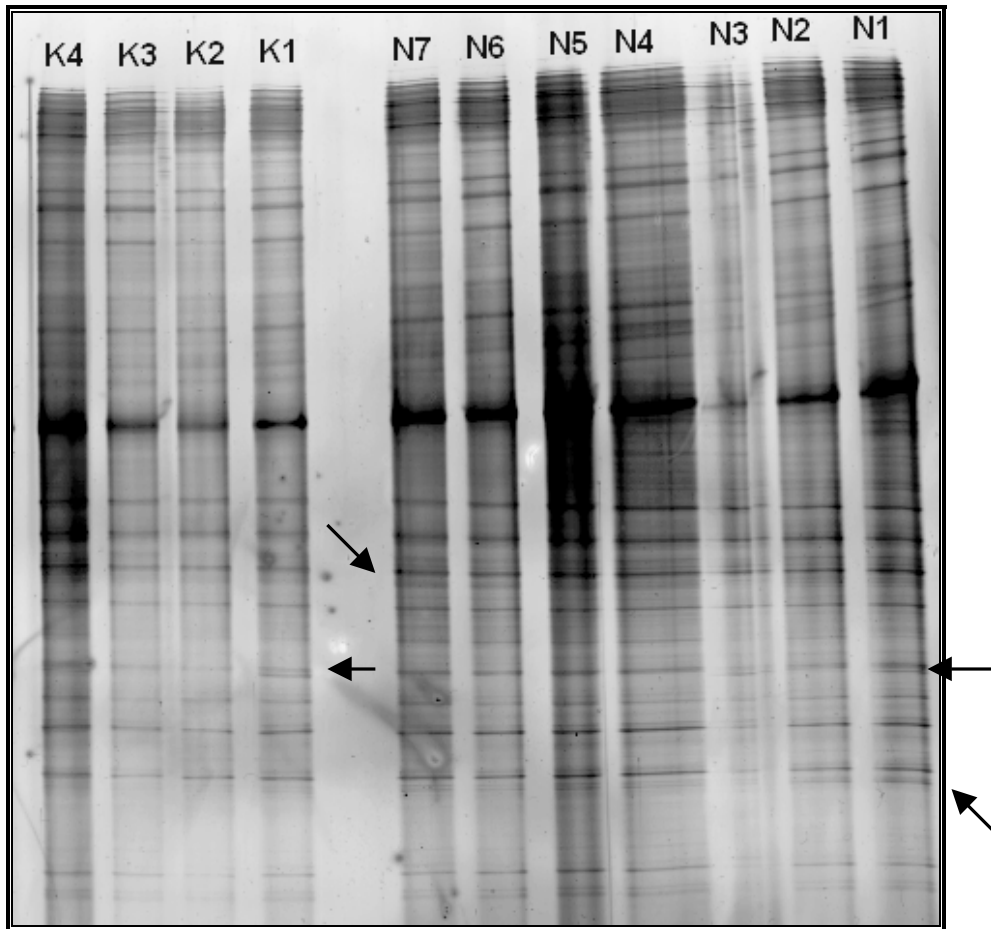
Die Zahl der auswertbaren Banden in den DGGE-Fingerprints am Tag 44 betrug durchschnittlich 27. Die Bandenunterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet (Abb. C 14).

Mittels der hierarchischen Clusteranalyse konnten die 16S-rDNA-Teilamplifikate der Kontrollgruppe von der Gruppe der belasteten Mikrokosmen unterschieden werden. Das Bandenmuster der vier Kontrollmikrokosmen war identisch (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 1).

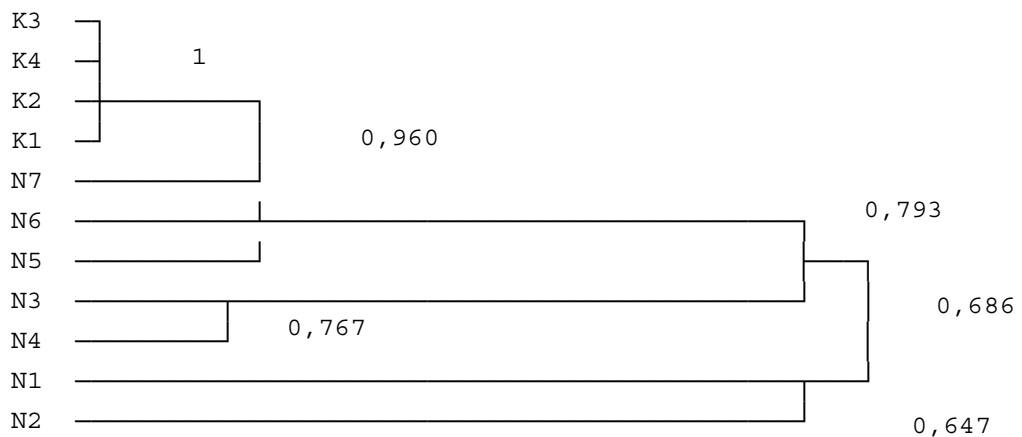
Die 16S-rDNA der Teilamplifikate der belasteten Sedimente war zusätzlich in weitere drei Gruppen einteilbar (Abb. C 15):

- Die Gruppe der niedrig belasteten Sedimente N1 und N2 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,647).
- Die Gruppe der mittel belasteten Mikrokosmen N3 und N4 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,767)
- Die Gruppe der hoch belasteten Mikrokosmen N5, N6 und N7 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,793).

Die Unterschiede innerhalb der belasteten Mikrokosmen waren größer als die Unterschiede zwischen den unbelasteten Kontrollen und dem höchst dosierten Mikrokosmos N7 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,960).



**Abb. C 14:** DGGE-Fingerprints der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Applikationsperiode* am Tag 44 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K4. Die Pfeile markieren die Bandenunterschiede.



**Abb. C 15:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Applikationsperiode* am Tag 44 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K4.

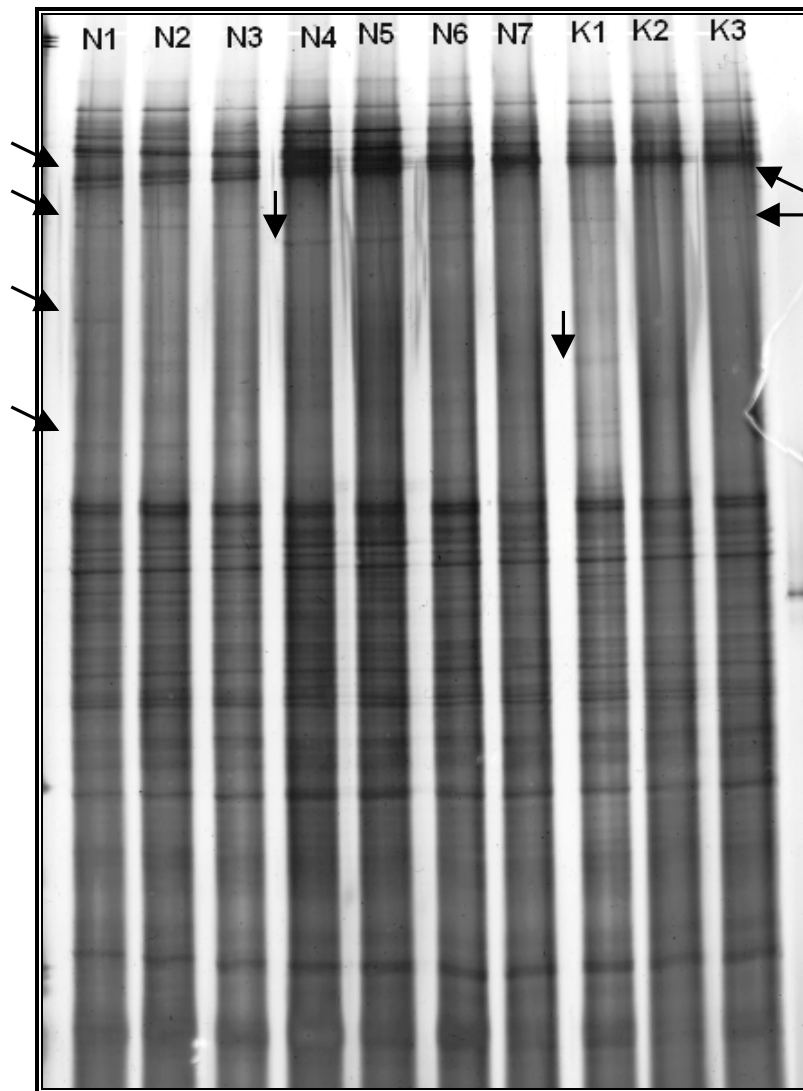
#### 4.3.4 Postapplikationsperiode, Tag 80

Während der Postapplikationsperiode, in der keine Dosierung mehr erfolgte, zeigte sich ein komplexes Bandenmuster mit durchschnittlich 28 Banden pro Sedimentprobe in den Fingerprints. Die Bandenunterschiede sind durch Pfeile hervorgehoben (Abb. C 16).

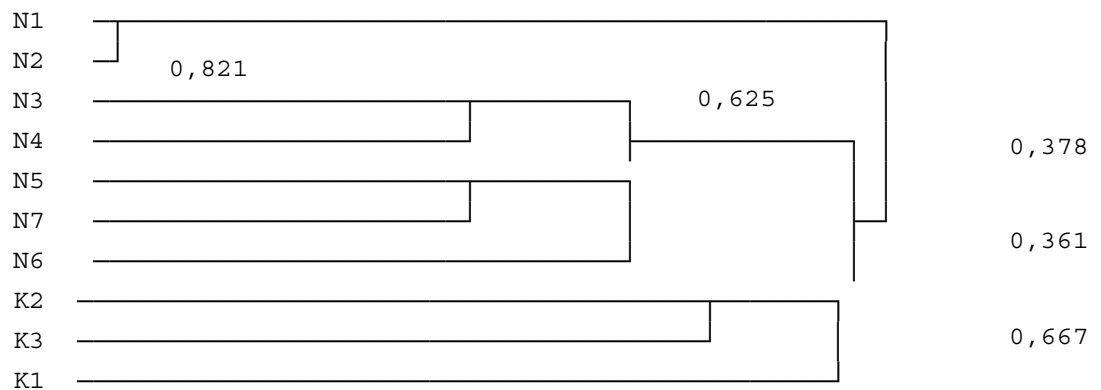
Beim Vergleich der Bandenmuster mittels der hierarchischen Clusteranalyse konnten drei Gruppen ermittelt werden:

- Die Kontrollgruppe ohne Nonylphenolbelastung, (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,667).
- Die Gruppe der niedrig belasteten Mikrokosmen N1 und N2, die eine hohe Korrelation zueinander aufwiesen (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,821).
- Die Gruppe der Mikrokosmen N3 - N7, die mit einer mittleren und hohen Nonylphenolkonzentration dosiert waren (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,625).

Die Unterschiede des Bandenmusters innerhalb der belasteten Varianten waren geringfügig größer (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,378) als die Unterschiede der Bandenmuster in den Kontrollen zu den dosierten Mikrokosmen (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,361; Abb. C 17).



**Abb. C 16:** DGGE-Fingerprint der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Postapplikationsperiode* am Tag 80 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K3. Die Pfeile markieren die Bandenunterschiede.



**Abb. C 17:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Postapplikationsperiode* am Tag 80 in den Mikrokosmen N1 - N7 und den Kontrollmikrokosmen K1 - K3.

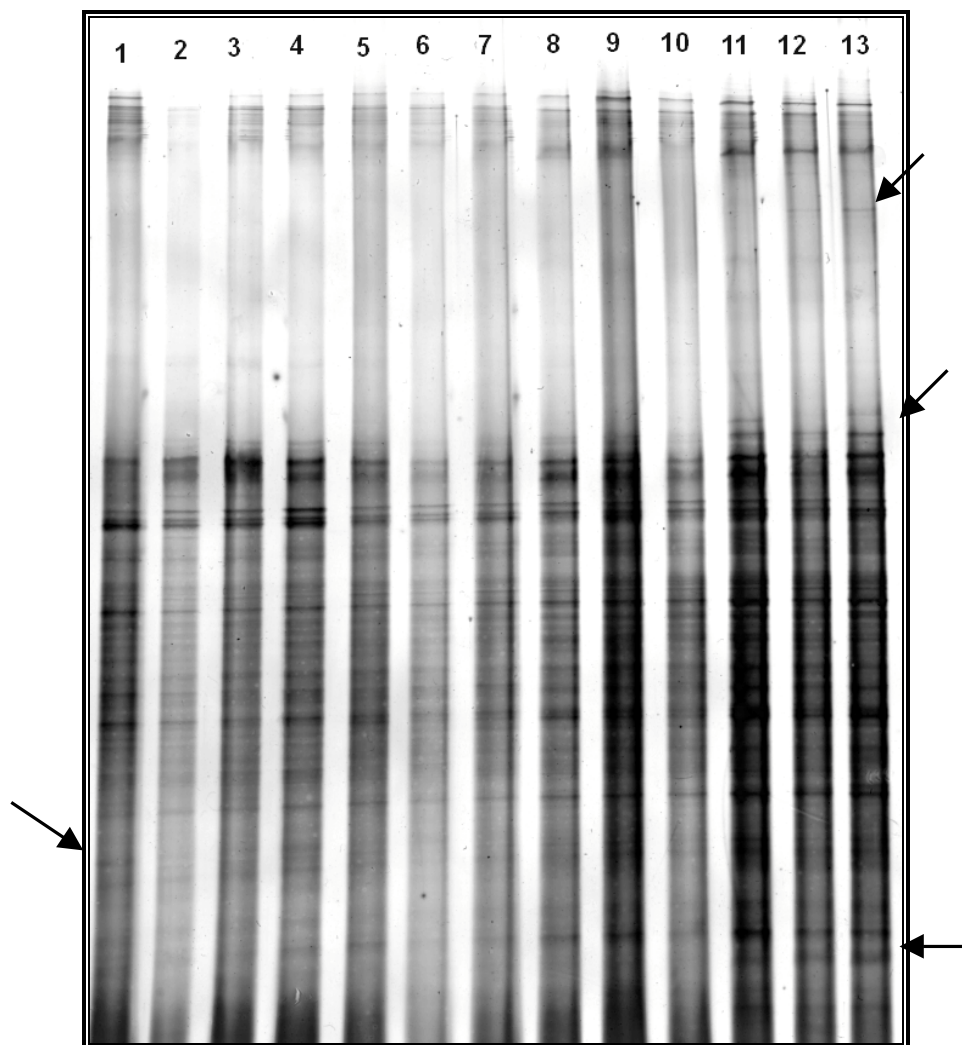
#### 4.3.5 Vergleichende DGGE-Fingerprintanalyse verschiedener Versuchsphasen

Zur Unterscheidung von saisonalen Einflüssen und solchen aufgrund der Nonylphenolbelastung im Sediment auf die bakterielle Diversität wurden DGGE-Fingerprints verglichen. Es wurden die Proben der 16S-rDNA-Teilamplifikate (Abb. C 18) aus dem niedrigst belasteten Mikrokosmos N1, dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 und dem Kontrollmikrokosmos K aus den verschiedenen Versuchsperioden aufgetragen. Die Pfeile in Abb. C 18 weisen die Bandenunterschiede auf.

Mittels der hierarchischen Clusteranalyse konnte eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen werden, die jeweils den drei Perioden Präapplikation, Applikation und Postapplikation entsprachen (Abb. C 19). Die Ähnlichkeitsmatrizen finden sich im Anhang (Tab. G 3).

- Die Sedimentproben am Tag 25 und 44 der Applikationsperiode konnten zu einer Gruppe zusammengefaßt werden (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,6). Zu beiden Probenentnahmezeitpunkten war das Bandenmuster aus dem niedrigst belasteten Mikrokosmos N1 dem Kontrollmikrokosmos K ähnlicher als dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient Tag 25: N1 zu K: 0,680; N1 zu N7: 0,654; Tag 44: N1 zu K: 0,667; N1 zu N7 0,6).
- Die Probe der Postapplikationsperiode am Tag 80 ließ sich von der Applikationsperiode eindeutig mit einem *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,194 unterscheiden. Auch bei dieser Probeentnahme zeigte das Bandenmuster der 16S-rDNA-Teilamplifikate des Mikrokosmos N1 eine größere Ähnlichkeit zur Kontrolle (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,611) als zu Mikrokosmos N7 (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,563).
- Die Proben der Präapplikationsperiode vom 25.5.1998 in den Mikrokosmen und die Sedimentprobe, die direkt aus dem Ammersee (AS) am 24.3 1998 entnommen wurde, ließen sich zu einer weiteren Gruppe zusammenfassen, die sich mit einem *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,333 von den Proben der Postapplikationsperiode unterschied. Dabei zeigte das Bandenmuster der direkt entnommenen Ammerseeprobe eine mittlere bis geringe Korrelation zu den Mikrokosmen N1, N7 und der Kontrolle K (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,556 - 0,382). Die Mikrokosmen N1, N7 und K wiesen ebenfalls mittlere bis geringe *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten (0,591 - 0,344) auf.





**Abb. C 18:** DGGE-Übersicht-Fingerprint der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der Präapplikationsperiode, der Applikationsperiode, der Postapplikationsperiode, sowie aus DNA direkt entnommenen Ammerseesediments.

1 - direkt entnommenes Ammersee-sediment 24.3.1998

**Präapplikation 25.5.1998:**

2 - N1  
3 - N7  
4 - Kontrolle

**Applikation 10.7.1998, Tag 25:**

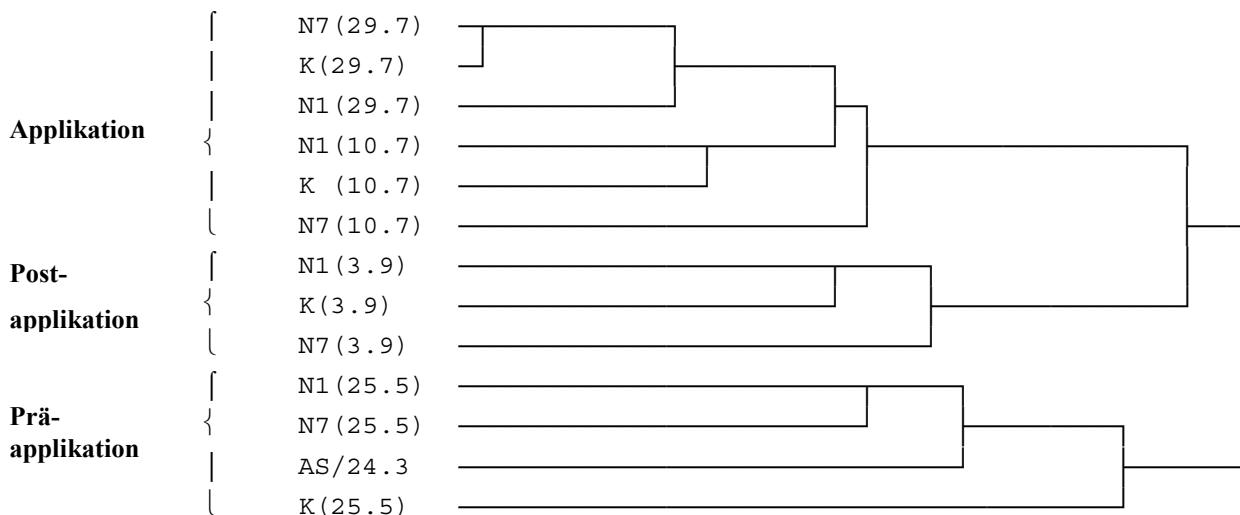
5 - N1  
6 - N7  
7 - Kontrolle

**Applikation 29.7.1998, Tag 44:**

8 - N1  
9 - N7  
10 - Kontrolle

**Postapplikation 3.9.1998, Tag 80:**

11 - N1  
12 - N7  
13 - Kontrolle



**Abb. C 19:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-DNA in der *Präapplikationsperiode*, der *Applikationsperiode*, der *Postapplikationsperiode*, sowie aus DNA des direkt entnommenen Ammerseesediments (AS/24.3).

#### 4.4 Optimierung der RT-PCR aus Sediment-rRNA

##### Zweischritt-RT-PCR

Zur Amplifikation von 16S-rRNA aus Sediment wurde im Rahmen dieser Arbeit ein RT-PCR-Protokoll entwickelt, das die reproduzierbare Vervielfältigung von rRNA in komplexen Umweltproben erlaubt. Dafür wurde die Reverse Transkriptase aus einer genetisch veränderten Variante des Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MuLV-RT, Expand Reverse Transkriptase<sup>TM</sup>; Roche, Penzberg, FRG) angewandt (B 8.3.3). Sie ist eine spezifisch RNA-abhängige Polymerase und kann DNA nicht amplifizieren. Zur Optimierung dieser RT-PCR für Sediment-rRNA wurden verschiedene Zusatzstoffe getestet. Dabei wurde „T4 gene 32 proteine“ und BSA in die Erststrangsynthese und DMSO in die Zweitstrangsynthese gegeben.

Zur Anpassung der RT-PCR aus Sediment-rRNA wurde das Primerpaar 616V/612R verwendet. Es war bereits zur Anwendung in Umweltproben etabliert (Stoffels, 1998) und besitzt keine G+C-Klammer.

## PCR - Zusätze

### T4 gene 32 proteine

Durch den Zusatz von „T4 gene 32 proteine“ in der Erststrangsynthese konnte beim Einsatz von 2 und 4 µl RNA in die PCR eine schwache und unvollständig amplifizierte Bande erzielt werden. In der Kombination von BSA und „T4 gene 32 proteine“ wurde kein Amplifikat erzielt. In Variation von BSA, DMSO mit „T4 gene 32 proteine“ konnte ein schwaches PCR-Produkt gewonnen werden. Beim Einsatz von DMSO und „T4 gene 32 proteine“ wurden vollständige Amplifikate mit geringer Ausbeute erzielt.

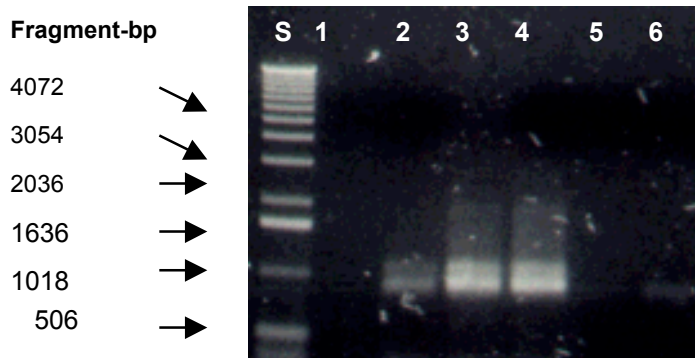
### BSA und DMSO

Durch den Einsatz von BSA alleine konnte ein PCR-Produkt mit geringer Ausbeute erzielt werden. Bei gleichzeitiger Zugabe von „T4 gene 32 proteine“, DMSO und BSA wurde dieses Ergebnis nicht verbessert. Erst durch den Einsatz den kombinierten Einsatz von BSA in die Erststrangsynthese und DMSO in die Zweitstrangsynthese ohne „T4 gene 32 proteine“ konnten vollständige PCR-Produkte mit befriedigender Ausbeute erzielt werden (Abb. C 20, Spur 3 und 4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RT-PCR mit 5 % (v/v) DMSO in der Zweitstrangsynthese und 0,3% (w/v) BSA-Endkonzentration in der Erststrangsynthese sowie ohne den Zusatz des T4 gene 32 proteine durchgeführt.

### Anmerkung:

Die Positiv-Kontrolle wurde mit isolierter rRNA aus *Escherichia coli* durchgeführt. Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten wurden auch bei der Positiv-Kontrolle BSA und DMSO hinzugefügt. Aus eigener Überprüfung ergab sich daß, die Ausbeute des PCR-Produkts bei Reinkultur-RNA und bei der Amplifikation mit Expand Reverser Transkriptase <sup>TM</sup> mit den Zusätzen DMSO und BSA immer geringer als ohne diese Komponenten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. C 20:** Agarosegel zur Zweischnitt-Reversen-Transkription aus Sediment-rRNA

<b>S</b>	<b>Standard</b>
<b>1</b>	<b>leer</b>
<b>2</b>	<b>1 µl RNA mit BSA und DMSO</b>
<b>3</b>	<b>2 µl RNA mit BSA und DMSO</b>
<b>4</b>	<b>4 µl RNA mit BSA und DMSO</b>
<b>5</b>	<b>Negativ-Kontrolle</b>
<b>6</b>	<b>Positiv-Kontrolle.</b>

#### 4.5 Analyse der 16S-rRNA-Amplifikate im DGGE-Fingerprint

Zur Analyse der Sediment-rRNA wurde das Nukleinsäuregemisch nach B 6 isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkription (B 8.3.3) amplifiziert sowie nach B 8.4 und B 8.5 aufgereinigt und die Überhänge verdaut. Die Auftrennung des Amplifikats erfolgte mit Hilfe einer Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) (B 9 - B 11). Die Analyse dieses Fingerprints wurde mit der hierarchischen Clusteranalyse durchgeführt (B 12).

#### Vergleichende DGGE-Fingerprintanalyse verschiedener Versuchsphasen

Zur weiteren Differenzierung von saisonalen und ökotoxikologischen Einflüssen im Sediment auf die bakterielle Diversität wurden DGGE-Fingerprints von 16S-rRNA verglichen. Die relative Abundanz der rRNA gibt Aufschluß über die relative physiologische Aktivität der untersuchten Population (Amann et al., 1995).

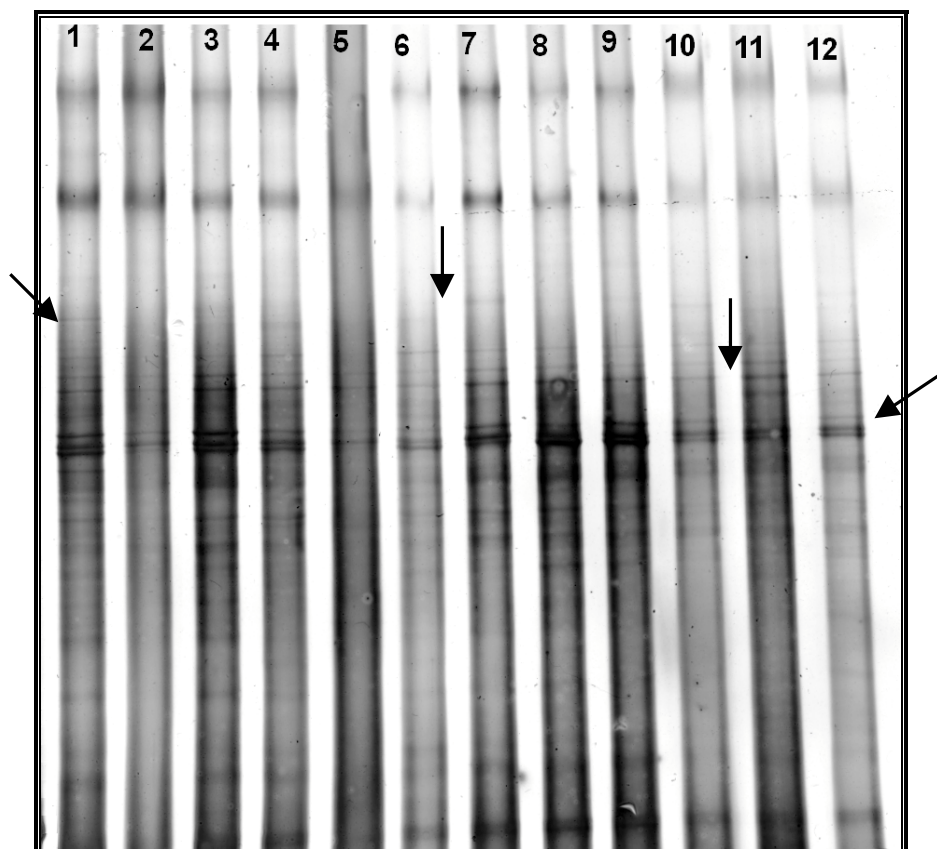
Es wurden die Proben der 16S-rRNA-Teilamplifikate (Abb. C 21) aus dem niedrigst belasteten Mikrokosmos N1, dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 und dem Kontrollmikrokosmos K aus den verschiedenen Versuchsperioden untersucht.

Die Ähnlichkeitsmatrizen finden sich im Anhang (Tab. G 4). Die Pfeile weisen die Bandenunterschiede auf.

Das Bandenmuster der 16S-rRNA wies große Ähnlichkeiten zu dem Hauptbandenmuster der 16S-rDNA auf (vgl. Abb. C 18 und C 21).

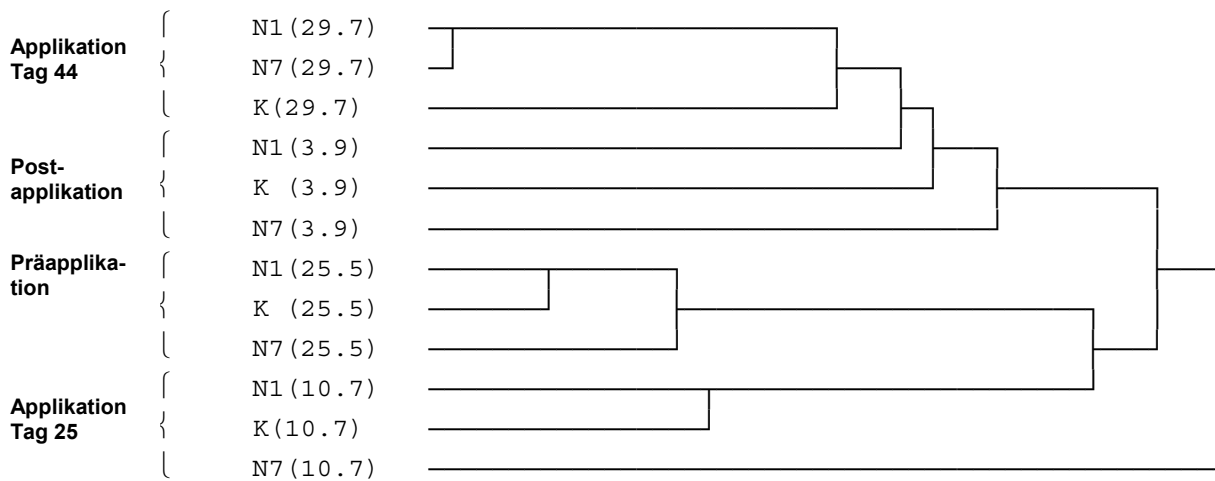
Mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse konnten den vier Probeentnahmen vier Gruppen zugeordnet werden: Präapplikationsperiode, Applikationsperiode Tag 25 und 44 sowie Postapplikationsperiode (Abb. C 22).

- Die Probe der Präapplikationsperiode am 25.5.1998 aus dem Kontrollmikrokosmos wies im Vergleich mit der Probe aus dem Kontrollmikrokosmos der Postapplikationsperiode einen *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,421 auf. Bei Vergleich der Sedimentprobe aus dem Kontrollmikrokosmos vom Tag 25 der Applikationsperiode mit der Kontrollprobe aus der Präapplikation ergab sich ein *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient von 0,438. Das 16S-rRNA Bandenmuster vom 25.5.1998 (Präapplikationsperiode) von Mikrokosmos N1 wies beim Vergleich mit dem Kontrollmikrokosmos K und zum Mikrokosmos N7 eine hohe Korrelation auf (*Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient 0,786 bzw. 0,714).
- Die Proben der Applikationsperiode am Tag 25 und 44 waren deutlich voneinander abgrenzbar. Tag 25 unterschied sich von der Probe der Präapplikationsperiode mit einem *Jaccard*-Korrelationskoeffizienten von 0,471 und von Tag 44 mit einem *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,200. Die Bandenmuster von Tag 25 der Applikationsperiode wiesen eine größere Ähnlichkeit zu den Proben der Präapplikationsperiode auf als zu den Proben von Tag 44 der Applikationsperiode. Des weiteren war am Tag 25 das Bandenmuster des Kontrollmikrokosmos ähnlicher zu der höchstbelasteten Sedimentprobe N7 als zu N1. Ein umgekehrter Sachverhalt ergab sich am Tag 44.
- Die Proben der Postapplikationsperiode am Tag 80 bildeten keine klar abgrenzbare Gruppe. Sie unterschieden sich mit einem *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,588 von denen der Applikationsperiode am Tag 44. Die Bandenmuster der untersuchten Mikrokosmen N1, N7 und K wiesen Ähnlichkeitskoeffizienten mit mittleren Werten auf.



**Abb. C 21:** DGGE-Übersicht-Fingerprint der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-rRNA der Präapplikationsperiode, der Applikationsperiode und der Postapplikationsperiode.

<b>Präapplikation 25.5.1998:</b>	1 - N1 2 - N7 3 - Kontrolle
<b>Applikation 10.7.1998, Tag 25:</b>	4 - N1 5 - N7 6 - Kontrolle
<b>Applikation 29.7.1998, Tag 44:</b>	7 - N1 8 - N7 9 - Kontrolle
<b>Postapplikation 3.9.1998, Tag 80:</b>	10 - N1 11 - N7 12 - Kontrolle



**Abb. C 22:** Hierarchische Clusteranalyse der PCR-amplifizierten Teilsequenzen aus Sediment-rRNA der Präapplikationsperiode, der Applikationsperiode und der Postapplikationsperiode.

#### 4.6 Identifizierung der 16S-rDNA- und 16S-rRNA-Amplifikate

Zur Identifizierung und phylogenetischen Einordnung von im Mikrokosmensediment vorkommenden Bakterien und Organismen wurden die rDNA und rRNA (nach RT-PCR) mit dem Primerpaar U 968 und L 1401 amplifiziert, kloniert, sequenziert und die Sequenzen verglichen (B 8 sowie B 13 - B15). Es wurden Klonbanken des höchst belasteten Mikrokosmos N7 und des nicht belasteten Kontrollmikrokosmos K angefertigt, ausgehend von isolierter DNA und RNA (B 6).

Für alle erhaltenen 28 Klone wurden Distanzmatrizes berechnet. Im folgenden werden nur für einige Sequenzen die errechneten Distanzmatrizes angegeben.

#### 4.6.1 $\alpha$ -Proteobacteria

Amplifikate der 16S-rDNA Teilsequenz eines unbelasteten Kontrollmikrokosmos aus der Postapplikationsperiode konnten einerseits den  $\alpha$ -Proteobacteria und andererseits nicht kultivierten Bakterien zugeordnet werden (Abb. C 23). Die Sequenzähnlichkeiten betragen 92- 96 %. Eine Sequenzähnlichkeit von 96% wies ein nicht kultiviertes „Green Bay Ferromanganous micronodule“ Bakterium AF 292998.1 auf. Einem Bakterium aus dem Klärschlamm (AF 234750.1), das auch marin lebt, konnte eine Sequenzähnlichkeit von 95% zugeordnet werden. *Methylocella palustris* (Y17144) lies sich dem Amplifikat mit einer Ähnlichkeit von 93% zuordnen.

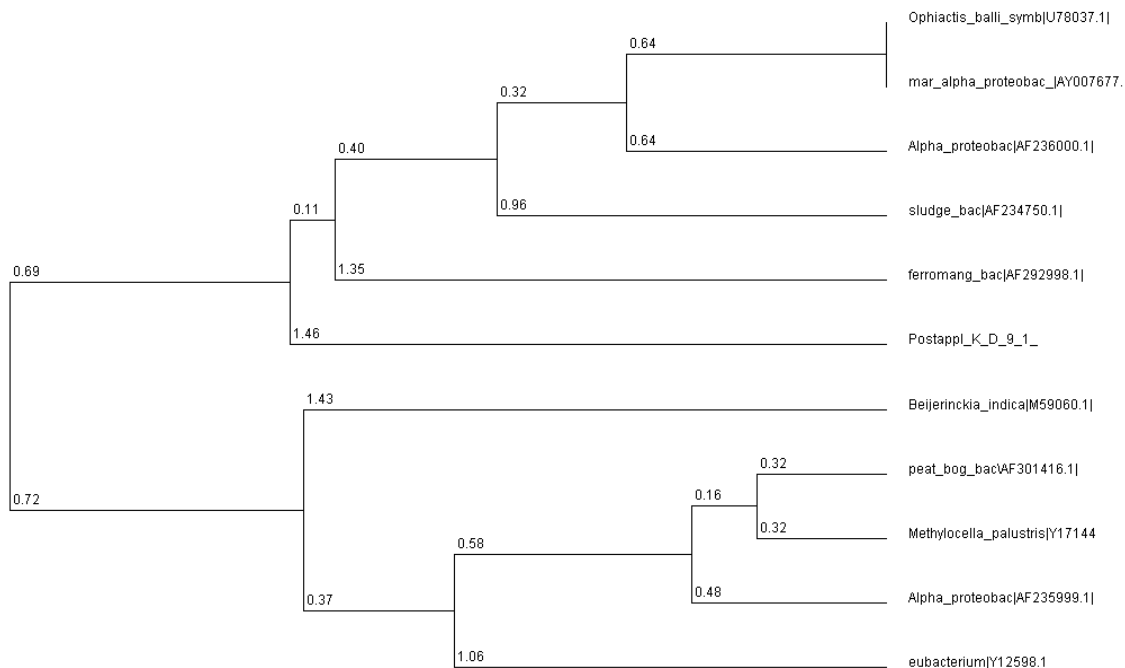
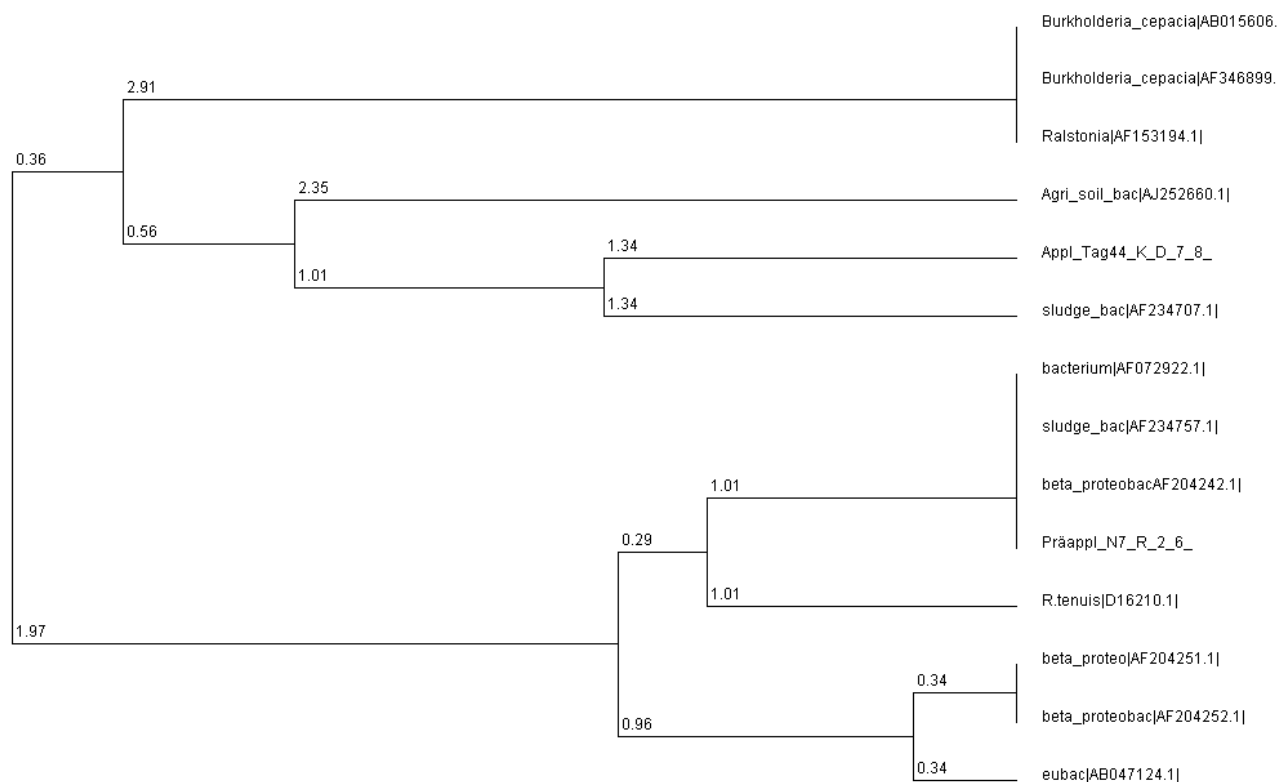


Abb. C 23: „average distance tree“ von 16S-rDNA-Teilsequenzen ( $\alpha$ -Proteobacteria).

#### 4.6.2 $\beta$ -Proteobacteria

Das 16S-rRNA- und 16S-rDNA Teilamplifikat der Prä- und der Applikationsperiode aus dem noch unbelasteten Mikrokosmos N7 und dem Kontrollmikrokosmos K konnte den  $\beta$ -Proteobacteria und bisher nicht kultivierten Bakterien zugeordnet werden (Abb. C 24, Präappl\_N7\_R\_2\_6 und Appl\_Tag44\_K\_D\_7\_8). *Rhodocyclus tenuis* (D16210.1) wies eine Sequenzähnlichkeit von 95% zum Amplifikat aus der Präapplikationsperiode auf, *Burkholderia cepacia* eine Sequenzähnlichkeit von 90 % zu dem Amplifikat der Applikationsperiode.

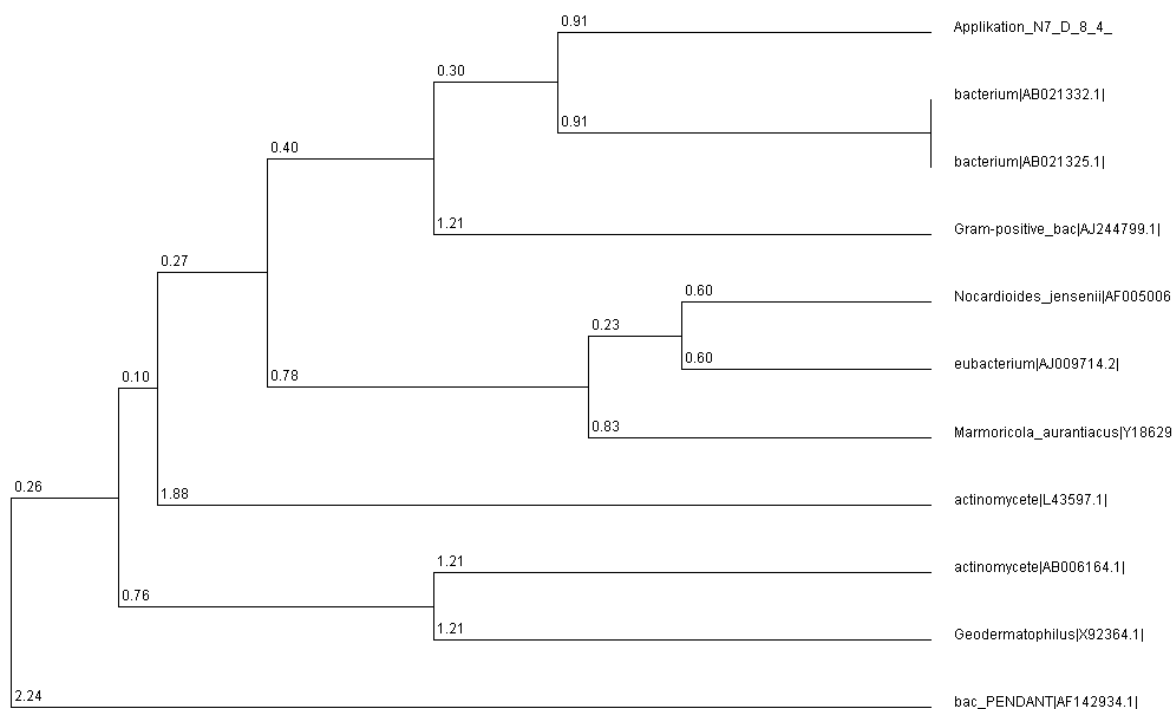




**Abb. C 24:** „average distance tree“ von 16S-rDNA- und -rRNA-Teilamplifikaten ( $\beta$ -Proteobacteria).

#### 4.6.3 Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA

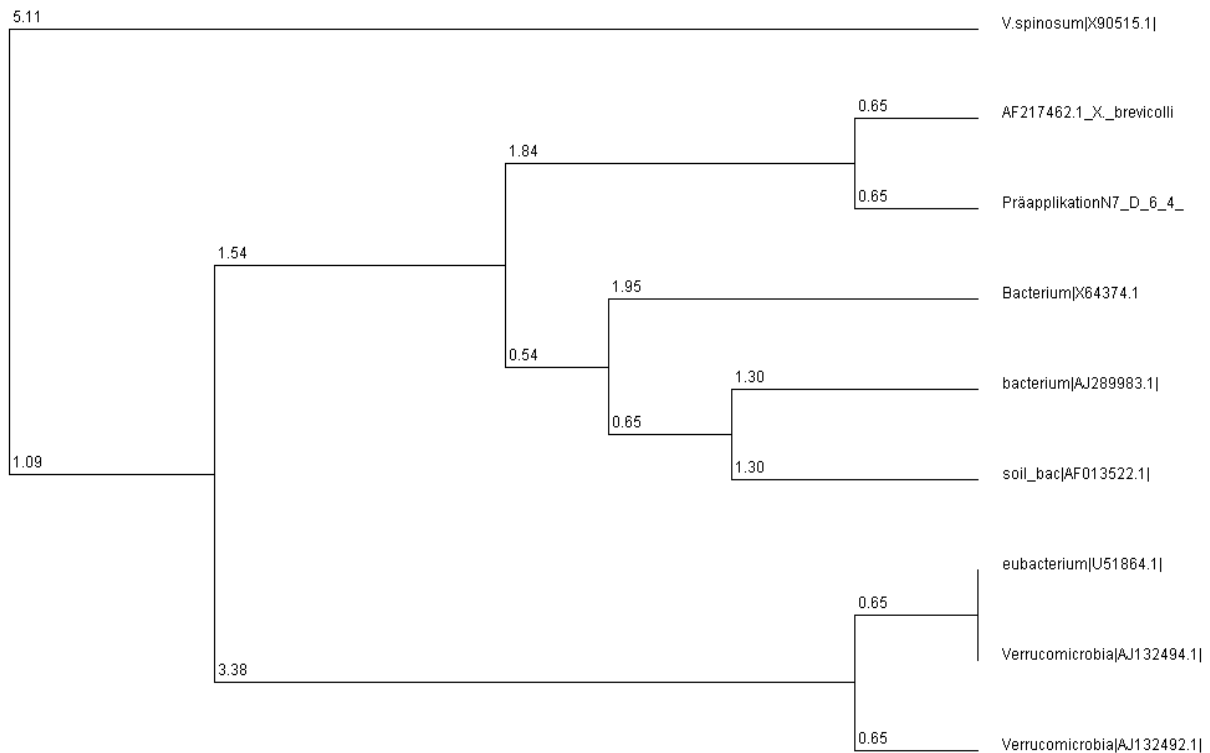
Die 16S-rDNA Teilsequenz der Applikationsperiode aus Mikrokosmos N7 wies Sequenzähnlichkeiten von 96 - 98 % zu 16S-rDNA Sequenzen nicht kultivierter Gram-positiver Bakterien mit hohem G+C-Gehalt auf (Abb. C 25). Eine Sequenzähnlichkeit von 98 % konnte bei den nicht kultivierten Bakterien AB021332.1 und AB021325.1 berechnet werden.



**Abb. C 25:** „average distance tree“ zu Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA.

#### 4.6.4 Verrucomicrobia

Die Teilsequenz der 16S-rDNA aus Mikrokosmos N7 der Präapplikationsperiode wies Ähnlichkeiten bis zu 94 % zu Bakterien aus der Gruppe der *Verrucomicrobia* auf (Abb. C 26). Zu weiteren Sequenzen aus Bodenisolaten (AF013522.1) konnten Ähnlichkeiten von 91 - 94 % berechnet werden.



**Abb. C 26:** „average distance tree“ zu *Verrucomicrobia*.

#### 4.6.5 Weitere Sequenzen

Viele Sequenzen wiesen keine eindeutige phylogenetische Zuordnung auf. *Rhodothermus marinus* (AF217498), der dem *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum angehört, zeigte eine Ähnlichkeit von 87 % zu der Sequenz der Postapplikationsperiode. Gleichzeitig wies die Sequenz zur Gruppe der  $\delta$ -Proteobacteria eine Ähnlichkeit bis zu 85 % auf (AF177429 und *Desulfotignum balticum*, AF233370).

Eine 16S-rRNA-Teilsequenz aus der Sedimentprobe der Präapplikationsperiode aus Mikrokosmos N7 konnte den  $\gamma$ -Proteobacteria und noch nicht kultivierten Bakterien zugeordnet werden. Die Bakterien wiesen Sequenzähnlichkeiten bis zu 90 % zu dem klonierten Amplifikat auf (AF285618, AF317742, AF247489).

Der 16S-rDNA Teilsequenz der Präapplikationsperiode aus Mikrokosmos N7 konnten Bakteriensequenzen aus der Gruppe der *Grünen Schwefelbakterien* mit einer Sequenzähnlichkeit bis zu 93 %, zugeordnet werden (Y07837.1, *Prosthecochloris aestuarii* und Y10641.2, *Chlorobium limicola*). Eine Sequenzähnlichkeit von 96 %, wies ein noch nicht kultiviertes Bakterium AF320932.1 aus dem Lake Michigan auf.

Grüne Nichtschwefelbakterien sowie nicht kultivierte Bakterien konnten der 16S-rDNA-Teilsequenz aus der Präapplikationsperiode mit Sequenzähnlichkeiten von 86 - 89 % zugeordnet werden.

Die 16S-rRNA Sequenz der Applikationsperiode aus dem Kontrollmikrokosmos K wies Sequenzähnlichkeiten von bis zu 88 % zu den Plantomycetales auf (AF239695.1, X81941.1, AJ231172.1, AF280862.1). Weitere bisher noch nicht kultivierte Bakterien wie AJ292685.1 und AJ292687.1 wiesen Sequenzähnlichkeiten bis zu 94 % zu dem isolierten Klon auf.

#### **4.6.6 Phytoplankton und bakterielle rRNA aus Sandboden**

Acht Sequenzen der 16S-rDNA und rRNA Teilamplifikate der Prä- und Applikationsperiode wiesen Sequenzähnlichkeiten zu einer nicht kultivierten Sequenz (AF298112.1) auf. Sie konnte aus Bakterien-rRNA aus Sandboden isoliert werden (Abb. C 27).

Diese Sequenzen konnten zusammen mit Teilsequenzen der 16S-rDNA und -rRNA aus der Präapplikationsperiode und der Applikationsperiode dem Phytoplankton zugerechnet werden (Abb. C 27). Die zugeordneten Sequenzen konnten sowohl den *Cyanobacteria (Bacteria)* als auch der 16S-rDNA von Chloroplasten eukaryotischen Algen zugeordnet werden.

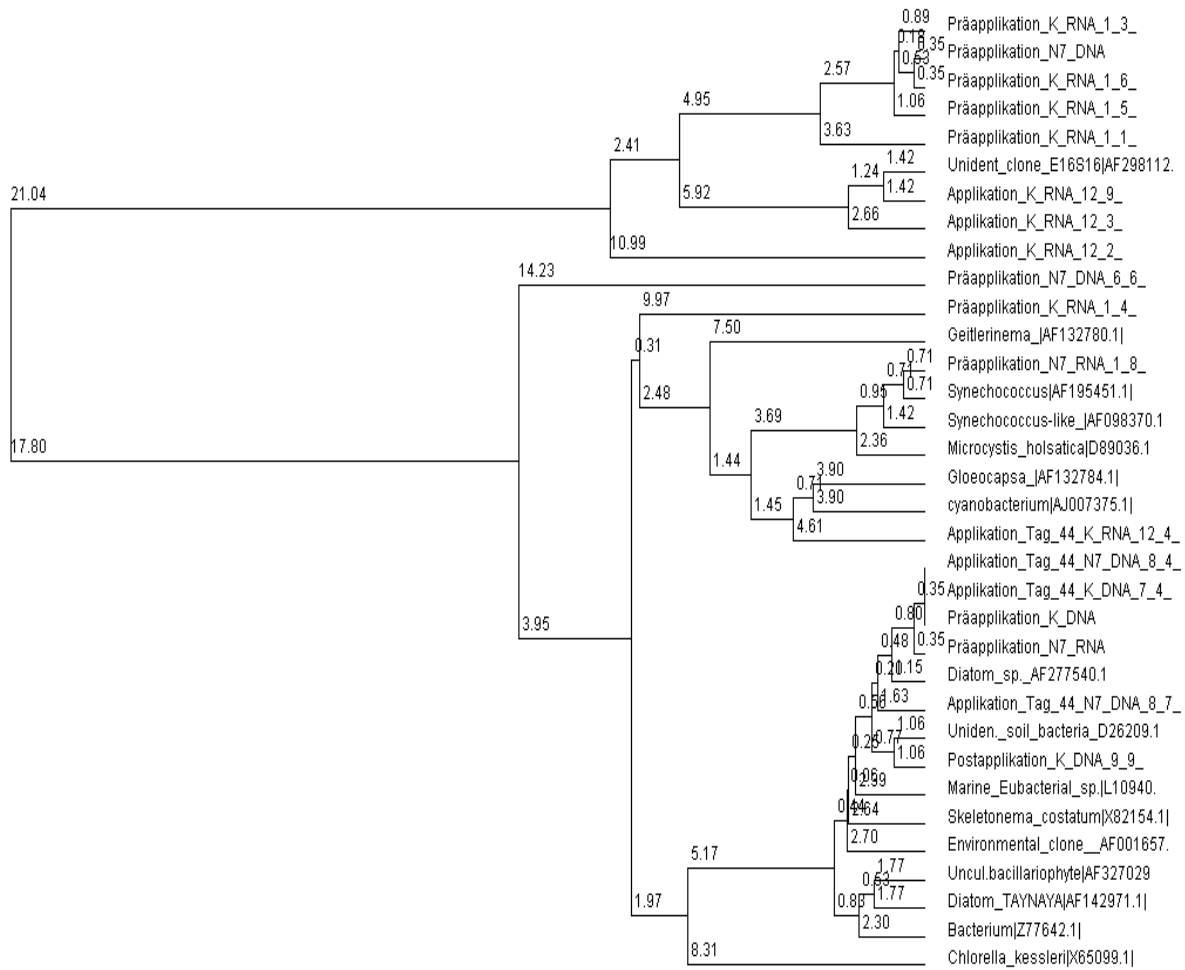


Abb. C 27: „average distance tree“ zu Cyanobakterien und Chloroplasten-DNA eukaryotischer Algen.

## **D Diskussion**

### **1 Methodische Aspekte**

Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaft sind grundlegend für das Verständnis der aquatischen Mikrobiologie. Kultivierungsabhängige Methoden führten in der Vergangenheit zu einer Unterschätzung der Diversität der auftretenden Bakterien in den verschiedenen Habitaten. Die Erfassung der mikrobiellen und bakteriellen Diversität kann nur mit molekularen Methoden geleistet werden, die auf der Sequenzierung der rDNA und rRNA basieren (Amann, 1995; Bakken, 1997; Heuer und Smalla, 1997; Bosshard et al., 2000; Schloter et al., 2000).

Zur Analyse der mikrobiellen Diversität im Sediment der aquatischen Mikrokosmen wurde in der vorliegenden Arbeit der „Top to Bottom Approach“ (Amann, 1995) gewählt. Zur Erfassung aller vorhandenen Bakterienpopulationen und der physiologisch aktiven Bakterienzellen wurden Methoden eingesetzt, die zum einen auf der Analyse von 16S-rDNA und zum anderen auf der von 16S-rRNA basierten (Felske, 1999; Spring et al., 2000). Um einen möglichst umfassenden Einblick in die bakterielle Diversität zu erhalten, griffen drei Methoden ineinander:

- *In situ* Hybridisierung, zur Erfassung der Domäne *Bacteria* und wichtiger auftretender Bakteriengruppen im Vergleich zur Gesamtzellzahl;
- DGGE-Analyse der Amplifikate bakterieller Teilstücke der 16S-rDNA und -rRNA mit Universalprimern mit anschließender hierarchischer Clusteranalyse;
- Klonierung und Sequenzierung der rDNA- und rRNA-Amplifikate, zur Identifizierung einzelner Bakterienspezies.

Bei der *in situ* Hybridisierung konnten mit der Oligonukleotidsonde EUB 338 44 - 90 % der DAPI-färbbaren Zellen erfaßt werden (Tab. C 2 A, B, C). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung denen anderer Arbeitsgruppen über meso- und eutrophe aquatische Habitate (Bruns und Berthe-Corti, 1998; Llobet-Brossa et al., 1998; Schweitzer et al., 2001). Die Hybridisierung mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden ergab, daß die dominanten Bakteriengruppen den  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria und  $\gamma$ -Proteobacteria zugeordnet werden konnten.  $\alpha$ -Proteobacteria

und  $\beta$ -Proteobacteria bilden nicht nur dominante Gruppen im Süßwasser und marinen Systemen, sondern sie sind auch maßgeblich am Umsatz von Biomasse beteiligt (Schweitzer et al., 2001; Zubkov et al., 2001). Aus diesem Grunde ist anzunehmen, daß bei der Bildung von DOC im Mikrokosmensediment (Abb. C 5)  $\alpha$ -Proteobacteria und  $\beta$ -Proteobacteria eine wichtige Rolle gespielt haben. Eine Gruppe mit geringerer Abundanz bildeten das *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum und die Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt und niedrigem G+C-Gehalt (Abb. C 9). In marinen Systemen bildet das *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum eine dominante Gruppe (Pernthaler et al., 1998; Llobet-Brossa et al., 1998; Glöckner et al., 1999; Amann und Ludwig 2000).

Durch den Vergleich der 16S-rDNA und -rRNA-Teilstücke in DGGE-Fingerprints und anschließender hierarchischen Clusteranalyse konnten geringe Verschiebungen der Bakterienpopulation in Abhängigkeit von der Belastung in der Applikationsperiode aufgezeigt werden. Die Fingerprints der 16S-rDNA-Teilstücke zeigten ein komplexeres Bandenmuster mit mehr Banden als die Fingerprints der 16S-rRNA-Teilstücke (Abb. C 18 und C 21). Letzteres bedeutet, daß ausgehend von den gesamt vorhandenen Bakterien nur wenige physiologisch aktiv waren.

Mit Hilfe der DGGE-Fingerprints können nur Sequenzunterschiede und Abundanzunterschiede der Bakterien aufgezeigt werden (Muyzer und Smalla, 1998). Sie lassen jedoch keine Identifizierung der Bakterien zu. Daher wurden die Teilstücke der 16S-rDNA und -rRNA mit denselben Primern amplifiziert und kloniert, die schon für die DGGE-Fingerprints verwendet worden waren. Eine anschließende Sequenzierung diente zur phylogenetischen Einordnung der Bakterien. Die Sequenzlänge von ca. 400 bp stellte einen Kompromiß zwischen optimaler Auftrennung im DGGE-Fingerprint und Identifizierung der Bakterien durch Sequenzierung dar. Ludwig und Schleifer (1994) empfehlen zur Sequenzierung und phylogenetischen Einordnung Vollsequenzen der 16S-rDNA.

Insgesamt wurde eine Klonbank von 28 Klonen erfaßt, wobei 18 auf prokaryotische Sequenzen fielen und die weiteren Chloroplasten-DNA von Algen repräsentierten (C 4.6). Nur fünf Bakteriensequenzen konnten schon bekannten Bakterien zugeordnet werden, die übrigen bisher unbekanntes und noch nicht kultivierten Bakterien. Durch die relativ geringe Anzahl der sequenzierten Klone kann keinerlei Aussage über die Abundanz der untersuchten Organismen und ihre Zuordnung zu

einer Behandlungsvariante getroffen werden. Da nur 28 % der Klone bereits bekannten Bakterien zugeordnet werden konnten, dokumentiert dieses Ergebnis den enormen Forschungsbedarf der Aufklärung der mikrobiellen Diversität in aquatischen Systemen und anderen Habitaten mit Hilfe von rDNA- und rRNA-gerichteten Methoden (Spring et al., 2000; Amann und Ludwig, 2000).

## **2     *Einfluß von Nonylphenol***

Um den möglichen Einfluß der Testsubstanz Nonylphenol untersuchen zu können, war es wichtig, die Populationsuntersuchungen mit funktionellen Parametern (Proteasemessung) zu ergänzen.

### **2.1   Funktionseller Parameter (Proteaseaktivität)**

Anhand funktioneller Parameter sollte die Änderung einer physiologischen Funktion der Mikroflora unter dem Einfluß von Nonylphenol erkennbar werden. Hierfür wurde die Aminopeptidase ausgewählt, da sie bei allen Mikroorganismen vorhanden ist. Sie stellt ein extrazelluläres Enzym dar und katalysiert den Abbau von Proteinen zu Peptiden. Diese Aktivität ist zu über 95 % den Bakterien zuzuordnen (Chrost, 1991; Somville, 1994), so daß Verfälschungen der Ergebnisse durch Eukaryonten vernachlässigbar sind.

Die Aktivität der Aminopeptidasen im Mikrokosmensediment variierte von 10 - 55  $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$ , (Abb. C 6). Dies entspricht den Ergebnissen von Fabiano und Danovaro (1998) bei Untersuchungen in der Ross Sea der Antarktis und von Simon et al. (2000) über Lake Snow-Aggregate im Lake Kinneret in Israel.

In der Applikationsperiode am Tag 44 und in der Postapplikationsperiode am Tag 72 unterschied sich die Enzymaktivität in den dosierten Mikrokosmen von den unbehandelten Kontrollen. Dies konnte in der Postapplikationsperiode mit den DOC-Gehalten in Verbindung gebracht werden, da in denselben Mikrokosmen sowohl erhöhte Aminopeptidase-Aktivitäten als auch erhöhte DOC-Werte im Sediment auftraten (Abb. C 5 und C 6). Die durch die Aktivität von photosynthetischen Algen entstandene Biomasse hatte im Laufe des Sommers zu einem erhöhten DOC-Gehalt nach teilweisem Absterben geführt. Boschker und Cappenberg (1998) sowie Poremba (1995) gehen davon aus, daß die enzymatische Aktivität extrazellulärer Enzyme im Sediment auf



den Gehalt an organischem Material zurückzuführen ist, das das Substrat für heterotrophe Bakterien darstellt.

Da die Aktivität der Aminopeptidase nicht mit der Nonylphenolbelastung zu korrelieren war, sondern von Veränderungen der Kohlenstoffquellen abzuhängen scheint, läßt sich folgern, daß die Testsubstanz im gewählten Konzentrationsbereich keine toxische Wirkung auf die Funktion der Mikroorganismen ausübt. Vielmehr haben saisonale Parameter, wie der Anstieg des DOC-Gehaltes im Sediment, für die Aktivität der Sedimentmikroflora eine entscheidende Bedeutung. Der Einfluß von Nonylphenol auf die Funktion der mikrobielle Gemeinschaft hat sich als gering herausgestellt (C 3). Die Effektkonzentrationen variieren beispielsweise von  $EC_{50}$  (5 min) = 0,44 mg/l bei *Vibrio fischeri* (Abnahme der Biolumineszenz) bis  $EC_0$  (2 h) = 32 mg/l bei *Bacillus subtilis* (Hemmung der Sporenkeimung; Rippen, 1998).

## 2.2 Populationsstruktur

Die in dieser Arbeit untersuchten Parameter bakterieller Populationsstruktur dienten der Aufklärung der Diversität der Bakteriengemeinschaft im Sediment unter Einfluß von Nonylphenol. Dafür wurde ein kultivierungsunabhängiger Ansatz auf der Basis der Analyse der 16S-rDNA und -rRNA gewählt. Neben der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung mit 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden wurden PCR- und RT-PCR-Ansätze von 16S-rDNA und 16S-rRNA und nachfolgender DGGE-Analyse sowie Klonierungen durchgeführt.

### 2.2.1 *In situ* Hybridisierung mit 16S-rRNA gerichteten-Oligonukleotidsonden

Zur Erfassung der Zahl aktiver Bakterien im Vergleich zur Gesamtzellzahl erfolgte eine Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (Amann und Ludwig, 2000). Dabei wurde eine Hybridisierung mit der fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonde EUB 338 zur Erfassung der physiologisch aktiven Bakterien der Domäne *Bacteria* der Anfärbung mit dem Farbstoff DAPI zur Erfassung der Gesamtzellzahl gegenüber gestellt.

### 2.2.1.1 Vergleich EUB-hybridisierbarer Zellen mit der Gesamtzellzahl

Mit zunehmender Nonylphenolbelastung im Sediment nahm die Gesamtzellzahl in der Applikations- und Postapplikationsperiode signifikant zu (Abb. C 7). Die Zahl der EUB-hybridisierbaren Bakterien stieg ebenfalls im höchst dosierten Mikrokosmos N7 in der Applikationsperiode und in der Postapplikationsperiode am Tag 80 signifikant an (Abb. C 8).

Nonylphenol führte zum Anstieg der Gesamtzellzahl und der EUB-detektierbaren Bakterien. Dies belegt, daß die Testsubstanz nicht generell toxisch auf Bakterien wirkt, sondern vielmehr zu einer Stimulation der Bakterien führte (Jontofsohn et al., in press). Andererseits könnten Nonylphenol-empfindliche Organismen abgestorben sein, wie z.B. *Cladoceren* und *Copepoden* (Severin-Edmaier, 2000) und somit ebenfalls zu einer Erhöhung der mikrobiellen Aktivität im Sediment beitragen. Tanghe et al. (1999) beschreiben eine Erhöhung des Bakterienwachstums bei *Sphingomonas spec.*, wobei Nonylphenol als alleinige Kohlenstoffquelle diente.

Das Verhältnis von Gesamtzellzahl (DAPI) zur Zahl der mit der EUB hybridisierten Zellen variierte zwischen 44 - 90% (Tab. C 2 A - C), wobei kein Einfluß von Nonylphenol auf dieses Verhältnis nachzuweisen war. Vergleichbare Verhältnisse sind für das Wattenmeer im obersten Zentimeter (Llobet-Brossa et al., 1998) und für Sediment aus dem Süßwasser bekannt (Brunns und Berthe-Corti, 1998).

Eine Zunahme der Gesamtzellzahl und der Zahl der aktiven Zellen im Sediment in der Postapplikationsperiode um den Faktor 10 (Abb. C 7 und C 8) konnte zusätzlich mit der Zunahme des DOC-Gehaltes in der Postapplikationsperiode in Zusammenhang gebracht werden (Abb. C 5). Der Anstieg des DOC-Gehaltes könnte die Ursache für den Anstieg der Gesamtzellzahl und der Zahl der aktiven Zellen sein, da den Bakterien mehr gelöster organischer Kohlenstoff angeboten worden ist und ihnen mehr Substrat zur Verfügung stand. Cottrell und Kirchman (2000) stellen die Hypothese auf, daß das Wachstum der gesamten bakteriellen Gemeinschaft von der Verfügbarkeit von gelöstem organischen Material (DOM) begrenzt wird.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Nonylphenol in den gewählten Konzentrationen keinen toxischen Effekt auf die Mikroflora hat, sondern direkt und/oder indirekt stimulierend auf die Bakteriengemeinschaft wirkt. Im weiteren Verlauf des Mikrokosmenexperimentes wurde deutlich, daß äußere Parameter, wie der

saisonal bedingte Anstieg des DOC-Gehaltes im Sediment, den Einfluß von Nonylphenol überlagert.

### 2.2.1.2 Abundanz der Bakteriengroßgruppen

Um den größten Teil der erwarteten Bakteriengruppen erfassen und aufzulösen wurden folgende Sonden eingesetzt: 16S-rRNA- und 23S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden gegen  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria und  $\gamma$ -Proteobacteria. Des weiteren erschienen die Gruppen des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums und der Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt und niedrigem G+C-Gehalt der DNA interessant. Die eingesetzten Oligonukleotidsonden stellen nur eine Auswahl dar (Muyzer und Smalla, 1998), die einen groben Einblick in die mikrobielle Diversität des Sediments geben. Die höchsten Abundanzen von durchschnittlich 25 % bezogen auf die Zahl mit der Sonde EUB 338 hybridisierbaren Zellen bildeten die  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria und  $\gamma$ -Proteobacteria. Beim Vergleich des niedrigst belasteten Mikrokosmos N1 mit dem höchst belasteten Mikrokosmos N7 und dem Kontrollmikrokosmos K konnte nur ein sehr geringer Einfluß von Nonylphenol auf die Abundanz der im Sediment lebenden Bakterien beobachtet werden. In der Applikationsperiode konnten in den beaufschlagten Mikrokosmen N1 und N7 eine Zunahme der Abundanzen der Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt und eine Abnahme der Abundanzen des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. C 9). Möglicherweise sind Vertreter Gram-positiver Bakterien in der Lage, Nonylphenol unter aeroben Bedingungen abzubauen.

Der Vergleich von Bakterienabundanzen mit denen anderer aquatischer Systeme ist schwierig, da er von dem vorhandenen gelösten organischen Material (DOM) abhängt (Cottrell und Kirchmann, 2000). Dennoch ist das Auftreten der  $\beta$ -Proteobacteria hauptsächlich in aeroben, nicht oligotrophen Süßwassersystemen beschrieben (Spring et al., 2000; Cottrell und Kirchmann, 2000). Da in den obersten Schichten des Mikrokosmensediments vorrangig aerobe Verhältnisse herrschten (Abb. C 2 und C 3), ist anzunehmen, daß das dominante Auftreten dieser Bakteriengruppe unter diesen Bedingungen begünstigt wurde. Das Auftreten von  $\alpha$ -Proteobacteria und  $\beta$ -Proteobacteria als dominante Gruppen in einem alpinen Schweizer See von ca. 24 % wurde von Pernthaler et al. (1998) und auf Lake Snow-Aggregaten (Schweitzer et al.,

2001) beschrieben. Die  $\gamma$ -Proteobacteria werden häufig als Gegenspieler der  $\beta$ -Proteobacteria benannt (Cottrell und Kirchmann, 2000), da sie u.a. im anoxischen Sediment vorkommen (Spring et al., 2000).

In der Postapplikationsperiode nahm die Gruppe des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums im Vergleich zu den Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA zu (Abb. C 9). Dies kann auf die veränderten Redoxverhältnisse und auf die Zunahme von organischem Material, ablesbar am DOC-Gehalt im Sediment, zurückgeführt werden (Abb. C 2 und C 5). Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums treten als häufigste Gruppe im Wattenmeer unterhalb der oxischen Zone (Llobet-Brossa et al., 1998), sowie im marinen Wasser auf (Glöckner et al., 1999). Als Antwort auf eine Zunahme der Biomasse der *Cyanobacteria* im anaeroben marinen Sediment treten Mitglieder des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums verstärkt auf (Amann and Ludwig, 2000). Sie sind spezialisiert auf den Abbau von komplexen Makromolekülen, besonders im anaeroben Milieu (Glöckner et al., 1999; Rosselló-Mora et al., 1999). Aus diesen Gründen wäre es denkbar, daß Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter* Subphylums eine wichtige Rolle beim Abbau von Nonylphenol im anaeroben Sediment spielen.

Insgesamt ist ein Einfluß von Nonylphenol auf die untersuchten Bakteriengruppen auf der Ebene von Subphyla kaum nachweisbar. Allein das erhöhte Auftreten der Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle in der Applikationsperiode unter positiven Redoxbedingungen deutet auf eine Veränderung der Bakterienpopulation unter Einfluß von Nonylphenol hin. Unter negativen Redoxbedingungen in der Postapplikationsperiode nahm das *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum unabhängig von der Nonylphenolkonzentration zu.

### **2.2.2 Analyse der Fingerprints und der Klonbanken**

Durch die Analyse der DGGE-Fingerprints konnte die bakterielle Population der mit bakterienspezifischen Primern amplifizierten 16S-rDNA- und -rRNA-Teilstücke auf den Einfluß von Nonylphenol untersucht werden. Zur Auswertung der Bandenmuster diente die hierarchische Clusteranalyse.

Die Bakterienpopulation erwies sich während des gesamten Experiments als sehr stabil (Abb. C 18 und C 21). Geringe Unterschiede aufgrund der Nonylphenol-

Behandlung konnten in der Applikations- und Postapplikationsperiode festgestellt werden (Abb. C 12 - C 17). Jedoch wurde diese Wirkung bei der Übersicht sämtlicher Beprobungszeitpunkte beim Vergleich der 16S-rDNA und -rRNA-Teilstücke von saisonalen Parametern überlagert (Abb. C 18 und C 19, sowie C 21 und C 22). Beim Vergleich des rDNA-Fingerprints einer unbehandelten, direkt entnommenen Ammerseeprobe zeigten sich große Übereinstimmungen mit dem Bandenmuster der Mikrokosmen der Präapplikationsperiode (Abb. C 18, Spur 1 - 4). Dies deutet daraufhin, daß die Bakterienpopulation in den Mikrokosmen ähnlich der des Ammersees war. Die rDNA- und rRNA-Fingerprints zeigten vergleichbare Bandenmuster, dennoch nahm die Anzahl der Banden, die Hinweise auf die Vielfalt der Bakterienspezies in einer Probe gibt, im rRNA-Fingerprint ab. Somit ist anzunehmen, daß die dominante Bakterienpopulation auch in der physiologisch aktiven Bakterienpopulation zu finden war. Die Anzahl der Banden war sowohl im rDNA-Fingerprint als auch im rRNA-Fingerprint von saisonalen Einflüssen und der Wirkung der Testsubstanz unbeeinflusst. Sievert et al. (1999) konnten in submarinen hydrothermalen Vulkanen Veränderungen der Bandenanzahl aufgrund von Temperaturunterschieden nachweisen. Über die Veränderung der mikrobiellen Population aufgrund einer Kontamination ist nur sehr wenig bekannt. Nur bei hohen Schadstoffkonzentrationen im Sediment unter dem Einfluß von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Langworthy et al., 1998) und Quecksilber (Macalady et al., 2000) konnten Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft nachgewiesen werden.

Da die Nonylphenolkonzentration in den Mikrokosmen bis maximal 3 mg/(kg TG) betrug, konnte kein direkter toxischer Effekt und keine dominante, Nonylphenol-abbauende Bakterienpopulation erwartet werden. Zusätzlich war das System nicht Kohlenstoff-limitiert, so daß die Bakterien Nonylphenol nicht als zusätzlich Kohlenstoffquelle nutzen mußten.

Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen des Planktons im Rahmen dieses Querschnittsprogramms überein. Es konnten zwar geringe Effekte auf die Zooplanktonbiozönose nachgewiesen werden, doch beim Phytoplankton deuten weder die Zelldichten noch die Phytoplanktonbiomasse auf eine direkte toxische Wirkung von Nonylphenol hin. Die Principal-Response-Curves ergaben für das Phyto-

plankton keine konzentrationsabhängigen Effekte von Nonylphenol (Severin-Edmaier, 2000).

Bei der Analyse der klonierten 16S-rDNA und -rRNA konnten nur fünf Sequenzen schon bekannten Bakteriengruppen zugeordnet werden. Zwölf 16S-rDNA- und -rRNA Sequenzen repräsentierten bisher noch nicht kultivierte Bakterien. Elf Sequenzen konnten Chloroplasten von Algen zugerechnet werden (vgl. Kap. C 4.6). Wegen der geringen Anzahl der untersuchten Klone kann keine Aussage über Abundanzen von Bakterien oder über einen möglichen Einfluß von Nonylphenol gemacht werden. Es konnten zwei Sequenzen den  $\beta$ -Proteobacteria zugerechnet werden, wobei ein Bakterium zu *Rhodocyclus tenuis* eine Sequenzähnlichkeit von 95 % und zu *Burkholderia cepacia* eine Sequenzähnlichkeit von 90 % aufwies (Abb. C 24). Die  $\beta$ -Proteobacteria sind eine im Süßwassersediment häufig vorkommende Bakteriengruppe (Glöckner et al., 1999), wobei *Burkholderia cepacia* auch im Bodenseesediment und Lake Snow sowie im littoralen Sediment des Chiemsees nachzuweisen ist. Ökologisch ist dieses Bakterium wegen seiner Fähigkeit Thiosulfat, chemolithoheterotroph zu Sulfat zu oxidieren, interessant und es weist ein hohes Potential zum Abbau organischer Verbindungen auf (Spring et al., 2000).

Bei einigen Organismen der klonierten 16S-rDNA- und -rRNA-Sequenzen konnten Ähnlichkeiten von < 95 % berechnet werden. Diese Bakterien können aus diesem Grunde nur als relativ weit verwandte Organismen mit begrenzter ökologischer Aussagekraft beispielhaft angesprochen werden:

Ein Vertreter der Bakteriengattung *Verrucomicrobia* konnte im Mikrokosmensediment mit einer Sequenzähnlichkeit von > 90 % nachgewiesen werden. Die meisten kultivierten *Verrucomicrobia* leben heterotroph aerob und sind nur sehr schwer zu kultivieren. Aus diesem Grunde waren sie in kultivierungsabhängigen Isolierungen unterrepräsentiert (Miskin et al., 1999).

Bei einer Sequenz aus der physiologisch aktiven Bakterienpopulation in der Postapplikationsperiode konnten Sequenzähnlichkeiten von 87 % und von 85 % sowohl zum *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum als auch zum  $\delta$ -Proteobacter (*Desulfotignum balticum*) festgestellt werden. Sowohl die  $\delta$ -Proteobacter (Schulze, 1999; Bosshard et al., 2000) als auch die *Cytophaga-Flexibacter* Gruppe sind im Süßwassersediment beschrieben, wobei das *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum in

aquatischen Süßwassersystemen eine weniger dominante Gruppe ausmachen kann und auf den Abbau komplexer Makromoleküle spezialisiert ist (Llobet-Brossa et al., 1998). Dies könnte für den Abbau von Nonylphenol interessant sein.

Die Analyse der vorhandenen Klone in Zusammenhang mit der Wirkung von Nonylphenol kann aufgrund der geringen Zahl und der neuartigen Sequenzen, die nicht klar zu identifizieren sind, nur bruchstückhaft sein. Des Weiteren ist bei vielen bereits sequenzierten Bakterien ihre Funktion *in situ* noch unklar, (Cottrell und Kirchman, 2000). Zusätzlich wurden ca. 35 % Klone sequenziert, die auf Chloroplastensequenzen von Algen hinwiesen (Abb. C 27). Die Chloroplasten der pro- und eukaryotischen Algen enthalten eine 70S-rRNA, deren 16S-rRNA-Untereinheit aufgrund der Endosymbiontentheorie (z. B. Brock et al., 1994) mit den bakterienspezifischen Primern amplifiziert werden kann. Deswegen würde sich die Erstellung einer umfangreichen Klonbank anbieten, welche die häufig vorkommenden Chloroplastensequenzen ausklammert. Hierfür könnten Peptid-Nukleotide als „modifizierte Primer“ zusammen mit den regulären Primern eingesetzt werden, die eine Amplifizierung der nicht dominant vorhandenen Sequenzen erlauben (Wintzingerode et al., 2000).

### **3 Ausblick**

Die Aufklärung der mikrobiellen Diversität mit Hilfe der Analyse der 16S-rDNA ist eine sehr gute Möglichkeit, um den Einfluß einer Testsubstanz in ihrer natürlichen Umgebung verfolgen zu können. Der Nachweis der 16S-rRNA bietet die Möglichkeit, die physiologisch aktiven Bakterienpopulationen auf Transkriptionsebene erfassen zu können. Durch die Kombination der Detektion einer Bakterienpopulation auf der Transkriptionsebene mit dem Nachweis einer *in situ* Funktion auf der Expressions-ebene eröffnet sich ein neuer Bereich interessanter Fragestellungen.

#### **Kombinierter Nachweis von Transkription und Expression**

##### **Kombination von FISH mit Mikroautoradiographie**

Die Kombination der *in situ* Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden mit der Mikroautoradiographie (Lee et al., 1999) bietet die Möglichkeit, ökotoxikologisch relevante Substanzen zu markieren und ihre Substrataufnahmemuster *in situ* auf der Ebene der individuellen Zellen innerhalb eines mikrobiellen Konsortiums verfolgen zu können.

##### **Kombination von FISH mit einem fluoreszierenden Antikörper**

Die Doppelmarkierung eines Schlüsselenzyms zum Abbau einer eingebrachten Testsubstanz mit gleichzeitigem Nachweis der dafür verantwortlichen Bakterien (Bothe et al., 2000) könnte interessante Fragen bezüglich des Abbauverhaltens *in situ* beantworten. Dafür kann eine spezifische Markierung eines Schlüsselenzyms mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers in Kombination mit einer Oligonukleotidsonde zur Identifizierung der taxonomischen Bakteriengruppe eingesetzt werden.

##### **Nachweis von mRNA**

Die Detektion eines regulatorischen Gens mit Hilfe der Extraktion von mRNA und der Nachweis über die Amplifikation mit RT-PCR (Bach et al., 1999) kann Genexpression zum Abbau der Testsubstanz aufzeigen.



## **E Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion der Bakterien im Süßwassersediment auf einen Belastungsgradienten von Nonylphenol zu untersuchen. Nonylphenol ist eine nicht-ionische oberflächenaktive Substanz, die über den unvollständigen Abbau der Alkylphenolpolyethoxylate in den Kläranlagen in die Gewässer gelangt. Für die Untersuchungen wurde ein künstliches Teichsystem aufgebaut, das aus elf Mikrokosmen bestand. Jeder Mikrokosmos wurde mit ca. 50 l Ammerseesediment und ca. 230 l Ammerseewasser gefüllt. Sieben Mikrokosmen wurden abgestuft mit Konzentrationen von ca. 0,1 - 3,4 mg Nonylphenol/(kg TG Sediment) dosiert. Bei den übrigen vier Mikrokosmen erfolgte keine Dosierung, sie dienten als Kontrollmikrokosmen. Das Experiment war in eine Präapplikationsperiode, in eine Applikationsperiode und in eine Postapplikationsperiode zeitlich gegliedert. Die Analyse der mikrobiellen Diversität erfolgte mit einem kultivierungsunabhängigen Ansatz, wobei die Domäne *Bacteria* stufenweise bis zu ausgewählten Spezies aufgelöst wurde. Dies durch die Anwendung von FISH, DGGE-Fingerprint sowie durch die Erstellung von Klonbanken. Dabei erfolgte eine Auswertung von rDNA- und rRNA-abhängigen Analysen zur Erfassung der dominanten und physiologisch aktiven Populationen. Die Ergebnisse wurden auf einen funktionellen Parameter, die Aminopeptidase-Aktivität, bezogen.

Steigende Nonylphenoldosen führten in der Applikationsperiode zu einem signifikanten Anstieg der Bakterienzellzahlen und der physiologisch aktiven Bakterien; dies wurde mit Hilfe der 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonde EUB 338 festgestellt. Der Anstieg der Gesamtzellzahl und der physiologisch aktiven Bakterien scheint im weiteren Versuchsverlauf auf einen zusätzlichen saisonalen Parameter, den mit der ansteigenden Primärproduktion erhöhten Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC), zurückzuführen zu sein. Auch die Erhöhung der Aminopeptidase-Aktivität kann durch einen saisonalen Einfluß erklärt werden.

Zur Untersuchung der Abundanzen der aktiven Bakteriengruppen wurde die *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden eingesetzt. Dabei zeigten die Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt in den mit Nonylphenol belasteten Mikrokosmen in der Applikationsperiode gegenüber dem *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum eine erhöhte Zahl an

hybridisierbaren Zellen. Die weitere Analyse der Bakterienpopulation erfolgte mit einer Amplifizierung von Teilstücken der 16S-rDNA und 16S-rRNA mit anschließender Auftrennung im DGGE-Fingerprint und hierarchischer Clusteranalyse. Dabei zeigte sich in den 16S-rDNA-Fingerprints eine Aufteilung in Nonylphenol-belastete Bakterienpopulationen und in nicht dosierte Kontrollen. Die auf Nonylphenol zurückzuführenden Effekte waren jedoch wesentlich geringer als die saisonalen Einflüsse zu sämtlichen Beprobungszeitpunkten. Eine Klonierung und Sequenzierung der 16S-rDNA und -rRNA im Sediment vorkommender Bakterien wiesen auf zumeist noch nicht kultivierte Bakterien hin.

Abschließend kann festgestellt werden, daß Nonylphenol im gewählten Konzentrationsbereich einen sehr geringen Einfluß auf Verschiebungen der mikrobiellen Gemeinschaft und deren Funktion ausübte. Saisonale Änderungen zeigten einen stärkeren Einfluß als die Testsubstanz.

## **Abstract**

The aim of this thesis was to investigate the reaction of bacteria in aquatic sediments towards a nonylphenol gradient. Nonylphenol is a non-ionic surfactant of alkylphenol polyethoxylate which is partially degraded in sewage treatment plants. In this way nonylphenol reaches natural waters.

The test system consisted of eleven microcosms which were filled with 50 l natural lake sediment and 230 l water from Lake Ammersee (Bavaria, Germany), which was installed in an artificial outdoor pond. Seven microcosms were dosed with grading nonylphenol from ca. 0,1 - 3,4 mg/(kg dry weight) sediment. Four microcosms served as controls and no nonylphenol was added. The experiment was divided into three periods: pre application, application and post application. The study on microbial diversity based on a cultivation-independent approach. The domain *Bacteria* was resolved in taxonomic lower levels up to selected species by a combination of FISH, DGGE, cloning and sequencing. These results were related to a parameter of a function - the activity of amino-peptidase. In addition to distinguish between the dominant bacteria of the microbial community and the metabolic active organisms, fingerprints of rDNA and rRNA were compared.

During the application period, a significant increase in the total amount of cells (DAPI stained cells) in correlation with an increase in the nonylphenol concentration was found. Furthermore, an increase in the number of metabolic active bacteria (hybridisation with the oligonucleotide probe EUB 338) could be measured. In further experiments additional seasonal parameters became more prominent. The increase of DOC content in the sediment caused by increasing primary production seemed to effect the increase in the total amount of cells, the number of physiological active bacteria and the activity of amino-peptidase stronger than nonylphenol.

A large fraction of the cells could be identified with the group specific oligonucleotide probes. On this level nonylphenol showed a slight effect on the composition of the microbial community during the application period. Mainly the Gram-positive bacteria with a high G+C-content became more abundant at higher concentrations of nonylphenol in contrast to the subphylum of *Cytophaga-Flexibacter*.

Furthermore, rDNA and rRNA fingerprints were compared. During the entire experiment the bacterial community was very stable. Only slight differences were visible, following a mostly seasonal fluctuation.

An analysis of the highest, the lowest and the control microcosms during the entire experiment using hierarchical cluster analysis was performed. It was possible to assign different clusters for both the rDNA and rRNA fingerprints, which followed the different sampling times. By focussing on the different sampling times differences between the dosed microcosms and the controls were visible.

Cloning and Sequencing of the 16S-rDNA and -rRNA of the sediment bacteria indicated mostly hitherto non-cultivated bacteria.

Overall it can be summarized that the microbial community in the sediment was almost not influenced by the contaminant nonylphenol in the chosen concentration range. In contrast an effect of the sampling time on the microbial community was clearly visible.

## **F Literatur**

### **Ahel M, Giger W and Koch M. 1994.**

Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environments -I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 28:1131-1142.

### **Ahel M, Schaffner C and Giger W. 1994.**

Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environments -II. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.* 28:1143-1152.

### **Ahel M, Schaffner C and Giger W. 1996.**

Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environments -III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Wat. Res.* 30:37-46.

### **Altschul S, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990.**

Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

### **Amann R. 1995.**

Fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology.* 4: 543-554.

### **Amann R, Krumholz L and Stahl DA. 1990.**

Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.

### **Amann R and Ludwig W. 2000.**

Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews.* 24:555-565.

**Amann R, Ludwig W and Schleifer K-H. 1995.**

Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59:143-169.

**Bach H-J, Hartmann A, Trevors JT and Munch JC. 1999.**

Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*. J. of Microbiol. Meth. 37:187-192.

**Bach H-J and Munch JC. 2000.**

Identification of bacterial sources of soil peptidase. Biol. Fertil. Soils. 31:219-224.

**Backhaus K, Erichson B, Plinke W and Weiber R. 2000.**

Multivariate Analysemethoden. Springer-Lehrbuch.

**Bakken LR. 1997.**

Culturable and nonculturable bacteria in soil. In: Sediment Microbiology (Nedwell, DB and Brown CM Eds.). Academic Press, London. 47-61.

**Bennie D. 1999.**

Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. Water Qual. Res. J. Canada. 34:79-122.

**Birnboim HC and Doly J. 1979.**

A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. 7:1513-1522.

**Boschker HTS and Cappenberg TE. 1998.**

Patterns of extracellular enzyme activities in littoral sediments of Lake Gooyer, the Netherlands. FEMS Microbiol. Ecol. 25:79-86.

**Bosshard PP, Santini Y, Grüter D, Stettler R and Bachofen R. 2000.**

Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiol. Ecol. 31:173-182.

**Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB and Witzel K-P. 2000.**

Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. FEMS Microbiol. Rev. 24:673-690.

**Brock TD, Madigan MT, Martinko JM and Parker J. 1994.**

Biology of microorganisms. Prentice-Hall International.

**Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noeller HF. 1981.**

Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 148:107-127.

**Bruns A and Berthe-Corti L. 1998.**

*In situ* detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labeled rRNA-directed oligonucleotide probes. Microbiology. 144:2783-2790.

**Bühl A and Zöfel P. 2000.**

SPSS Version 10, Addison Wesley Verlag, München.

**Chaloux N, Bayona JM and Albaigé J. 1994.**

Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection in environmental matrices. J. Chromatography. 686:275-281.

**Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J and Bloch W. 1992.**

Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy number amplification. Nucleic Acids Res. 20:1717-1723.

**Chrost RJ. 1991.**

Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Microbial enzymes in aquatic environment . Chrost RJ (ed.), Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. 30-59.

**Clark JM and Swika RL. 1977.**

Experimental Biochemistry. 2n ed., WH Freeman and Company, San Francisco.

**Corti A, Frassinetti S, Vallini G, D' Antone S, Fichi C and Solaro R. 1995.**

Biodegradation of nonionic surfactants. I Biotransformation of 4-(1-nonylphenol)phenol by a *Candida maltosa* isolate. Environmental Pollution. 90:83-87.

**Cottrell MT and Kirchman DL. 2000.**

Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high molecular-weight dissolved organic matter. Appl. Environ. Microbiol. 66 :1692-1697.

**Cryer DR, Eccleshall R, and Marmur J. 1975.**

Isolation of yeast DNA. In: Prescott DM (ed.), Methods in Cell Biology. 12:39-44.

**Ehrlich HA, Gelfand D and Saiki R. 1988.**

Specific DNA amplification. Nature. 331: 461-462.

**Ejlertsson J, Nilsson M-L, Kylin H, Bergman A, Karlson L, Öquist M and Sevensson BH. 1999.**

Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge. Environ. Sci. Technol. 33:301-306.



**Fabiano M and Danovaro R. 1998.**

Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). Appl. Environ. Microbiol. 64 :3838-3845.

**Farrell JRE. 1993.**

RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization . Academic Press, New York.

**Felske A. 1999.**

Response of predominant soil bacteria to grassland succession as monitored by ribosomal RNA analyses. . Ph.D. thesis, Wageningen, Netherlands.

**Felske A, Engelen B, Nübel U and Backhaus H. 1996.**

Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 4162-4167.

**Fent K. 1998.**

Ökotoxikologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.

**Glöckner FO, Fuchs B and Amann R.1999.**

Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridisation. Appl. Environ. Microbiol. 65:3721-3726.

**Henikoff S. 1984.**

Gene. 28:351.

**Hengstmann U, Chin K-J, Janssen PH and Liesack W. 1999.**

Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5050-5058.

**Heuer H and Smalla K. 1997.**

Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: van Elsas JD, Trevors JT and Wellington EMH (ed) *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York 353-373.

**Holtey-Weber R. 2000.**

Zur gesundheitlichen Relevanz von Xenoestrogenen in Wasser und in Lebensmitteln. *GIT Labor-Fachzeitschrift.* 9:1030-1031.

**Hoppe H-G, Kim S-J, Gocke K. 1988.**

Microbial decomposition in aquatic environments: Combined process of extracellular enzymatic activity and substrate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:784-790.

**Jimenez MA. 2000.**

Zeitgang der Gehalte und der Umsetzung von Stickstoff in der mikrobiellen Biomasse eines Agrarbodens nach einer Gründüngung. *FAM-Bericht 38*. Hieronymus München. Ph. D. thesis, TU München.

**Jontofsohn M, Stoffels M, Schloter M, Pfister G, Jüttner I, Severin-Edmaier G, Schramm KW and Hartmann A. in press.**

Influence of nonylphenol on the microbial community of lake sediments in microcosms. *STOTEN*.

**Josephson KL, Gerba CP and Pepper TL. 1993.**

Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 59:3513-3515.

**Klappenbach JA, Dunbar JM and Schmidt TM. 2000.**

rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66:1328-1333.

**Kujawa M, Schnaak W and Kuchler Th. 1997.**

Occurrence of organic pollutants in sewage sludge and influence of surfactants on their mobility in amended soils. In: abstracts of the specialty conference on management and fate of toxic organics in sludge applied to land. Copenhagen, Denmark, 30 april to may, department of environmental science and engineering, technical university of Denmark.

**Lampert W and Sommer U. 1993.**

Limnoökologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

**Langworthy DE, Stapleton RD, Saylor GS and Findlay RH. 1998.**

Genotypic and phenotypic response of a Riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. Appl. Environ. Microbiol. 64:3422-3428.

**Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer K-H and Wagner M. 1999.**

Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65:1289-1297.

**Liu, C. C. et al. 1979.**

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 43, 469.

**Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R and Amann R. 1998.**

Microbial community composition of wadden sea sediment as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2691-2696.

**Ludwig W and Schleifer K-H. 1994.**

Bacterial phylogeny based on 16S- and 23S-rRNA sequence analysis. FEMS Microbiology Reviews. 15:155-173.

**Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, Cooper DW and Jones DM. 1999.**

Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries. Environ. Sci. Technol. 33:1009-1014.

**Macalady JL, Mack EE, Nelson DC and Scow KM. 2000.**

Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted Clear Lake, California. Appl. Environ. Microbiol. 66:1479-1488.

**Maki H, Masuda N, Fujiwara Y, Ike M and Fujita M. 1994.**

Degradation of alkylphenol ethoxylates by *Pseudomonas* sp. strain TR01. Appl. Environ. Microbiol. 60:2264-2271.

**Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M and Schleifer K-H. 1996.**

Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. Microbiology. 142:1097-1106.

**Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M and Schleifer K-H. 1992.**

Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. System. Appl. Microbiol. 15:593-600.

**Meier H. 1997.**

Nachweis von Fäkalstreptokokken mit rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden zur Anwendung in der hygienischen Trinkwasserkontrolle. Ph. D. thesis, TU München.

**Melzer A, Harlacher R, Held K and Vogt E. 1988.**

Die Makrophytenkartierung des Ammer-, Wörth-, und Pilsensees sowie des Weißlinger Sees. Informationsbericht des Bayrischen Landesamts für Wasserwirtschaft, 1988/1:1-266.

**Miskin IP, Farrimond P and Head IM. 1999.**

Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiology*. 145:1977-1987.

**Muyzer G and Smalla K. 1998.**

Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:127-141.

**Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaider J, Wieshuber A, Amann R, Ludwig W and Backhaus H. 1996.**

Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178:5636-5643.

**Oelmüller U, Krüger N, Steinbüchel A and Friedrich CG. 1990.**

Isolation of procaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Methods*. 11:73-84.

**Pernthaler J, Glöckner FO, Unterholzer S, Alfreider A, Psenner R and Amann R. 1998.**

Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archea* in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4299-4306.

**Pfeifer C, Emmerling C, Schröder D and Niemeyer J. 1998.**

Antibiotika (Ivermectin, Monensin) und endokrine Umweltchemikalien (Nonylphenol, Ethinylöstradiol) im Boden. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10:147-153.

**Poremba K. 1995.**

Hydrolytic enzymatic activity in deep-sea sediments. FEMS Microbiol Ecol. 16:213-222.

**Porter KG and Feig YS. 1980.**

The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr; 8:943-948.

**Rippen 1998.**

Handbuch Umweltchemikalien 44. Erg.Lfg. 9/98.

**Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W and Schleifer K-H. 1994.**

*In situ* probing of gram-positive bacteria with high G+C content by using a 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiology. 140:2849-2858.

**Rosselló-Mora R, Thamdrup B, Schäfer H, Weller R and Amann R. 1999.**

The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. System. Appl. Microbiol. 22:237-248.

**Sambrock J and Russell. 2001.**

Molecular cloning – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York,

**Sandmann E. 2000.**

Microhabitat field-studies in a natural lake littoral zone and different mesocosm systems for an ecotoxicological test with cypermethrin. Ph. D. thesis, TU München

**Schlöter M, Leubner M, Heulin T and Hartmann A. 2000.**

Ecology and evolution of bacterial microdiversity. FEMS Microbiol. Rev. 24:647-660.

**Schulze R. 1999.**

Phylogenetische Analyse der mikrobiellen Population in Süßwassersedimenten und Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von bisher nicht kultivierten Bakterien. Ph. D. thesis, TU München.

**Schweitzer B, Huber I, Amann R, Ludwig W and Simon M. 2001.**

$\alpha$ - and  $\beta$ -Proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. Appl. Environ. Microbiol. 67:632-645.

**Severin-Edmaier GF. 2000.**

Effekte hormonell wirksamer Substanzen auf das Zooplankton aquatischer Modellökosysteme. Ph.D. thesis, TU München,

**Shuman S. 1994.**

Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J. Biol. Chem. 269:32678-32684.

**Sievert SM, Brinkhoff T, Muyzer G, Ziebis W and Kuever J. 1999.**

Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). Appl. Environ. Microbiol. 65:3834-3842.

**Simon M, Jontofsohn M, Parparov A and Berman T. 2000.**

Turnover of combined amino acids and carbohydrates on organic aggregates and in bulk water in Lake Kinneret and other pelagic ecosystems. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 55:365-377.

**Smith DC, Simon M, Alldredge AL and Azam F. 1992.**

Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Letters to 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.

**Spector AA et al. 1971.**

*Biochemistry.* 10, 3229.

**Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, De Jong S, Kline E, Stephen JR and Laanbroek HJ. 2001.**

Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S-rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:469-472.

**Spring S, Schulze R, Overmann J and Schleifer K-H. 2000.**

Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews.* 24:573-590.

**Stoffels M. 1998.**

Identifizierung und Anreicherung von Bakterien durch verschiedene molekulare *in situ* und *in vitro* Hybridisierungstechniken. Ph. D. thesis, TU München.

**Stryer L. 1996.**

*Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

**Suhadloc M, Schloter M, Schroll R, Bergmüller C, Bolta Š V, Lobnik F and Leštan D. 2000.**

Fate of isoproturon in two heavy metal contaminated soils in a microcosm experiment. *Fresenius Envir. Bull.* 9:691-700.



**Tanghe T, Dhooge W and Verstraete W. 1999.**

Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. Appl. Environ. Microbiol. 65:746-751.

**Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994.**

Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research. 22:4673-4680.

**Vallini G, Frassinetti S and Scorzetti G. 1997.**

*Candida aquatextoris* sp. nov., a new species of yeast occurring in sludge from a textile industry wastewater treatment plant in Tuscany, Italy. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:336-340.

**VDLUFA. 1991.**

Die Untersuchung der Böden. VDLUFA-Verlag, Darmstadt 4. Auflage.

**Veith GD and Kiwus LM. 1977.**

An exhaustive steam-distillation and solvent-extraction unit for pesticides and industrial chemicals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 17:631-636.

**Wintzingerode v F, Göbel UB and Stackebrandt E. 1997.**

Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews. 21:213-229.

**Wintzingerode v F, Landt O, Ehrlich A and Göbel UB. 2000.**

Peptide nucleic acid-mediated PCR clamping as a useful supplement in the determination of microbial diversity. Appl. Environ. Microbiol. 66:549-557.

**Woese CR. 1987.**

Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.

**Worm J and Nybroe O. 2001.**

Input of protein to lake water microcosms affects expression of proteolytic enzymes and the dynamics of *Pseudomonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 67:4955-4962.

**Zubkov MV, Fuchs BM, Burkill PH and Amann R. 2001.**

Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. Appl. Environ. Microbiol. 67:5210-5218.

**Tab. G 1: Standardabweichungen der proteolytischen Aktivitäten**  
 der einzelnen Mikrokosmen N1 - N7 und der Kontrollmikrokosmen K1 - K4 in  
 [ $\mu\text{M}/(\text{h g TG})$ ] zu den verschiedenen Beprobungstagen, vgl. C 3.

Kosmos	Tag						
	0	2	8	16	23	30	37
N1	1,90	2,02	0,35	3,29	7,22	5,48	4,75
N2	1,74	0,04	3,83	7,74	4,61	2,52	10,97
N3	1,51	2,79	0,50	3,53	10,23	1,01	2,91
N4	4,17	2,17	2,20	8,37	4,13	2,31	5,98
N5	2,28	2,38	1,44	2,07	n.a	2,08	1,89
N6	2,28	2,38	1,44	2,07	n.a	2,08	1,89
N7	4,24	1,50	1,16	5,22	2,49	5,49	3,86
K1	0,42	0,73	3,29	7,50	4,35	2,39	2,15
K2	10,22	1,97	4,35	9,46	1,64	5,44	5,41
K3	1,63	1,25	2,27	5,40	5,37	2,85	8,70
K4	4,18	0,81	1,76	5,39	0,66	7,90	9,17

Kosmos	Tag						
	44	53	58	65	72	79	86
N1	1,97	1,27	1,85	1,84	0,38	0,34	0,85
N2	2,63	4,40	4,85	4,39	1,18	0,26	2,00
N3	4,76	4,87	1,87	1,10	1,70	1,99	0,41
N4	3,11	1,83	1,93	2,12	0,71	0,15	0,77
N5	0,00	0,13	1,15	1,05	0,62	0,56	0,28
N6	0,00	0,13	1,15	1,05	0,62	0,56	0,28
N7	1,66	1,50	1,92	1,32	0,21	0,31	0,87
K1	2,58	1,21	0,21	0,70	1,19	0,50	0,49
K2	3,92	2,19	0,87	1,61	1,53	0,66	0,41
K3	1,46	2,93	3,84	3,83	1,20	0,52	1,52
K4	3,67	4,59	2,88	2,94	0,86	0,97	1,19

**Tab. G 2: Standardabweichung zur *in situ* Hybridisierung zur Abb. C 9**

S [%] Standardabweichung in Prozent, wobei die Hybridisierung mit EUB 338 zu 100% gesetzt worden ist;

verwendete Oligonukleotidsonden: ALPHA 1b, BETA 42a, GAM 42a, CF 319a+b, LGC 345a+b+c, HGC 69a (vgl. Tab. B 1).

S [%]	Tag 36			Tag 57		
	K	N1	N7	K	N1	N7
ALPHA 1b	8,80	12,60	11,89	8,32	13,20	14,38
BETA 42a	8,12	15,01	10,72	5,47	6,08	7,09
GAM 42a	3,58	24,40	16,67	5,83	7,86	12,85
CF 319a+b	3,30	4,02	3,36	3,21	6,82	7,48
LGC 345a+b+c	2,06	2,28	3,88	1,90	1,19	3,26
HGC 69a	1,24	5,63	5,68	1,19	1,19	0,96

S [%]	Tag 71		
	K	N1	N7
ALPHA 1b	7,16	6,97	19,77
BETA 42a	4,04	7,3	12,29
GAM 42a	7,03	5,75	5,65
CF 319a+b	3,13	2,21	5,32
LGC 345a+b+c	1,82	0,88	1,66
HGC 69a	1,43	1,22	2,33

**Tab. G 3: Näherungsmatrix des DGGE-Übersichts-16S-rDNA-Fingerprints der hierarchischen Clusteranalyse**Berechnung mit *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient.**Fall 1 - 24.3****Fall 2 – N1(25.5)****Fall 3 – N7(25.5)****Fall 4 – N7(25.5)****Fall 8 –N1(29.7)****Fall 9 – N7 (29.7)****Fall 10 – K(29.7)****Fall 5 – N1(10.7)****Fall 6 – N7(10.7)****Fall 7 – K(10.7)****Fall 11 – N1(3.9)****Fall 12 – N7(3.9)****Fall 13 – K(3.9)****Näherungsmatrix**

Fall	Ähnlichkeitsmaß nach Jaccard												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		,556	,500	,382	,367	,276	,290	,324	,333	,303	,268	,294	,333
2	,556		,591	,344	,276	,222	,286	,281	,290	,258	,263	,333	,200
3	,500	,591		,481	,308	,200	,320	,226	,194	,200	,250	,321	,184
4	,382	,344	,481		,313	,310	,414	,243	,324	,294	,325	,406	,293
5	,367	,276	,308	,313		,600	,667	,600	,444	,520	,270	,393	,306
6	,276	,222	,200	,310	,600		,550	,385	,458	,478	,194	,296	,265
7	,290	,286	,320	,414	,667	,550		,560	,462	,609	,243	,357	,211
8	,324	,281	,226	,243	,600	,385	,560		,654	,680	,275	,344	,378
9	,333	,290	,194	,324	,444	,458	,462	,654		,783	,316	,448	,429
10	,303	,258	,200	,294	,520	,478	,609	,680	,783		,289	,414	,400
11	,268	,263	,250	,325	,270	,194	,243	,275	,316	,289		,563	,611
12	,294	,333	,321	,406	,393	,296	,357	,344	,448	,414	,563		,389
13	,333	,200	,184	,293	,306	,265	,211	,378	,429	,400	,611	,389	

Dies ist eine Ähnlichkeitsmatrix

**Tab. G 4: Näherungsmatrix des DGGE-Übersichts-16S-rRNA-Fingerprints der hierarchischen Clusteranalyse**  
Berechnung mit *Jaccard*-Ähnlichkeitskoeffizient.

**Fall 1 – N1(25.5)**                      **Fall 7 – N1(29.7)**  
**Fall 2 – N7(25.5)**                      **Fall 8 – N7(29.7)**  
**Fall 3 – N7(25.5)**                      **Fall 9 – K(29.7)**  
  
**Fall 4 – N1(10.7)**                      **Fall 10 – N1(3.9)**  
**Fall 5 – N7 (10.7)**                      **Fall 11 – N7(3.9)**  
**Fall 6 – K(10.7)**                      **Fall 12 – K(3.9)**

**Näherungsmatrix**

Fall	Ähnlichkeitsmaß nach Jaccard											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		,714	,786	,450	,188	,368	,269	,231	,318	,368	,421	,421
2	,714		,615	,471	,250	,375	,261	,217	,250	,294	,278	,438
3	,786	,615		,444	,231	,438	,250	,208	,368	,353	,333	,333
4	,450	,471	,444		,250	,688	,214	,222	,364	,286	,273	,400
5	,188	,250	,231	,250		,308	,200	,211	,176	,214	,200	,385
6	,368	,375	,438	,688	,308		,240	,304	,350	,263	,250	,316
7	,269	,261	,250	,214	,200	,240		,850	,619	,476	,333	,455
8	,231	,217	,208	,222	,211	,304	,850		,500	,429	,348	,409
9	,318	,250	,368	,364	,176	,350	,619	,500		,588	,333	,400
10	,368	,294	,353	,286	,214	,263	,476	,429	,588		,471	,563
11	,421	,278	,333	,273	,200	,250	,333	,348	,333	,471		,529
12	,421	,438	,333	,400	,385	,316	,455	,409	,400	,563	,529	

Dies ist eine Ähnlichkeitsmatrix

## ***Lebenslauf***

### Persönliche Daten

Name Miriam Jontofsohn, verheiratet  
geboren 17.12.1968 in Tübingen

### Schulische Ausbildung

1975 - 1979 Grundschule in Stuttgart  
1979 - 1989 Gymnasium Königin-Katharina-Stift, Stuttgart  
Allgemeine Hochschulreife

### Studium

Biologiestudium 1990 - 1997 in Kassel, Bonn, Freiburg und Konstanz  
Diplomarbeit 1996 in Israel: Kinneret Limnological Laboratory, Tiberias  
„Untersuchungen von Lake Snow-Aggregaten im Lake Kinneret“  
Promotion 1998 - 2002 am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Neuherg